

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Erika BEŠTER

**OKSIDACIJSKA STABILNOST
EKSTRA DEVIŠKIH OLJČNIH OLJ
SLOVENSKE ISTRE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**OXIDATIVE STABILITY
OF EXTRA VIRGINE OLIVE OILS
FROM SLOVENIAN ISTRA**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2007

Bešter E. Oksidacijska stabilnost ekstra deviških oljčnih olj Slovenske Istre.

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2007

Doktorsko delo je zaključek podiplomskega študija živilstva. Opravljeno je bilo v Izoli v Laboratoriju za preskušanje oljčnega olja v okviru Znanstveno-raziskovalnega središča Koper in v sodelovanju s strokovnjaki LABS d.o.o, meritve oksidacijske stabilnosti pa so bile opravljene v Ljubljani v Emoni, Razvojnem centru za prehrano.

Senat Univerze v Ljubljani je dne 14.02.2006 odobril temo doktorske disertacije in za mentorico imenoval prof. dr. Terezijo Golob.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rajko Vidrih
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Terezija Golob
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Olivera Koprivnjak
Medicinski fakultet u Rijeci, Katedra za tehnologiju i kontrolu namirnica

Datum zagovora: 20.12.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Erika Bešter

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 664.33: 634.63: 543.61 (043)=863
- KG olje/rastlinsko olje/ekstra deviško oljčno olje/cv. 'Istrska belica'/cv. 'Leccino'
/sončnično olje/skladiščenje/segrevanje/oksidacija/antioksidanti
/antioksidacijska učinkovitost/oksidacijska stabilnost
- AV BEŠTER, Erika, univ. dipl. inž. kem.
- SA GOLOB, Terezija (mentorica)
- KZ SI-1000 LJUBLJANA Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2007
- IN OKSIDACIJSKA STABILNOST EKSTRA DEVIŠKIH OLJČNIH OLJ
SLOVENSKE ISTRE
- TD Doktorska disertacija (s področja živilstva)
- OP XV, 132 str., 12 pregl., 61 sl., 6 pril., 146 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen raziskave je bil proučiti vpliv skladiščenja in segrevanja pri različnih pogojih na proučevane parametre v ekstra deviškem oljčnem olju (EDOO) Slovenske Istre. Analizirali smo parametre, ki so pokazatelji stopnje oksidiranosti olja, maščobnokislinsko sestavo, vsebnost antioksidantov, antioksidacijsko učinkovitost in oksidacijsko stabilnost. V raziskavo smo vključili kakovostna sortna EDOO Slovenske Istre iz dveh v Slovenski Istri najbolj razširjenih sort 'Istrska belica' in 'Leccino', v sklop segrevanja pa smo za primerjavo vključili tudi sončnično olje. Vzorce smo skladiščili eno leto v zmrzovalniku pri -20 °C in v hladilniku pri 8 °C. Ugotovili smo, da skladiščenje referenčnega vzorca oljčnega olja pri 8 °C za daljše časovno obdobje ni primerno, saj se je večina proučevanih parametrov v obdobju enega leta spremenila. Primernejše je skladiščenje pri -20 °C, vendar se tudi pri teh pogojih nekateri parametri, kot so peroksidno število in vsebnost ter sestava biofenolov, v obdobju enega leta lahko nekoliko spremenijo. V sklopu segrevanja smo opravili tri poskuse pri različnih pogojih segrevanja, pri temperaturi kuhanja (100 °C) in cvrenja (180 °C). Spremembe večine proučevanih parametrov so bile izrazitejše v sončničnem olju kot v EDOO. Oksidacijska stabilnost sončničnega olja je bila tako v svežih vzorcih kot v vzorcih po segrevanju bistveno manjša kot v EDOO, saj ima oljčno olje bolj ugodno maščobnokislinsko sestavo in vsebuje več različnih antioksidantov kot sončnično olje. Na oksidacijsko stabilnost bolj kot vsebnost α -tokoferola vpliva vsebnosti ostalih antioksidantov (pigmentov in biofenolov) in maščobnokislinska sestava.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 664.33: 634.63: 543.61 (043)=863
- CX oils/vegetable oils/extra virgin olive oil/cv. Istrska belica/cv. Leccino/sunflower oil/storing/heating/oxidation/antioxidants/antioxidant activity/oxidative stability
- AU BEŠTER, Erika
- AA GOLOB, Terezija (supervisor)
- PP SI-1000 LJUBLJANA Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PU University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2007
- TI OXIDATIVE STABILITY OF EXTRA VIRGIN OLIVE OILS FROM SLOVENIAN ISTRA
- DT Doctoral dissertation
- NO XV, 132 p., 12 tabl., 61 fig., 6 ann., 146 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of investigation was to examine the influence of storing and heating at different conditions on investigated parameters in extra virgin olive oil (EVOO) from Slovenian Istra. The following determinations were performed: parameters which indicate the level of oxidation, antioxidants contents, antioxidant activity and oxidative stability. Only high quality monovarietal EVOO from Slovenian Istra from cv. *Istrska belica* and *Leccino*, two predominant cultivars in Slovenian Istra, were included in this investigation; in the heating set of experiments, sunflower oil was also included for comparison purposes. The samples were stored for one year in freezer at -20 °C and in refrigerator at 8 °C. Most of the investigated parameters changed during one year of storing, therefore storing of reference olive oil samples at 8 °C is not appropriate. It is more appropriate to store samples at -20 °C although even at this conditions some of the parameters, such as peroxide value, total biophenols and biophenol composition, can be slightly changed. We performed three sets of heating experiments at different conditions at the temperature of cooking (100 °C) and frying (180 °C). Most parameters changed more in sunflower oil than in EVOO. Before and after heating, oxidative stability of sunflower oil was substantially lower than oxidative stability of EVOO because olive oil has more favourable fatty acid composition and higher antioxidants contents than sunflower oil. The influence of α -tocopherol on the oxidative stability is not as strong as the influence of other antioxidants and fatty acid composition.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	str. III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	IX
	Kazalo slik	X
	Kazalo prilog	XIV
	Okrajšave in simboli	XV
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	3
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	SESTAVA OLJČNEGA OLJA	4
2.1.1	Maščobnokislinska sestava oljčnega olja	4
2.1.2	Tokoferoli v oljčnem olju	5
2.1.3	Klorofilni pigmenti v oljčnem olju	6
2.1.4	Karotenoidi v oljčnem olju	6
2.1.5	Biofenoli v oljčnem olju	8
2.1.6	Hlapne in aromatične sestavine v oljčnem olju	12
2.1.7	Skvalen v oljčnem olju	12
2.2	METODE ZA DOLOČEVANJE NEKATERIH SESTAVIN IN ZNAČILNOSTI OLJČNEGA OLJA	13
2.2.1	Ugotavljanje stopnje oksidiranosti oljčnega olja	13
2.2.2	Določevanje tokoferolov v oljčnem olju	14
2.2.3	Določevanje pigmentov v oljčnem olju	14
2.2.4	Določevanje biofenolov v oljčnem olju	15
2.2.4.1	Ekstrakcija biofenolov iz oljčnega olja	15
2.2.4.2	Določevanje vsebnosti biofenolov v oljčnem olju z reagentom Folin-Ciocalteu	16
2.2.4.3	Določevanje vsebnosti <i>o</i> -difenolov v oljčnem olju	16
2.2.4.4	Določevanje vsebnosti biofenolov in biofenolne sestave v oljčnem olju s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)	16
2.2.4.5	Določevanje vsebnosti biofenolov in biofenolne sestave oljčnega olja s plinsko kromatografijo (GC)	17
2.2.4.6	Druge metode za določevanje vsebnosti biofenolov v oljčnem olju	17
2.2.5	Določevanje antioksidacijske učinkovitosti	18
2.2.5.1	Različni načini podajanja antioksidacijske učinkovitosti	19
2.2.5.2	Izvedba eksperimenta z DPPH	20
2.2.6	Določevanje oksidacijske stabilnosti oljčnega olja	21
2.3	OKSIDACIJA MAŠČOB	22
2.3.1	Avtooksidacija maščob	22
2.3.2	Fotooksidacija maščob	24
2.3.2.1	Fotooksidacija tipa I	24
2.3.2.2	Fotooksidacija tipa II	25

2.3.3	Vpliv strukture maščobnih kislin na hitrost oksidacije maščob	25
2.4	ŠTUDIJE SHRANJEVANJA OLJČNEGA OLJA	25
2.5	ŠTUDIJE SEGREVANJA OLJČNEGA OLJA	26
3	MATERIAL IN METODE	27
3.1	ZASNOVA RAZISKAVE	27
3.1.1	Vzorčenje	27
3.1.2	Skladiščenje ekstra deviškega oljčnega olja eno leto pri -20 °C in 8 °C	30
3.1.3	Segrevanje olja	30
3.1.3.1	Spremljanje proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju med segrevanjem v Rancimatu	30
3.1.3.2	Spremljanje proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C	31
3.1.3.3	Spremljanje proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju med stournim segrevanjem pri 180 °C	32
3.2	ANALIZNI POSTOPKI	32
3.2.1	Določevanje kislosti	33
3.2.2	Določevanje peroksidnega števila	33
3.2.3	Določevanje <i>p</i>-anisidinskega števila	33
3.2.4	Določevanje totoks števila	33
3.2.5	Spektrofotometrijska preiskava v UV	34
3.2.6	Določevanje maščobnokislinske sestave	35
3.2.7	Določevanje vsebnosti tokoferolov	36
3.2.8	Določevanje vsebnosti skupnih karotenoidov	36
3.2.9	Določevanje vsebnosti skupnih klorofilnih pigmentov	36
3.2.9.1	Metoda po Mínguez-Mosqueri	36
3.2.9.2	Metoda po Pokornju	37
3.2.10	Izračun konstante hitrosti za razgradnjo pigmentov	37
3.2.11	Določevanje vsebnosti skupnih biofenolov – metoda FC	37
3.2.12	Določevanje biofenolne sestave s HPLC	38
3.2.13	Določevanje antioksidacijske učinkovitosti	40
3.2.13.1	Priprava ekstrakta	40
3.2.13.2	Določitev antioksidacijske učinkovitosti	40
3.2.14	Določevanje oksidacijske stabilnosti olja	41
3.2.15	Statistična analiza	42
4	REZULTATI	44
4.1	REZULTATI ANALIZ EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA SKLADIŠČENEGA PRI RAZLIČNIH POGOJIH	44
4.1.1	Rezultati analiz parametrov kakovosti v svežih in v eno leto skladiščenih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	44
4.1.2	Rezultati določevanja maščobnokislinske sestave v svežih in v eno leto skladiščenih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	48
4.1.3	Rezultati določevanja vsebnosti antioksidantov v svežih in v eno leto skladiščenih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	52
4.1.4	Rezultati določevanja oksidacijske stabilnosti v svežih in v eno leto skladiščenih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	58
4.2	REZULTATI ANALIZ VZORCEV EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA PRED SEGREVANJEM IN PO SEGREVANJU V RANCIMATU	59

4.2.1	Rezultati določevanja parametrov kakovosti v ekstra deviškem oljčnem olju pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu	59
4.2.2	Rezultati določevanja maščobnokislinske sestave v ekstra deviškem oljčnem olju pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu	63
4.2.3	Rezultati določevanja vsebnosti antioksidantov v ekstra deviškem oljčnem olju pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu	67
4.2.4	Rezultati določevanja oksidacijske stabilnosti v ekstra deviškem oljčnem olju pred segrevanjem v Rancimatu	70
4.3	REZULTATI SPREMLJANJA PROUČEVANIH PARAMETROV V EKSTRA DEVIŠKEM OLJČNEM OLJU IN SONČNIČNEM OLJU MED OSEMURNIM SEGREVANJEM	71
4.3.1	Rezultati spremljanja stopnje oksidiranosti olja v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C	71
4.3.2	Rezultati spremljanja maščobnokislinske sestave ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C	76
4.3.3	Rezultati spremljanja vsebnosti antioksidantov in antioksidacijske učinkovitosti v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnega olja med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C	77
4.4	SPREMEMBE PROUČEVANIH PARAMETROV V EKSTRA DEVIŠKEM OLJČNEM OLJU IN SONČNIČNEM OLJU PO STOURNEM SEGREVANJU PRI 180 °C	85
4.4.1	Rezultati ugotavljanja stopnje oksidiranosti ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po stournem segrevanju pri 180 °C	85
4.4.2	Rezultati določevanja maščobnokislinske sestave ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po stournem segrevanju pri 180 °C	88
4.4.3	Rezultati določevanja vsebnosti antioksidantov in antioksidacijske učinkovitosti v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju pred segrevanjem in po stournem segrevanju pri 180 °C	90
4.4.4	Rezultati določevanja oksidacijske stabilnosti ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po stournem segrevanju pri 180 °C	96
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	97
5.1	VPLIV SKLADIŠČENJA EDOO NA PROUČEVANE PARAMETRE	97
5.2	VPLIV SEGREVANJA EDOO IN SONČNIČNEGA OLJA NA PROUČEVANE PARAMETRE	102
5.2.1	Vpliv segrevanja na kislost ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja	103
5.2.2	Vpliv segrevanja na peroksidno, p-anisidinsko in totoks število v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju	104
5.2.3	Vpliv segrevanja na vrednost parametrov K_{232} in K_{270} v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju	106
5.2.4	Vpliv segrevanja na maščobnokislinsko sestavo ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja	107

5.2.5	Vpliv segrevanja na vsebnost α-tokoferola v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju	108
5.2.6	Vpliv segrevanja na vsebnost pigmentov v ekstra deviškem oljčnem olju	109
5.2.7	Vpliv segrevanja na vsebnost biofenolov v ekstra deviškem oljčnem olju	110
5.2.8	Vpliv segrevanja na antioksidacijsko učinkovitost ekstra deviškega oljčnega olja	111
5.2.9	Vpliv segrevanja na oksidacijsko stabilnost EDOO in sončničnega olja	112
5.3	PRIMERJAVA EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA SORTE 'LECCINO', EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA SORTE 'ISTRSKA BELICA' IN SONČNIČNEGA OLJA	115
5.4	SKLEPI	116
6	POVZETEK	118
6.1	POVZETEK	118
6.2	SUMMARY	119
7	VIRI	122
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Maščobnokislinska sestava v oljčnem olju (COI, 2006; Butinar in sod. 2004)	5
Preglednica 2: Podatki o vzorcih (letnik, pridelovalec, tehnologija pridelave in vrsta olja), vključenih v posamene eksperimente.	28
Preglednica 3: Mejne vrednosti parametrov kakovosti za EDOO (Uredba Komisije..., 1991)	29
Preglednica 4: Povprečne vrednosti parametrov kakovosti v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	45
Preglednica 5: Povprečna maščobnokislinska sestava v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	48
Preglednica 6: Povprečna vsebnost α -tokoferola in biofenolov v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	53
Preglednica 7: Povprečja parametrov kakovosti v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu	60
Preglednica 8: Povprečna maščobnokislinska sestava v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu	64
Preglednica 9: Povprečne vsebnosti α -tokoferola in biofenolov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu	67
Preglednica 10: Maščobnokislinska sestava v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred osemurnim segrevanjem	76
Preglednica 11: Konstante hitrosti zmanjševanja vsebnosti pigmentov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in pri 180 °C	80
Preglednica 12: Maščobnokislinska sestava v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	89

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Struktura β -karotena in luteina (Miller in sod., 1996)	7
Slika 2: Olevropein, ligstrozid in njuni sestavni deli (Glu: glukoza) (Ryan in sod., 2002)	9
Slika 3: Razgradnja olevropeina in ligstrozida (Rovellini in Cortesi, 2002)	10
Slika 4: Struktura lignanov v oljčnem olju (Mulinaci in sod., 2006)	11
Slika 5: Struktura flavonoidov v oljčnem olju (Bouaziz in sod., 2005)	11
Slika 6: Kromatogram za določevanje maščobnokislinske sestave v EDOO	35
Slika 7: Kromatogram za določevanje biofenolov v ekstra deviškem oljčnem olju. (a): 280 nm; (b): 340 nm. Identifikacija spojin: (1) hidroksitirozol, (2) tirozol, (3) DMO-Agl-dA, (4) O-Agl-dA, (5) DML-Agl-dA, (6) lignani, (7) L-Agl-dA, (8) O-Agl, (9) L-Agl, (10) luteolin in (11) apigenin	38
Slika 8: Kislost v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	46
Slika 9: Peroksidno število v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	46
Slika 10: Vrednost K_{232} v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	47
Slika 11: Vrednost K_{270} v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	47
Slika 12: Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' (MK_{IB} : % maščobne kisline v EDOO sorte 'Istrska belica'; MK_L : % maščobne kisline v ekstra deviškem oljčnem olju sorte 'Leccino')	50
Slika 13: Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja (MK_Z : % maščobne kisline v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja, skladiščenih eno leto v zmrzovalniku pri -20 °C; MK_{SV} : % maščobne kisline v svežih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja)	51
Slika 14: Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v svežih in v skladiščenih (eno leto pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja (MK_H : % maščobne kisline v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja, skladiščenih eno leto v hladilniku pri 8 °C; MK_{SV} : % maščobne kisline v svežih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja)	52
Slika 15: Vsebnost α -tokoferola v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	55
Slika 16: Povprečna vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v svežih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino'	56
Slika 17: Povprečna vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	56

Slika 18:	Razmerje med vsebnostmi sekoiridoidnih biofenolov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja: Z/SV: v skladiščenih (eno leto v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) in v svežih vzorcih; H/SV: v skladiščenih (eno leto v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) in v svežih vzorcih	57
Slika 19:	Vsebnost skupnih biofenolov v svežih in skladiščenih (eno leto pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja (IB: povprečje vzorcev 'Istrske belice'; L: povprečje vzorcev 'Leccina'; HPLC: vsebnost skupnih biofenolov, določenih s HPLC; FC: vsebnost skupnih biofenolov, določenih z metodo FC)	58
Slika 20:	Indukcijski čas v svežih in v skladiščenih (eno leto pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja	59
Slika 21:	Kislota v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)	60
Slika 22:	Peroksidno število v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)	61
Slika 23:	Vrednost K_{232} v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)	62
Slika 24:	Vrednost K_{270} v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)	62
Slika 25:	Vrednost ΔK v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)	63
Slika 26:	Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' pred segrevanjem v Rancimatu in po njem (MK_{PRED} : % maščobne kisline pred segrevanjem; MK_{PO} : % maščobne kisline po segrevanju)	65
Slika 27:	Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Leccino' pred segrevanjem v Rancimatu in po njem (MK_{PRED} : % maščobne kisline pred segrevanjem; MK_{PO} : % maščobne kisline po segrevanju)	66
Slika 28:	Vsebnost α -tokoferola v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)	68
Slika 29:	Povprečna vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sort 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem v Rancimatu	68
Slika 30:	Povprečna vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem v Rancimatu in po njem	69
Slika 31:	Vsebnost skupnih biofenolov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem (modra) v Rancimatu in po njem (oranžna). (FC: metoda FC; HPLC: metoda HPLC)	70
Slika 32:	Indukcijski čas v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)	71

Slika 33:	Kislost v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)	72
Slika 34:	Peroksidno število v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)	72
Slika 35:	<i>p</i> -anisidinsko število v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)	73
Slika 36:	Totoks število v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)	74
Slika 37:	Vrednost K_{232} v ekstra deviškem oljčnem in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: EDOO sorte 'Istrska belica'; L: EDOO sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)	74
Slika 38:	Vrednost K_{270} v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)	75
Slika 39:	Razmerja med vsebnostmi posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja po segrevanju (8 ur pri 180 °C) in pred segrevanjem. (MK_{PO} : delež maščobne kisline po segrevanju; MK_{PRED} : delež maščobne kisline pred segrevanjem)	77
Slika 40:	Vsebnost α -tokoferola v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)	77
Slika 41:	Vsebnosti klorofilnih pigmentov in karotenoidov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred osemurnim segrevanjem	78
Slika 42:	Vsebnost klorofilnih pigmentov, določenih z dvema različnima metodama, in karotenoidov v vzorcu ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' v odvisnosti od časa in temperature segrevanja	79
Slika 43:	Vsebnost klorofilnih pigmentov, določenih z dvema različnima metodama, in karotenoidov v vzorcu ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Leccino' v odvisnosti od časa in temperature segrevanja	79
Slika 44:	Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred osemurnim segrevanjem	80
Slika 45:	Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' pred segrevanjem ter po osmih urah segrevanja pri 100 °C in pri 180 °C	81

Slika 46:	Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Leccino' pred segrevanjem ter po osmih urah segrevanja pri 100 °C in pri 180 °C	82
Slika 47:	Vsebnost skupnih biofenolov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino', v odvisnosti od časa in temperature segrevanja. (FC: metoda FC; HPLC: metoda HPLC)	83
Slika 48:	Antioksidacijska učinkovitost vzorcev ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino')	84
Slika 49:	Kislost v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	85
Slika 50:	Peroksidno število v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	86
Slika 51:	<i>p</i> -anisidinsko število v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	86
Slika 52:	Totoks število v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	87
Slika 53:	Vrednosti K_{232} , K_{270} in ΔK v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	88
Slika 54:	Razmerje med vsebnostjo posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C (MK _{PO} : ut. % maščobne kisline po segrevanju; MK _{PRED} – ut. % maščobne kisline pred segrevanjem; m.k.: maščobne kisline)	90
Slika 55:	Vsebnosti α -tokoferola v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	91
Slika 56:	Vsebnosti klorofilnih pigmentov in karotenoidov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	92
Slika 57:	Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred stournim segrevanjem	93
Slika 58:	Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	94
Slika 59:	Skupni biofenoli, določeni z metodo FC in z metodo HPLC, v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	95
Slika 60:	Antioksidacijska učinkovitost v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	96
Slika 61:	Oksidacijska stabilnost v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C	96

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Ugotavljanje vpliva skladiščenja na kemijske parametre v ekstra deviškem oljčnem olju. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva.
- Priloga B: Proučevanje sprememb kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju med segrevanjem v Rancimatu. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva.
- Priloga C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.
- Priloga C2: Proučevanje vpliva temperature in časa segrevanja na kemijske parametre v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega.
- Priloga D1: Spremembe proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju po stournem segrevanju pri 180 °C
- Priloga D2: Vpliv stournega segrevanja pri 180 °C na kemijske parametre v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na kemijske parametre.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ali α,α -difenil- β -pikrilhidrazil
I ₅₀	antioksidacijska učinkovitost
DML-Agl-dA	dialdehidna oblika dekarboksimetil ligstrozid aglikona
DMO-Agl-dA	dialdehidna oblika dekarboksimetil oleuropein aglikona
L-Agl-dA	dialdehidna oblika ligstrozid aglikona
O-Agl-dA	dialdehidna oblika oleuropein aglikona
EDOO	ekstra deviško oljčno olje
EVOO	extra virgin olive oil
OOL	gliceril dioleat-linoleat
OLL	gliceril oleat-dilinoleat
LLL	gliceril trilinoleat
OOO	gliceril trioleat
TyrOH	hidroksitirozol
IB	'Istrska belica'
L	'Leccino'
L-Agl	ligstrozid aglikon
mk	maščobne kisline
COI	Consejo Oleícola Internacional = Mednarodni svet za oljkarstvo
Mv	mešan vzorec
AOM	metoda aktivnega kiskika, 'Active Oxygen Method'
MM	metoda za določevanje klorofilnih pigmentov (Mínguez-Mosquera in sod., 1991)
P	metoda za določevanje klorofilnih pigmentov (Pokorny in sod., 1995)
metoda FC	metoda za določevanje skupnih biofenolov (Gutfinger, 1981)
(DML-Agl-dA)ox	oksidirana dialdehidna oblika dekarboksimetilligstrozid aglikona
(DMO-Agl-dA)ox	oksidirana dialdehidna oblika dekarboksimetiloleuropein aglikona
O-Agl	oleuropein aglikon
ARP	protiradikalska moč, 'antiradical power value'
sk -20 °C	skladiščenje pri -20 °C
sk 8 °C	skladiščenje pri 8 °C
S	sveži vzorci
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
Tyr	tirosol
H	vzorci, skladiščeni eno leto v hladilniku pri 8 °C
Z	vzorci, skladiščeni eno leto v zmrzovalniku pri -20 °C

1 UVOD

Oljčno olje je kot pomemben sestavni del mediteranske diete predmet številnih raziskav na področjih agronomije, tehnologije pridelave olja iz oljk, živilske kemije, prehrane in medicine.

Oljčno olje ni cenjeno le zaradi svojih gastronomskih odlik, pač pa so ga že v antičnih časih uporabljali tudi v medicini (Vidrih-Perko, 2002). Danes znanje naših predhodnikov potrjujejo številne epidemiološke, klinične in eksperimentalne študije. Uživanje oljčnega olja pozitivno vpliva na nivo HDL holesterola v krvi, znižuje količino lipidov v serumu in zmanjšuje oksidativni stres (Covas in sod., 2006). Poleg tega biofenoli iz oljčnega olja preprečujejo oksidacijo LDL holesterola (de la Torre-Carbot in sod., 2007).

Eden od razlogov za pozitivni vpliv oljčnega olja na zdravje je uravnotežena maščobnokislinska sestava. Vsebuje malo nasičenih maščobnih kislin, veliko oleinske kisline, ki ima eno dvojno vez, in majhno, vendar zadostno količino esencialnih maščobnih kislin z več dvojnimi vezmi. Nasičene maščobne kisline so zdravju škodljive, ker zmanjšujejo pretočnost bioloških membran (Viola, 1997). Za razliko od drugih olj z veliko vsebnostjo enkrat nenasičenih maščobnih kislin, na primer sončničnega olja s povečano vsebnostjo oleinske kisline, odlikujejo oljčno olje tudi prisotni biofenoli, ki so učinkoviti antioksidanti.

Nenasičene maščobne kisline so podvržene oksidacijskim procesom, pri katerih nastajajo med drugim tudi zdravju škodljivi prosti radikali. Hitrost oksidacije se večja s številom dvojnih vezi v maščobni kislini (Mateos in sod., 2005). Zato naj bi večino zaužitih maščob predstavljale maščobe z veliko vsebnostjo enkrat nenasičene oleinske kisline, z majhnim deležem nasičenih maščobnih kislin in zadostno količino esencialnih maščobnih kislin. Uživanje oksidiranih maščob je vzrok številnih patoloških stanj (Deiana in sod., 2002). Izbira najprimernejšega olja za cvrenje je težka, saj moramo upoštevati oksidacijsko stabilnost in prehransko vrednost, pomemben dejavnik pa je tudi cena olja.

1.1 NAMEN DELA

Raziskava je obsegala dva sklopa proučevanja ekstra deviškega oljčnega olja (EDOO) Slovenske Istre.

V prvem sklopu smo ugotavljali spremembe nekaterih parametrov v oljčnem olju med skladiščenjem pri različnih pogojih. Laboratorij za preskušanje oljčnega olja, v katerem je potekala naša raziskava, je od leta 2004 akreditiran za področje analitike oljčnega olja. Kakovost rezultatov preskusov zagotavljamo na različne načine: z uporabo certificiranih referenčnih materialov, s sodelovanjem v mednarodnih medlaboratorijskih primerjavah in z uporabo referenčnih vzorcev. Ker na svetovnem trgu ne obstaja možnost nabave certificiranih referenčnih vzorcev oljčnega olja, si referenčni vzorec pripravljamo sami. Ob tem pa naletimo na težavo, saj se nekateri parametri, zlasti tisti, ki so povezani z oksidacijo olja, sčasoma spreminjajo. Referenčni vzorec zato skladiščimo v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, da bi čimbolj upočasnili neizogibne spremembe v vzorcu. Ob pregledu literature nismo našli nobene študije, ki bi odgovorila na vprašanje, kakšni pogoji skladiščenja oljčnega olja bi zagotovili stabilnost vzorca skozi enoletno časovno obdobje. Zato je bil eden od ciljev našega dela ugotoviti, ali je skladiščenje oljčnega olja v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ustrezno in ali zagotavlja, da se v tem času izbrani parametri ne spremenijo. V raziskavo smo vključili tudi skladiščenje v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Drug sklop raziskave je prav tako povezan z oksidacijskimi procesi v oljčnem olju. Raziskave oljčnega olja Slovenske Istre so začeli sodelavci laboratorija LABS leta 1992. Od takrat dalje nastaja baza podatkov, ki se z leti dopolnjuje in širi število proučevanih parametrov. Doslej še ni bila opravljena nobena raziskava o obstojnosti oljčnega olja Slovenske Istre pri visokih temperaturah. Ugotoviti smo želeli, kakšne spremembe potekajo v oljčnem olju med določevanjem oksidacijske stabilnosti v aparaturi Rancimat. Spremljali smo tudi spremembe v oljčnem olju med segrevanjem pri temperaturah cvrenja ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$) in kuhanja ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$). V poskus smo za primerjavo vključili tudi sončnično olje, ki se pogosto uporablja v slovenskih gospodinjstvih.

V obeh sklopih smo v raziskavo vključili oljčno olje, ki smo ga dobili neposredno od pridelovalcev. Tako smo zagotovili pristnost vzorcev tako s stališča geografskega izvora olja kot s stališča sortne sestave. V raziskavo smo namreč vključili dve najbolj zastopani sorti v Slovenski Istri, 'Istrsko belico' in 'Leccino'. O razlikah med olji obeh sort je že precej znanega (Butinar in sod., 1999a, 1999b, 2004, 2006; Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000), nas pa so zanimale tudi razlike, ki bi se morebiti pokazale med skladiščenjem olja pri nizkih temperaturah in po segrevanju olja.

Zadnji, a ne najmanj pomemben cilj naloge je bil primerjati rezultate poskusov s podatki iz mednarodnih objav in tako oljčno olje Slovenske Istre umestiti v svetovni prostor.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred izvajanjem raziskave smo postavili naslednje delovne hipoteze:

- EDOO sorte 'Istrska belica' vsebujejo manj tokofereolov kot EDOO sorte 'Leccino'.
- EDOO sorte 'Istrska belica' vsebujejo več biofenolov kot EDOO sorte 'Leccino'.
- EDOO sorte 'Istrska belica' so oksidacijsko stabilnejša kot EDOO sorte 'Leccino'.
- Vsebnost antioksidantov se bo med shranjevanjem in med segrevanjem olja zmanjšala. Hitrost zmanjševanja vsebnosti posameznih antioksidantov ne bo enaka.
- Maščobnokislinska sestava se med shranjevanjem olja ne bo bistveno spremenila, saj bodo maščobe v roku trajanja eksperimenta še vedno zaščitene z antioksidanti.
- Maščobnokislinska sestava se bo med segrevanjem olja spremenila. Delež nasičenih maščobnih kislin se bo povečal, delež nenasičenih maščobnih kislin pa zmanjšal. Zmanjšanje deleža nenasičene maščobne kisline bo tem večje, čim bolj nenasičena je kislina.
- Pri shranjevanju in segrevanju olja se bodo povečali p-anisidinsko število, totoks število ter specifična absorpcija pri 232 in 270 nm.
- Oksidacijska stabilnost olj se bo med shranjevanjem in segrevanjem olja zmanjšala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SESTAVA OLJČNEGA OLJA

Za razliko od drugih rastlinskih olj je deviško oljčno olje pravzaprav sok oljke, saj ga pridobivamo izključno z mehanskimi postopki pri nizki temperaturi. Iz zmlete oljčne drozge se na različne mehanske načine izceja oljčni mošt in kot stranski proizvod ostanejo tropine. Iz oljčnega mošta izločijo olje s centrifugiranjem. Deviško oljčno olje, ki ni primerno za prehrano zaradi slabe kakovosti plodov, neprimerne skladiščenja plodov in olja ali pretečenega roka tajanja, se s postopkom rafinacije prečisti. Tako rafinirano olje zgubi skoraj vse biološko pomembne snovi, ki so bile v plodu, zato po kakovosti ni primerljivo z dobrim ekstra deviškim oljčnim oljem (Bučar-Miklavčič in sod., 2006).

Ekstra deviško oljčno olje za razliko od rafiniranega olja ohrani poleg triacilglicerolov še številne druge spojine, ki pomembno prispevajo k značilnostim oljčnega olja, saj vplivajo na stabilnost, prehransko vrednost in senzorične značilnosti. Te spojine so proste maščobne kisline, diacilgliceroli, monoacilgliceroli, fosfatidi, voski, etilni, metilni in sterolni estri, ogljikovodiki, steroli, triterpenski dialkoholi, tokoferoli, fenoli, klorofilni pigmenti, karotenoidi in alifatski alkoholi (Kiritsakis in sod., 1998; Boskou, 1996; Ranalli in sod., 2002). V nadaljevanju podrobneje opisujemo le tiste sestavine olja, ki so povezane z oksidacijo oljčnega olja in so bile tudi predmet raziskav tega doktorskega dela.

2.1.1 Maščobnokislinska sestava oljčnega olja

Na maščobnokislinsko sestavo vplivajo različni dejavniki, kot so: sorta oljk, letina in pedoklimatske razmere (Butinar in sod., 2004; Zunin in sod., 2001; D'Imperio in sod., 2007). V preglednici 1 je navedena maščobnokislinska sestava oljčnega olja. Podatki Butinarja in sod. (2004) so rezultat spremljanja maščobnokislinske sestave v 340 vzorcih oljčnega olja Slovenske Istre v desetletnem obdobju od 1992 do 2002. Ti podatki prikazujejo sestavo oljčnega olja, ki je pridobljeno na območju Slovenske Istre iz sort, ki tu uspevajo. Mednarodni svet za oljkarstvo v tržnem standardu za oljčno olje in olje iz tropin (COI, 2006) navaja širša območja za posamezne maščobne kisline kot Butinar in sod. (2004), saj njihovi podatki temeljijo na rezultatih določevanja maščobnokislinske sestave v bolj raznolikih vzorcih oljčnega olja (zajemajo širše geografsko območje z različnimi pedoklimatskimi razmerami in obširnejši nabor sort).

Preglednica 1: Maščobnokislinska sestava v oljčnem olju (COI, 2006; Butinar in sod. 2004)
Table 1: Fatty acid composition of olive oil (COI, 2006; Butinar et al. 2004)

Maščobna kislina	Delež maščobne kisline (ut. %)	
	COI (2006)	Butinar in sod. (2004) \bar{x}
miristinska kislina (C 14:0)	$\leq 0,05$	0,01
palmitinska kislina (C 16:0)	7,5 - 20,0	12,64
palmitoleinska (C 16:1 ω 7)	0,3 - 3,5	1,01
margarinska kislina (C17:0)	$\leq 0,3$	0,06
heptadecenojska kislina (C17:1)	$\leq 0,3$	0,10
stearinska kislina (C 18:0)	0,5 - 5,0	2,56
oleinska kislina (C 18:1 ω 9)	55,0 - 83,0	76,53
linolna kislina (C 18:2 ω 6)	3,5 - 21,0	5,72
linolenska kislina (C 18:3 ω 3)	$\leq 1,0$	0,62
arašidova kislina (C 20:0)	$\leq 0,6$	0,42
eikozenojska kislina (C 20:1)	$\leq 0,4$	0,32
behenska kislina (C 22 :0)	$\leq 0,2$	0,12
lignocerinska kislina (C 24:0)	$\leq 0,2$	0,02

Maščobnokislinska sestava je pomembna tako s prehranskega kot s tehnološkega vidika, saj je od nje v veliki meri odvisna hitrost oksidacije triacilglicerolov tako v olju samem med skladiščenjem kot v telesu po zaužitju.

2.1.2 Tokoferoli v oljčnem olju

Tokoferoli so pomembne neumiljive snovi oljčnega olja. V oljčnem olju prevladuje α -tokoferol, le približno 5 % vseh tokoferolov predstavljata β - in γ -tokoferol, medtem ko se δ -tokoferol pojavlja le v sledovih. Tokoferoli se v olju nahajajo le v prosti, nezaestreni obliki (Boskou, 1996).

Tokoferoli so učinkoviti antioksidanti. Mehanizem delovanja je donacija vodikovega atoma s fenolne skupine prostim radikalom, ki nastajajo pri oksidaciji lipidov. Potekajo pa lahko tudi stranske reakcije, zaradi katerih lahko tokoferoli delujejo tudi kot prooksidanti.

Antioksidacijska učinkovitost α -tokoferola je največja pri nizkih koncentracijah (pod 100 ppm) (Zuta in sod., 2007).

2.1.3 Klorofilni pigmenti v oljčnem olju

Profil klorofilnih pigmentov in karotenoidov v oljčnem olju sestavljajo izključno pigmenti, ki so bili prisotni že v plodovih, in njihovi derivati, ki nastanejo med mletjem in mesenjem plodov (Gallardo-Guerrero in sod., 2005). Količina klorofilnih pigmentov je odvisna od genskih faktorjev, zrelosti plodov, ekstrakcijskega postopka in pogojev shranjevanja. V oljčnem in drugih rastlinskih oljih prevladuje feofitin *a* (Pheo *a*) (Psomiadou in Tsimidou, 2001). Poleg tega oljčno olje vsebuje tudi feofitin *b* ter klorofil *a* in klorofil *b* (Mínguez–Mosquera in sod., 1990). V sledovih zasledimo tudi intermediate katabolizma klorofila in njihove derivate (Gallardo-Guerrero in sod., 2005).

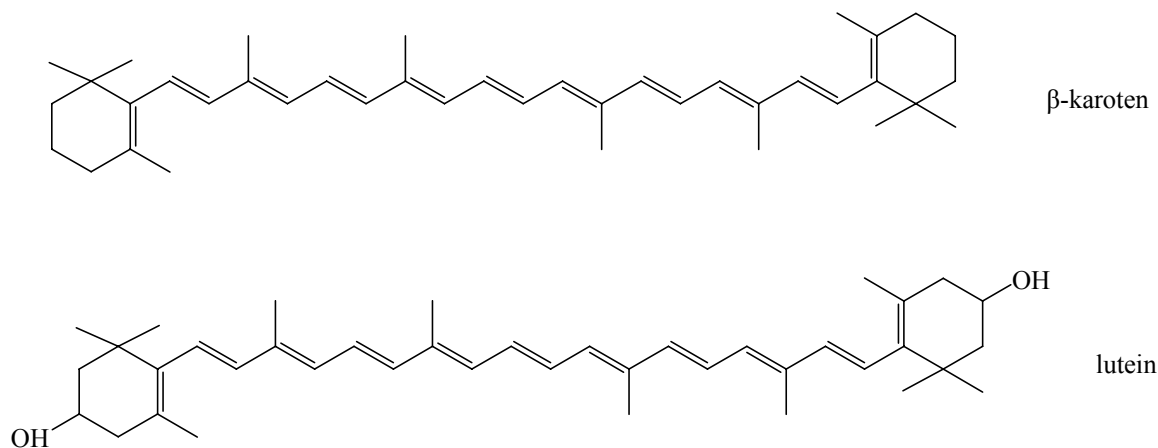
Mnenja o vlogi klorofilnih pigmentov pri oksidaciji olja niso enotna, čemur verjetno botrujejo različni eksperimentalni pogoji posameznih študij. Psomiadou in Tsimidou (2002a) sta ugotovili, da feofitin *a* deluje kot antioksidant, medtem ko sta Rahmani in Csallany (1998) poročala o močnem prooksidacijskem učinku iste spojine. Klorofili so fotosenzitivne spojine, ki prenašajo svetlobno energijo v lipidni substrat in tako pospešujejo fotooksidacijo (Hrncirk in Fritsche, 2005). Pri fotooksidaciji olja v prisotnosti klorofilov nastaja zelo reaktiven singletni kisik, ki reagira z nenasičenimi maščobnimi kislinami, pri čemer nastanejo hidroperoksidi. Njihova razgradnja sproži radikalsko reakcijo – oksidacijo (Caponio in sod., 2005).

Klorofilna barvila se pod vplivom svetlobe in povišane temperature razgrajujejo (Gutiérrez in Fernández, 2002; Psomiadou in Tsimidou, 2002a, 2002b). Razgradna reakcija feofitina *a* je reakcija prvega reda (Psomiadou in Tsimidou, 2002b).

2.1.4 Karotenoidi v oljčnem olju

Karotenoidi so intenzivno obarvane v lipidih topne spojine. Delimo jih na karotene, ki so ogljikovodiki, in ksantofile, ki imajo na enem ali obeh koncih molekule hidroksilno in/ali karbonilno skupino. Polienska struktura in druge strukturne lastnosti definirajo lastnosti spojin (npr. redoks potencial) (Scotter in Castle, 2004; El-Agamey in sod., 2004).

Skupna količina karotenoidov v oljčnem olju je od nič do nekaj mg/kg (Psomiadou in Tsimidou, 2001) ali celo do 100 mg/kg (Cichelli in Pertesana, 2004). V karotenoidni frakciji pigmentov v oljčnem olju prevladujeta β -karoten in lutein, ki je derivat α -karotena z dvema različnima iononskima obročema: β - in ϵ - obroč (Subagio in Morita, 2003), določili pa so tudi manjše količine drugih karotenov in ksantofilov: violaksantin, luteoksantin, auroksantin, anteraksantin, mutatoksanin, neoksantin in neokrom (Giuffrida in sod., 2006; Psomiadou in Tsimidou, 2001; Roca in sod., 2003; Mínguez-Mosquera in Gandul-Rojas, 1994; Gallardo-Guerrero in sod., 2005). V olju prevladujejo *trans*-izomeri karotenoidov. V manjših količinah so prisotni tudi *cis*-izomeri, ki pa nimajo enake vitaminske aktivnosti kot *trans*-izomeri.



Slika 1: Struktura β -karotena in luteina (Miller in sod., 1996)

Figure 1: Structure of β -carotene and lutein (Miller et al., 1996)

Sestava karotenoidov v oljčnem olju je odvisna od sorte (Cichelli in Pertesana, 2004), zrelosti plodov (Gandul-Rojas in sod., 2000; Gutiérrez in sod., 1999; Mínguez-Mosquera in sod., 1991) in tehnologije predelave (Giuffrida in sod., 2006; Cichelli in Pertesana, 2004; Luaces in sod., 2005).

Karotenoidi lahko delujejo kot antioksidanti (Fakourelis in sod., 1987) ali prooksidanti (Psomiadou in Tsimidou, 2002b). Na delovanje vplivajo eksperimentalni pogoji in prisotnost tokoferolov. Delovanje karotenoidov v procesih oksidacije je zelo kompleksno, saj se tudi sami lahko oksidirajo (Psomiadou in Tsimidou, 2002a).

Antioksidacijsko delovanje karotenoidov lahko pojasnimo na različne načine. Najverjetneje karotenoidi delujejo kot dušilci (quencher) singletnega dušika. Glavni mehanizem dušenja prostih radikalov je prenos energije elektrona. Možno pa je tudi kemijsko dušenje singletnega kisika, pri katerem pa karotenoidi reagirajo s kisikom, zaradi

česar se njihova vsebnost zmanjša. Seveda je zato bolje, da fizikalno dušenje poteka v večji meri kot kemijsko (Edge in sod., 1997).

Radikalni mehanizem antioksidacijskega delovanja karotenoidov še ni dovolj raziskan (Hrncirik in Fritsche, 2005; Steenson in Min, 2000). Zdi se, da imajo karotenoidi pri avtooksidaciji nevtralnno (Aparicio in sod., 1999) ali pa celo negativno vlogo zaradi oksidiranih produktov, ki lahko reagirajo z lipidnim substratom in tako pospešujejo oksidacijo (Subagio in Morita, 2001; Steenson in Min, 2000).

Fakourelis in sod. (1987) pa so predpostavili še en način delovanja β -karotena, ki naj bi v olju deloval kot svetlobni filter in ga ščitil pred oksidacijo.

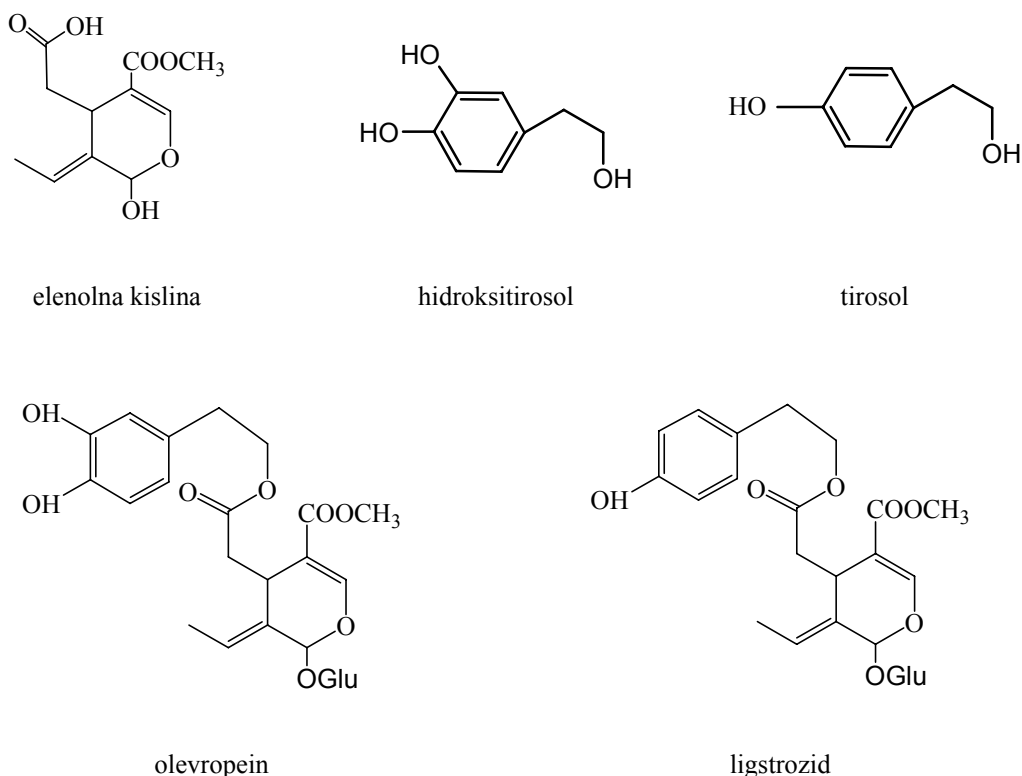
Poročajo o sinergijskem delovanju β -karotena in α -tokoferola (Psomiadou in Tsimidou, 2002b; Edge in sod., 1997). Učinek sinergije verjetno lahko razložimo s tem, da α -tokoferol ščiti β -karoten pred avtooksidacijo (Psomiadou in Tsimidou, 2002b), možna pa je tudi obratna razlaga (Edge in sod., 1997; Schroeder in sod., 2006). Sinergijski učinek tokoferolov in β -karotena oziroma likopena se manjša z naraščajočo vsebnostjo karotenoida, pri vsebnosti karotenoida 1000 ppm pa je učinek celo antagonističen (Schroeder in sod., 2006).

2.1.5 Biofenoli v oljčnem olju

Fenoli so spojine, ki imajo na aromatski obroč vezano hidroksilno skupino. Z izrazom polifenoli označujemo veliko skupino spojin rastlinskega izvora, ki pa glede na zgornjo definicijo niso vse fenoli (Croteau in sod., 2000). V isto skupino jih uvrščamo na podlagi njihovega biosinteznega izvora in funkcije v rastlini. Izraz polifenoli se danes vse pogosteje nadomešča z drugimi izrazi, kot so rastlinske fenolne spojine, rastlinski fenoli, fenolne spojine in fenoli, uveljavlja pa se tudi izraz biofenoli, ki poudarja njihov biološki izvor.

Oljka spada v rod *Olea* družine Oleaceae. Člane družine Oleaceae lahko okarakteriziramo ne le po morfoloških značilnostih, temveč tudi biokemijsko po vsebnosti sekoiridoidov (Ryan in sod., 2002). Sekoiridoidi so snovi, podobne iridoidom, ti pa imajo šestčlenski heterociklični obroč, povezan s ciklopentanskim obročem. Sekoiridoidi z eksociklično dvojno vezjo na položaju 8,9 so oleozidi. Najdemo jih le v družini Oleaceae. Oleozidi sami niso fenoli, spojine pa lahko dobijo fenolno skupino z zaestrenjem s fenolnimi snovmi, ki nastajajo po mevalonatni poti. Primer sta najpomembnejša oleozida v oljkah oleuropein in ligstrozid, ki sta estra elenolne kisline s hidroksitirosolom oziroma tirosolom. Skupaj s

fenoli se v vzorcih te družine ekstrahirajo tudi nekateri nefenolni sekoiridoidi ter verbaskozid in podobne fenolne spojine. Frakcija vsebuje tudi enostavne spojine, kot so tirozol, hidroksitirozol, ferulna in galna kislina. Biofenole najdemo v vseh delih rastline, njihova narava in koncentracija pa je v različnih tkivih različna. V oljčnem olju so doslej identificirali najmanj 20 različnih biofenolov (Ryan in sod., 2002).



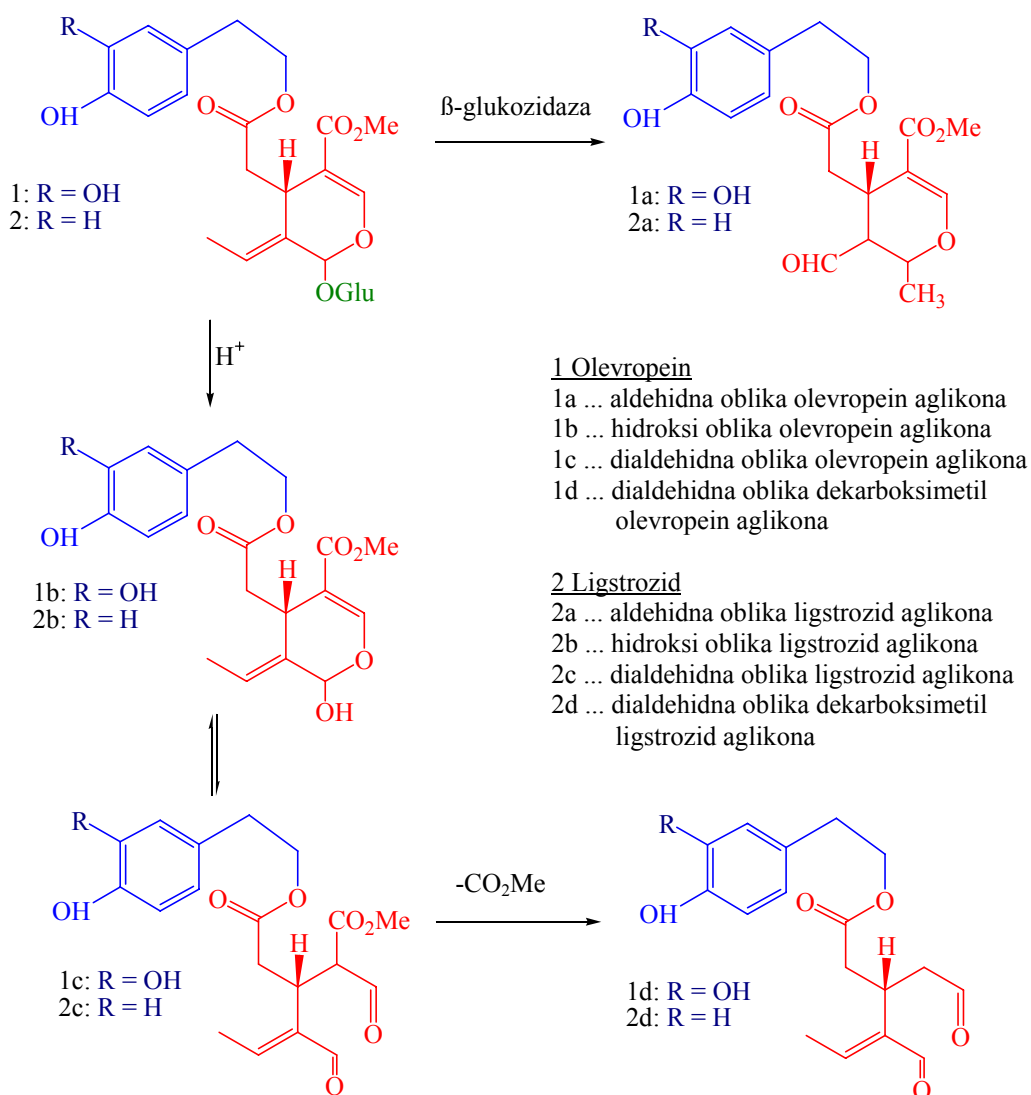
Slika 2: Oleuropein, ligstrozid in njuni sestavni deli (Glu: glukoza) (Ryan in sod., 2002)

Figure 2: Oleuropein, ligstroside, and their constituents (Glu: glucose) (Ryan et al., 2002)

Glavni komponenti sekoiridoidnih glukozidov v oljki sta oleuropein in ligstrozid (slika 2). Molekulo ligstrozida sestavljajo tri komponente: na elenolno kislino (sekoiridoid) sta vezana tirozol (fenol) in glukoza. Sestava oleuropeina je analogna, fenolni del molekule pa v tem primeru predstavlja ortodifenol hidroksitirozol (Ryan in sod., 2002).

Znano je, da se vsebnost oleuropeina in ligstrozida v poškodovanih plodovih ali med predelavo oljk v olje zmanjšuje. Rovellini in Cortesi (2002) navajata dve poti razgradnje (slika 3). Pri prvi poti β -glukozidaza katalizira odcepitev glukoze, pri čemer iz oleuropeina nastane aldehidna oblika oleuropein aglikona (spojina 1a na sliki 3). Prva stopnja druge razpadne poti je hidroliza. Z odcepitvijo glukoze nastane hidroksi oblika oleuropein aglikona (spojina 1b). Elenolna kislina ima v obeh navedenih aglikonih zaprt obroč.

Hidroksi-etrška vez v zaprti hidroksi obliki aglikona je nestabilna, zato se obroč elenolne kisline odpre. Nastane enol, ki izomerizira v odprto dialdehidno strukturo (O-Agl-dA, spojina 1c). Sledi dekarboksilacija, pri čemer nastane dialdehidna oblika dekarboksimetil olevropein aglikona (DMO-Agl-dA, spojina 1d). Na enak način razpada tudi ligstrozid (derivati ligstrozida so spojine 2a, 2b, 2c in 2d na sliki 3). Tako kot olevropein in ligstrozid tudi produkti njune oksidacije absorbirajo UV-svetlobo pri 277 in 280 nm, iz česar lahko sklepamo, da oksidacija ne poteka na fenolnem, ampak na elenolnem delu molekule.



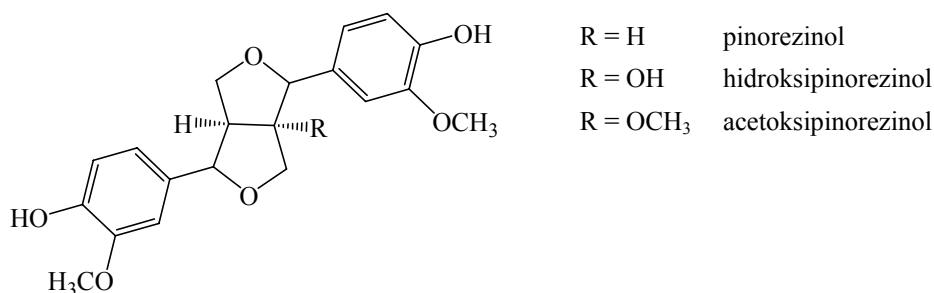
Slika 3: Razgradnja olevropeina in ligstrozida (Rovellini in Cortesi, 2002)

Figure 3: Olevropein and ligstrosides decomposition (Rovellini and Cortesi, 2002)

V končni fazi razgradnje se iz molekule odcepi hidroksitirozol oziroma tirozol. S spektrofotometrijsko metodo lahko v olju, v katerem sta oleuropein in ligstrozid že dosegla konec razgradne poti, še vedno določimo relativno veliko vsebnost skupnih biofenolov, vendar je takšno olje že izgubilo svojo svežino, sadežno in harmonično aromo. Biofenoli mu ne nudijo več zaščite pred oksidacijo v tolikšni meri, kot v svežem olju (Bandelj Mavsar in sod., 2005).

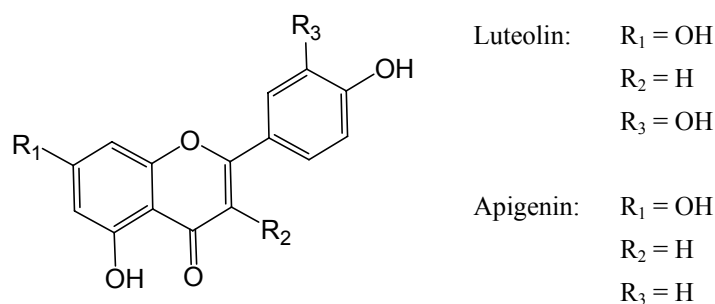
Poleg sekoiridoidov so v oljčnem olju v manjših količinah zastopani tudi:

- lignani: pinorezinol, 1-acetoksipinorezinol in 1-hidroksipinorezinol (Brenes in sod., 2000; Owen in sod., 2000),
- flavonoidi: apigenin in luteolin (Brenes in sod., 1999) in
- enostavni biofenoli: cimetna kislina, ferulna kislina, galna kislina, kavna kislina (Rovellini in Cortesi, 2002).



Slika 4: Struktura lignanov v oljčnem olju (Mulinaci in sod., 2006)

Figure 4: Structure of lignans from olive oil (Mulinaci et al., 2006)



Slika 5: Struktura flavonoidov v oljčnem olju (Bouaziz in sod., 2005)

Figure 5: Structure of flavonoids from olive oil (Bouaziz et al., 2005)

Naravni antioksidanti lahko delujejo na različne načine. Preprečujejo prvo stopnjo verižne reakcije z odstranjevanjem iniciatorskih radikalov, kelatno vežejo kovine, zmanjšujejo lokalno koncentracijo kisika ali pa razgrajujejo perokside (del Carlo in sod., 2004). Najpomembnejši način antioksidacijskega delovanja biofenolov je verjetno odstranjevanje prostih radikalov (scavenging) in s tem prekinitev verižne radikalne reakcije, oksidacijo pa lahko preprečujejo tudi s kelatno vezavo kovinskih ionov, ki katalizirajo oksidacijo (Briante in sod., 2003).

2.1.6 Hlapne in aromatične sestavine v oljčnem olju

Identificiranih je bilo že preko 100 hlapnih sestavin oljčnega olja, med njimi ogljikovodiki, alkoholi, aldehidi, estri, fenoli in njihovi derivati, oksidirani terpeni in derivati furana. Nekatere hlapne spojine nimajo vonja, druge pa prispevajo k značilni aromi oljčnega olja (Boskou, 1996). Hlapne snovi nastajajo pretežno kot produkti oksidacije maščobnih kislin. Splošno velja, da hlapne snovi, ki nastajajo po lipoksigenazni poti, katalizirani z endogenimi encimi, prispevajo k pozitivnim senzoričnim značilnostim. Hlapne snovi, ki nastajajo pri kemijski oksidaciji maščobnih kislin, ali snovi, ki nastajajo zaradi delovanja eksogenih encimov mikrobiološkega izvora, pa so vir senzoričnih napak (Kalua in sod., 2007).

2.1.7 Skvalen v oljčnem olju

Vpliv skvalena na oksidacijo oljčnega olja je odvisen od koncentracije, in sicer je skvalen bolj učinkovit pri večjih koncentracijah. Zaščitni učinek skvalena se pokaže šele, ko v olju že nekoliko naraste koncentracija hidroperoksidov. Skvalen ni odstranjevalec prostih radikalov, kar so dokazali z DPPH. Skvalen je dokaj odporen na napade radikalov LOO^{\bullet} in torej ne prekinja oksidacijske verige. V verigi tridesetih ogljikovih atomov ima šest izoliranih dvojnih vezi in tekmuje za oksidacijo s triacilgliceroli. Pri oksidaciji skvalena nastanejo dokaj stabilni ciklični hidroperoksidi, ki ne sodelujejo zlahka v propagaciji reakcije (Psomiadou in Tsimidou, 1999).

2.2 METODE ZA DOLOČEVANJE NEKATERIH SESTAVIN IN ZNAČILNOSTI OLJČNEGA OLJA

2.2.1 Ugotavljanje stopnje oksidiranosti oljčnega olja

Najpomembnejši vzrok za kvar masti in olj je oksidacija. Primarni produkti oksidacije lipidov so hidroperoksidi, ki so zelo nestabilni. Iz njih nastajajo sekundarni produkti oksidacije, kot so ogljikovodiki, alkoholi, ketoni in aldehidi, ti pa se lahko oksidirajo še naprej do karboksilnih kislin.

Kvantitativna določitev stopnje oksidacije je zelo težavna. Klasične metode za proučevanje oksidacije se nanašajo le na eno skupino spojin, ki so prisotne v kompleksni mešanici, ki nastane pri oksidaciji. Te metode nam torej dajejo omejene informacije o procesu oksidacije (Guillén in Ruiz, 2006). Metoda za določevanje peroksidnega števila je uporabna za proučevanje zgodnjih stopenj oksidacije, saj meri količino primarnih produktov oksidacije. Vedeti pa moramo, da se peroksidno število z nadaljnjim potekom oksidacije zmanjša, saj hidroperoksidi pri povišani temperaturi hitro razpadajo.

Določevanje sekundarnih produktov oksidacije maščobnih kislin s tiobarbiturno kislino za oljčno olje ni uporabno, saj meri le količino sekundarnih produktov oksidacije tistih maščobnih kislin, ki imajo v molekuli najmanj tri dvojne vezi, takšnih pa v oljčnem olju skorajda ni (van Loon in sod., 2006). Napredovanje oksidacije lako merimo tudi s *p*-anisidinskim testom (Labrinea in sod., 2001). S tem testom ocenimo vsebnost aldehydov, zlasti 2-alkenalov. Ta metoda je primerna zlasti za določevanje kakovosti starih olj z nizkim peroksidnim številom, kot so na primer olja za cvrenje (Allen in Hamilton, 1994).

Totoks število je vsota peroksidnega in *p*-anisidinskega števila. Ker zajema tako primarne kot sekundarne produkte oksidacije, nam omogoča bolj popolno oceno oksidiranosti olja (Allen in Hamilton, 1994).

Določevanje specifične absorpcije pri 232 nm (K_{232}) in 270 nm (K_{270}) je enostavna, hitra in zelo uporabna metoda za oceno oksidiranosti oljčnega olja, ki jo predpisuje tudi Uredba Komisije (EGS) št. 2568/91 (Uredba Komisije..., 1991). Če so vrednosti parametrov K_{232} in K_{270} visoke, lahko sklepamo, da je olje že precej oksidirano, ali pa mu je primešano semensko olje, ki vsebuje večji delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin.

K_{232} je merilo za količino primarnih oksidacijskih produktov – konjugiranih dienov, ki nastanejo s premikom ene od dvojnih vezi. Pri oksidaciji linolenske kisline pa nastajajo

konjugirani trieni, ki imajo absorpcijski maksimum pri 270 nm. Absorpcijo pri 270 nm povečujejo tudi sekundarni produkti oksidacije, kot so: aldehidi, ketoni in alkoholi (Koprivnjak, 2006; Maskan in Bağcı, 2003).

Obstajajo tudi sodobnejše instrumentalne metode za določevanje oksidiranosti olja, ki pa še niso v splošni uporabi. Cosio in sod. (2007) so oksidiranost olja ugotavljali s pomočjo elektronskega nosu.

2.2.2 Določevanje tokoferolov v oljčnem olju

Tokoferole običajno določamo s HPLC na normalni fazi (na primer metoda OSIST prEN ISO 9936: 2004), saj reverzna faza ne omogoča ločitve β -tokoferola in γ -tokoferola. Prednosti določevanja tokoferolov z reverzno fazo pa so: boljša stabilnost kolone, ponovljivost retencijskih časov in hitrejše uravnoteženje sistema (Gimeno in sod., 2000).

Možno je tudi sočasno določevanje tokoferolov z drugimi komponentami oljčnega olja (Psomiadou in Tsimidou, 1998; Gimeno in sod., 2000).

2.2.3 Določevanje pigmentov v oljčnem olju

Skupne karotenoide in skupne klorofilne pigmente določujemo s spektrofotometrijskimi metodami, ki so hitre, enostavne in poceni.

Spekter ekstrakta karotenoidnih pigmentov iz oljčnega olja ima obliko prevladujočega karotenoida luteina, z dvema absorpcijskima maksimumoma med 400 in 500 nm. Za določevanje karotenoidov so izbrali valovno dolžino drugega luteinovega maksimuma (472 nm), saj pri tej valovni dolžini ni interferenc prevladujočega klorofilnega pigmenta feofitina *a*. Klorofilne pigmente pa določamo pri 670 nm. Količino karotenoidov in klorofilnih pigmentov se izračuna s pomočjo ekstinkcijskih koeficientov za lutein in feofitin *a* (Mínguez-Mosquera in sod., 1991). Lahko pa se meri absorbanca pri 449 nm in se karotenoide kvantificira s pomočjo umeritvene krivulje, pripravljene z β -karotenom (Caponio in sod., 2005; Giuffrida in sod., 2006). Zlasti raziskovalci iz španskega okolja se najpogosteje odločajo za delo po metodi Mínguez-Mosquera in sod. (1991). Pokorny in sod. (1995) pa so objavili statistične podatke za nekoliko drugačno metodo za določevanje klorofilnih pigmentov.

Za ločitev in določitev posameznih karotenoidov in klorofilnih pigmentov pa se uporabljajo kromatografske metode. Starejše kromatografske metode temeljijo na kolonski ali tankoplastni kromatografiji. Uvedba metod HPLC je prinesla številne prednosti. Metode so enostavne, hitre, poceni (to je sicer odvisno od detekcije), občutljive, specifične in natančne (Su in sod., 2002). Uporaba metod HPLC omogoča istočasno določitev klorofilov in karotenoidov, metode so uporabne za različna rastlinska olja (Gandul-Rojas in sod., 2000). Nekatere metode HPLC omogočajo istočasno določanje pigmentov in tokoferolov (Psomiadou in Tsimudou, 1998).

Zaradi dolge verige konjugiranih dvojnih vezi so karotenoidi zelo reaktivni – nestabilni. Da bi se izognili nezaželenim reakcijam karotenoidov, analize izvajamo v temi ali pri zeleni svetlobi (Gandul-Rojas in sod., 2000; Mínguez-Mosquera in sod., 1991), v temni steklovini (Gimeno in sod., 2000), za zaščito karotenoidov dodamo antioksidante (Gimeno in sod., 2000).

2.2.4 Določevanje biofenolov v oljčnem olju

2.2.4.1 Ekstrakcija biofenolov iz oljčnega olja

Priprava vzorca za analizo fenolnih komponent v raznih rastlinskih tkivih in oljčnem olju temelji na ekstrakciji. Starejši postopki (Gutfinger, 1981; Evangelisti in sod., 1997; Fogliano in sod., 1999; Akasbi in sod., 1993) za analizo oljčnega olja temeljijo na ekstrakciji tekoče-tekoče. Vzorec običajno ekstrahirajo z zmesjo metanola in vode (Gutfinger, 1981), lahko pa tudi z metanolom (Kalogeropoulos in sod., 2007a, 2007b). Vzorec olja se raztopi v heksanu, nato pa se ekstrahira polarne fenolne snovi z zmesjo metanola in vode. Pomanjkljivost takšne ekstrakcije je slaba ponovljivost, ki jo lahko pripišemo nepopolni ekstrakciji ali pa oksidaciji fenolnih spojin med stresanjem (Manino in sod., 1993).

Kasneje so bili razviti postopki za ekstrakcijo trdno-tekoče (Manino in sod., 1993; Cortesi in sod., 2002), ki so lahko hitrejši in imajo boljšo ponovljivost, poraba topil pa je manjša. Mannino in sod. (1993) poročajo o ekstrakciji na kartušah C18 Sep-Pac. Na kartuše, kondicionirane z zmesjo heksana in etra, so nanесли vzorec olja, nepolarno frakcijo vzorca so odstranili s spiranjem z zmesjo heksana in etra ter nato eluirali fenolne spojine z metanolom.

N. Cortesi in sod. (2002) so v svojem delu pokazali, da je metoda z ekstrakcijo na kartušah z anionskim izmenjalcem (SPE SAX) v vseh pogledih primerna zamenjava za klasično

ekstrakcijo tekoče-tekoče. Metoda je inovativna zaradi uporabe anionskega izmenjalca, saj so drugi raziskovalci uporabljali kartuše s polnilom C18 (Manino in sod., 1993).

2.2.4.2 Določevanje vsebnosti biofenolov v oljčnem olju z reagentom Folin-Ciocalteu

Vsebnost skupnih biofenolov določamo z reagentom Folin-Ciocalteu, ki vsebuje heteropolifosfovanadate-molibdate. Ti lahko reagirajo z reducenti, pri čemer nastanejo modro obarvane spojine, verjetno $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})_4$. Reagent ni specifičen za fenolne spojine, pač pa ga lahko reducirajo tudi druge snovi, na primer vitamin C, Cu(I) ali reducirajoči sladkorji. Fenoli reagirajo z reagentom le v bazičnem mediju, ki ga dosežemo z dodatkom natrijevega karbonata. Metoda je enostavna in ponovljiva, zato se veliko uporablja za določevanje vsebnosti fenolnih antioksidantov (Huang in sod., 2005).

2.2.4.3 Določevanje vsebnosti *o*-difenolov v oljčnem olju

o-difenoli so mnogo močnejši antioksidanti kot monofenoli. *o*-difenoli lutein, hidroksitirozol in njegovi derivati imajo pri enakih koncentracijah (izraženih v milimol/kg olja) približno enako antioksidacijsko učinkovitost. Zmes dveh *o*-difenolov ima približno enako antioksidacijsko učinkovitost kot posamezna spojina s koncentracijo, ki je enaka vsoti koncentracij obeh *o*-difenolov. Zato lahko antioksidacijsko učinkovitost fenolne frakcije ocenimo z določitvijo vsebnosti *o*-difenolov (Mateos in sod., 2003).

o-difenole lahko ekstrahiramo iz olja na različne načine, na primer z zmesjo metanola in vode ali s pomočjo kartuš z diolno fazo. Ekstraktu dodamo natrijev molibdat. Nastanejo rumeno obarvane spojine, ki jih kvantificiramo spektrofotometrijsko (Gutfinger, 1981).

2.2.4.4 Določevanje vsebnosti biofenolov in biofenolne sestave v oljčnem olju s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Za določitev vsebnosti biofenolov s HPLC je običajno potrebno ekstrahirati biofenole iz vzorca, Jiménez in sod. (2007) pa so razvili metodo za določevanje biofenolov s HPLC brez predhodne ekstrakcije biofenolov iz olja.

Za določevanje biofenolov z metodo HPLC se običajno uporablja kolona s polnilom ODS (Tsimidou in sod., 2005). V večini primerov se uporablja gradientna elucija (Tsimidou in sod., 2005), izokratska pa vse bolj redko (Savournin in sod., 2001). Način identifikacije je odvisen od tega, ali obstaja ustrezna standardna spojina. Če standardna spojina obstaja, lahko spojino identificiramo s standardnim dodatkom, s primerjavo retencijskih časov in primerjavo UV absorpcijskih spektrov spojine iz vzorca s standardno spojino. Bolj zanesljivo identifikacijo omogoča uporaba HPLC/MS (Roche in sod., 2005; Brenes in sod., 1999) ali NMR (Brenes in sod., 1999). Elektrokemijska detekcija se uporablja le redko (Christophoridou in sod., 2005).

Kvantifikacija je težavna, saj za vse biofenole v oljčnem olju ne obstajajo ustrezne standardne spojine. V tem primeru predpostavimo, da imajo vse eluirane spojine enak odziv na detektorju, kot standardno spojino pa uporabimo tirosol (Cortesi in sod., 2002). Z uporabo internega standarda, ki ga dodamo v olje že pred začetkom ekstrakcije, ocenimo morebitne izgube pri ekstrakciji.

2.2.4.5 Določevanje vsebnosti biofenolov in biofenolne sestave oljčnega olja s plinsko kromatografijo (GC)

Za določevanje vsebnosti biofenolov se plinska kromatografija uporablja le redko, saj je potrebna predhodna derivatizacija – silanizacija biofenolov. Identifikacijo spojin omogoča sklopitev GC/MS (Kalogeropoulos in sod., 2007a, 2007b).

2.2.4.6 Druge metode za določevanje vsebnosti biofenolov v oljčnem olju

Prednost kvantitativnega določevanja biofenolov z ^1H NMR je v tem, da ni potrebna predhodna priprava vzorca, poleg tega pa lahko sočasno določamo tudi druge parametre, kot so kislost, maščobne kisline in jodovo število. Določevanje biofenolov z ^{31}P NMR je nekoliko bolj zamudno, saj je potrebna predhodna derivatizacija vzorca, vendar tudi v tem primeru lahko sočasno določamo tudi na primer proste maščobne kisline, monoacilglicerole, diacilglicerole in proste sterole (Dais in sod., 2007).

Biofenole lahko določamo tudi s kapilarno elektroforezo (Priego-Capote in sod., 2004).

2.2.5 Določevanje antioksidacijske učinkovitosti

Antioksidanti so molekule, ki bistveno upočasnijo ali preprečijo oksidacijo, kadar so prisotne v koncentracijah, ki so nizke v primerjavi s substratom oksidacije (del Carlo in sod., 2004).

Antioksidanti lahko delujejo na tri načine (Zhou in sod., 2006):

- S prehodnimi kovinami tvorijo kelate in tako zmanjšajo razpoložljivost kovin za katalizo.
- Preprečujejo nastanek prostih radikalov v sistemu in tako inhibirajo iniciacijo verižne radikalske oksidacije.
- Reagirajo neposredno s prostimi radikali, jih dušijo in tako končajo verižne reakcije oksidacije.

Glede na naravo delovanja preučevanih antioksidantov moramo izbrati ustrezno metodo za določevanje njihove učinkovitosti. V nadaljevanju se bomo omejili na ugotavljanje učinkovitosti za inhibicijo prostih radikalov, saj biofenoli delujejo kot odstranjevalci prostih radikalov. Kot substrat za delovanje antioksidantov lahko uporabimo različne radikale, na primer primer superoksidni anionski radikal $O_2^{\cdot-}$, hidroksilni radikal HO^{\cdot} in kationski radikal $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)), najpogosteje pa se za določevanje aktivnosti biofenolov uporablja DPPH (Zhou K. in sod., 2006; Briante in sod., 2003). 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ali α,α -difenil- β -pikrilhidrazil ali DPPH je zaradi delokalizacije nesparjenega prostega elektrona preko celotne molekule stabilen prosti radikal, tako da molekula ne dimerizira, kakor bi se zgodilo z večino prostih radikalov. Zaradi delokaliziranega elektrona je radikal intenzivno vijolične barve in ima v etanolu absorpcijski pas okrog 520 nm. Ko radikal dodamo spojino, ki je donor vodikovega atoma, nastane reducirana oblika difenilpikrilhidrazin, ki ni prosti radikal in ni vijolične barve, pač pa zaradi pikrilne skupine rahlo rumene barve (Molyneux, 2004).

Med DPPH in donorjem vodika AH poteče reakcija (Bondet in sod., 1997):



Nastaneta reducirana oblika (DPPH-H) in nov prosti radikal A^{\cdot} , ki je lahko manj reaktiven, odvisno od strukture molekule, ali pa se lahko dva radikala povežeta in nastane stabilna molekula (Valavanidis in sod., 2004).

Reakcija antioksidanta z DPPH je simulacija reakcij, ki potekajo pri oksidaciji (npr. avtooksidaciji lipidov ali drugih nenasičenih spojin) (Molyneux, 2004).

2.2.5.1 Različni načini podajanja antioksidacijske učinkovitosti

Metodo z DPPH je uvedel Blois leta 1958 in o njej poročal v reviji Nature (Molyneux, 2004). Brand-Williams in sod. (1995) so vpeljali pojem 'efficient concentration' (učinkovita koncentracija, EC₅₀ ali IC₅₀). To je koncentracija substrata, ki zmanjša začetno količino DPPH za 50 %. Analogen način izražanja rezultatov je I₅₀ – količina originalnega vzorca olja v miligramih, ki zmanjša začetno koncentracijo DPPH za 50 % (Lavelli in Bondesan, 2005). Pomanjkljivost pojmov EC₅₀ in I₅₀ je v tem, da sta EC₅₀ in I₅₀ tem nižja, čim bolj učinkovit je antioksidant. Ta pomanjkljivost je še posebno moteča, kadar rezultate predstavljamo grafično (Molyneux, 2004).

Zato nekateri avtorji rezultate podajajo kot 'antiradical power value' (protiradikalna moč, ARP), ki je definirana kot 1/EC₅₀ (Rotondi in sodelavci, 2004; Brand-Williams in sod., 1995). Antioksidacijsko aktivnost lahko izrazimo tudi kot delež DPPH, ki ga antioksidant razgradi (Miliauskas in sod., 2004; Pérez-Bonilla in sod. 2006). Izračunamo ga po enačbi:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100 \quad \dots(2)$$

kjer je: A_B... absorpcija slepega preskusa v času nič
A_A... absorpcija testne raztopine po 15 minutah

Briante in sod. (2003) pa so rezultate določevanja antioksidacijske učinkovitosti s kationskim radikalom DMPD^{•+} izrazili kot antioksidacijsko učinkovitost ('antioxidant efficiency') AE:

$$AE(\%) = [1 - (A_{AO} - A_0)] \times 100 \quad \dots(3)$$

kjer je: AE(%)... antioksidacijska učinkovitost
A_{AO} absorbanca, izmerjena 15 minut po dodatku antioksidanta
A₀ absorbanca neinhibiranega radikala

Koncentracijo antioksidanta, ki razbarva polovico radikala (AE₅₀), so izračunali po enačbi

$$1 / AE(\%) = a + S_{AOI} \times 1/m \quad \dots(4)$$

kjer je: a presečišče premice 1/AE (%) v odvisnosti od 1/m antioksidanta
S_{AOI} ... naklon iste premice
m masa antioksidanta (μg)

Določili so tudi 'radical scavenging activity' (aktivnost za odstranjevanje radikalov, EC_{50}) kot razmerje med AE_{50} in začetno koncentracijo radikala ter 'inverse antiradical power' (inverzna protiradikalna jakost, AP_1), ki so jo definirali kot S_{AOI} . Tako EC_{50} kot AP_1 sta tem manjši, čim bolj učinkovit je antioksidant.

Aktivnost antioksidanta lahko izrazimo tudi s primerjavo z antioksidacijsko učinkovitostjo troloksa, vodotopnega analoga vitamina E. 'Trolox equivalent antioxidant capacity' (TEAC) je definiran kot koncentracija troloksa (mmol/L), ki ima enako antioksidacijsko učinkovitost kot raztopina proučevanega antioksidanta s koncentracijo 1,0 mmol/L (Pellegrini in sod., 2001). 'Trolox equivalent' (ekvivalent troloksa, TE) je definiran podobno, in sicer kot razmerje med I_{50} troloksa (μmol) in I_{50} vzorca (kg) (Lavelli in sod. 2006).

2.2.5.2 Izvedba eksperimenta z DPPH

V skladu z normalno prakso v spektrofotometriji naj bi bila začetna koncentracija DPPH izbrana tako, da je absorbanca manjša od 1,0. To pomeni, da mora biti začetna koncentracija DPPH med 5×10^{-5} in 1×10^{-4} M (Molyneux, 2004). Za določevanje antioksidacijske učinkovitosti ekstraktov oljčnega olja ali posameznih antioksidantov iz oljčnega olja se pogosto uporablja raztopina DPPH s koncentracijo približno 6×10^{-5} M (Lavelli in Bondesan, 2005; Psomiadou in Tsimidou, 1999; del Carlo in sod., 2004; Gordon in sod., 2001).

Večina avtorjev meri absorbanco pri 515 nm, drugi pri 517, 518 ali 520 nm. Absorpcijski vrh DPPH ni oster in ker absolutna absorbanca ni pomembna, je najbolje delati pri tisti valovni dolžini, pri kateri z uporabljenim inštrumentom določimo maksimum. Lahko bi uporabili tudi kolorimeter z ustreznim filtrom (Molyneux, 2004).

Blois je priporočal reakcijski čas 30 minut, nekateri avtorji pa manj (celo samo 5 minut). Ker pa različni substrati reagirajo različno hitro, je najbolje slediti reakciji, dokler ne poteče popolnoma in se absorbanca ustali. Hitrost reakcije je lahko eden od parametrov za oceno učinkovitosti antioksidanta (Molyneux, 2004). Antioksidacijsko učinkovitost oljčnih antioksidantov včasih določajo na podlagi meritev absorbance, ko le-ta doseže plato (Boscou in sod., 2006), pogosto pa reakcijski čas skrajšajo na 15 minut (Valavanidis in sod., 2004; Lavelli in Bondesan, 2005; Briante in sod., 2003; Pérez-Bonilla in sod., 2006).

Nekatere spojine z DPPH reagirajo zelo hitro in uničijo toliko molekul DPPH, kolikor hidroksilnih skupin vsebujejo. Večina spojin pa reagira počasneje, mehanizmi pa so kompleksnejši. Ker nekatere spojine (npr. kumarna kislina in vanilin) nikoli ne uničijo več kot 75 % DPPH, niti po 7 urah in pri visokih koncentracijah, ne bi bilo smiselno podajati rezultatov kot EC₁₀₀ (Brand-Williams in sod., 1995).

Murković-Steinberg in Milardović (2007) sta za določevanje antioksidacijske učinkovitosti prav tako uporabila DPPH, ki pa sta ga imobilizirala v PVC filmih.

2.2.6 Določevanje oksidacijske stabilnosti oljčnega olja

Oksidacijska stabilnost olja ali maščobe je določena kot čas, potreben za dosego kritične točke oksidacije (indukcijski čas) (Silva in sod., 2001). Odvisna je od individualnih značilnosti olja, kot so vsebnost nenasičenih maščobnih kislin, vsebnost naravnih antioksidantov, sledi kovin in stopnja oksidiranosti. Da bi lahko določili stabilnost olja v krajšem času, oksidacijo pospešimo, na primer s povišanjem temperature in izpostavljenostjo olja zraku ali kisiku. Obstaja pa nevarnost, da s tem spremenimo potek oksidacije in da potekajo drugačne reakcije, kot bi potekale pri normalnem poteku oksidacije. Možno je torej, da dobljeni rezultati ne ustrezajo povsem dejanski stabilnosti olja (Gutiérrez Rosales, 1989).

Zelo razširjena metoda za določevanje oksidacijske stabilnosti je metoda aktivnega kisika (Active Oxygen Method - AOM). Maščobo se prepihuje z zrakom pri temperaturi 100 °C, stabilnost pa se izrazi v urah, potrebnih za to, da je dosežena vrednost peroksidnega števila 100 meq/kg (Läubli in Bruttel, 1986).

Zadnje čase je vse bolj razširjena metoda Rancimat, ki omogoča avtomatizirano določevanje oksidacijske stabilnosti, za določitev oksidacijske stabilnosti pa zadošča manjša količina vzorca kot pri metodi AOM (Läubli in Bruttel, 1986). Metoda je enostavna, zahteva malo dela in minimalni nadzor med določevanjem. Vzorec olja termostatiramo pri visoki temperaturi, najpogosteje pri temperaturi med 100 in 130 °C. Olje prepihujemo z zrakom, ki ga vodimo v destilirano vodo. Po določenem času segrevanja začne v olju kot produkt oksidacije nastajati med drugim tudi mravljična kislina, ki jo s tokom zraka vodimo v destilirano vodo. Prevodnost vode se poveča, kar spremljamo s pomočjo vanjo potopljenih elektrod. Indukcijski čas definiramo kot čas, v katerem določimo prevoj krivulje prevodnosti destilirane vode (Gutiérrez Rosales, 1989; Salvador in sod., 2001), lahko pa tudi kot čas, ko prevodnost v destilirani vodi doseže neko vnaprej izbrano vrednost (Ceballos in sod., 2003; Aparicio in sod., 1999).

Pogoje dela (temperaturo, pretok zraka, količino vzorca) lahko izberemo poljubno. Čim višja je temperatura, tem krajši je določeni indukcijski čas (Anwar in sod., 2003). Oksidacijska stabilnost oljčnega olja se najpogosteje določa pri temperaturi 100 °C in pretoku zraka 10 L/h, saj je Gutiérrez-Rosales (1989) statistično ovrednotil metodo, če se izvaja pri navedenih pogojih.

2.3 OKSIDACIJA MAŠČOB

Oksidacija maščob poteka po različnih reakcijskih mehanizmih – kot fotooksidacija ali avtooksidacija. V oksidaciji lahko sodelujeta dve obliki kisika: singletni ($^1\text{O}_2$) in tripletni kisik ($^3\text{O}_2$) (Choe in Min, 2006). Singletni kisik je 1000 do 1500-krat bolj reaktiven kot tripletni kisik (Caponio in sod., 2005).

Na oksidacijo olja vplivajo številni faktorji, kot so svetloba, temperatura, maščobnokislinska sestava, prisotnost kisika in oblika prisotnega kisika ter prisotnost drugih snovi, kot so kovine, pigmenti, fosfolipidi, proste maščobne kisline, mono- in diacilgliceroli, oksidirane spojine in antioksidanti (Choe in Min, 2006).

K stabilnosti oljčnega olja prispevajo predvsem majhna vsebnost nenasičenih maščobnih kislin in antioksidacijska učinkovitost nekaterih neumljivih snovi (Rotondi in sod., 2004).

2.3.1 Avtooksidacija maščob

Avtooksidacija maščob je verižna radikalska reakcija, ki poteka v treh stopnjah: iniciacija, propagacija in terminacija. V reakciji sodeluje tripletni kisik (Choe in Min, 2006).

- Začetek ali iniciacija

Reakcija tripletnega kisika s triacilgliceroli ali maščobnimi kislinami je termodinamsko neugodna, pač pa tripletni kisik zlahka reagira z radikali, ki iz maščobnih kislin nastanejo pod vplivom povišane temperature in/ali svetlobe.



Nastanek alkilnih radikalov (R^\bullet) katalizirajo kovine ali encimi. Najlažje se odcepi vodikov atom ob dvojni vezi. Nastali prosti radikal se stabilizira s prenosom dvojne vezi, nastali produkt pa ima *trans*- obliko. Pri avtooksidaciji linolne in linolenske kisline nastanejo samo konjugirani produkti (Choe in Min, 2006).

- Razvoj ali propagacija

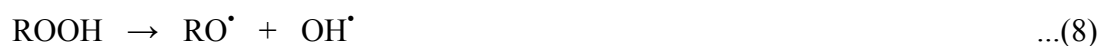
Alkilni radikal reagira s tripletnim kisikom, pri čemer nastane peroksilni radikal (ROO^\bullet). Ker reakcija poteka zelo hitro, je koncentracija alkilnih radikalov precej nižja od koncentracije peroksilnih radikalov (Choe in Min, 2006).



Peroksilni radikal reagira z novo lipidno molekulo in iz nje odcepi vodik. Pri reakciji nastane molekula hidroperoksida ($ROOH$) in nov alkilni radikal (Choe in Min, 2006).



Hidroperoksidi lahko razpadejo na alkoksilne (RO^\bullet) in hidroksilne radikale (OH^\bullet) (Ottaviani in sod., 2001).

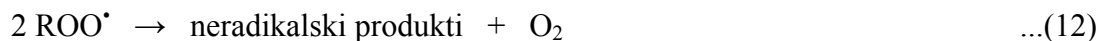


Hitrost nastanka peroksilnih radikalov (ROO^\bullet) in hidroperoksidov je odvisna samo od razpoložljivosti kisika in temperature (Velasco in sod., 2003).

Količina nastalih hidroperoksidov je lahko merilo za oksidiranost maščobe. Določamo jo lahko z jodometrično titracijo – peroksidno število (Zuta in sod., 2007). Primarni produkti oksidacije - hidroperoksidi so pri sobni temperaturi in v odsotnosti kovin relativno obstojne spojine. Pri višji temperaturi ali v prisotnosti kovin pa iz njih hitro nastanejo alkoksilni radikali, ki v nadaljnjih reakcijah tvorijo sekundarne produkte oksidacije: aldehide, ketone, kisline, estre, alkohole in ogljikovodike s kratkimi verigami (Choe in Min, 2006).

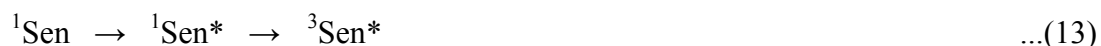
- Konec ali terminacija

Verižna oksidacija se konča z nastankom stabilnih spojin z dimerizacijo prostih radikalov (Zuta in sod., 2007; Choe in Min, 2006; Kanavouras in sod., 2005).



2.3.2 Fotooksidacija maščob

Svetloba pospešuje oksidacijo maščob, še posebno v prisotnosti vzpodbujevalcev, kot so klorofili. Vzodbujevalci v osnovnem singletnem stanju (^1Sen) absorbirajo svetlobo in preidejo najprej v vzbujeno singletno stanje ($^1\text{Sen}^*$), nato pa v vzbujeno tripletno stanje ($^3\text{Sen}^*$) (Choe in Min, 2006).



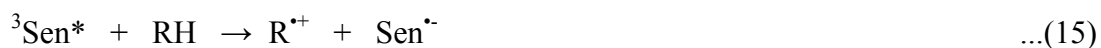
Poznamo dva tipa fotooksidacije: tip I in tip II. Hitrost obeh tipov oksidacije je odvisna od vrste vzpodbujevalcev in substrata ter od koncentracije kisika in substrata. Fotooksidacija jedilnih olj poteka po reakcijski poti s singletnim kisikom (Choe in Min, 2006).

2.3.2.1 Fotooksidacija tipa I

Molekule v vzbujenem tripletnem stanju lahko s substrata prejmejo vodikov atom ali elektron, pri čemer nastanejo prosti radikali (Choe in Min, 2006).



ali



Nastali intermediat I reagira s tripletnim kisikom, pri čemer nastane molekula hidroperoksida.

2.3.2.2 Fotooksidacija tipa II

Vzbujene tripletne molekule vzpodbujevalcev lahko reagirajo s tripletnim kisikom, pri čemer se vzpodbujevalec vrne v osnovno singletno stanje, pa tudi kisik se pretvori v singletno obliko.



Singletni kisik prenese energijo na drugo molekulo ali pa reagira s substratom. Pri fotooksidaciji nastanejo tako konjugirani kot nekonjugirani hidroperoksidi, medtem ko pri avtooksidaciji nastanejo izključno konjugirani hidroperoksidi (Choe in Min, 2006).

2.3.3 Vpliv strukture maščobnih kislin na hitrost oksidacije maščob

Hitrost oksidacije olja je odvisna od maščobnokislinske sestave. Razmerje relativnih hitrosti oksidacije triacilglicerolov OOO, OOL, OLL in LLL je 0,7 : 2,2 : 2,3 : 3,0 (Mateos in sod. 2005), iz česar lahko sklepamo, da hitrost oksidacije narašča s številom dvojnih vezi v molekuli. Hitrost oksidacije je precej odvisna od razmerja med površino in maso olja (Kanavouras in sod., 2005).

2.4 ŠTUDIJE SHRANJEVANJA OLJČNEGA OLJA

Številne študije spremljajo spremembe v oljčnem olju med shranjevanjem, vendar se vse osredotočajo na shranjevanje pri sobni temperaturi ali pa celo pospešujejo oksidacijo olja z dvigom temperature na 40 ali 60 °C. Vzorce shranjujejo v različni embalaži, svetli ali temni, na svetlobi ali v temi. Vse te študije simulirajo staranje olja pri pogojih, ki so običajni za skladiščenje olja pri trgovcih in v gospodinjstvih. Pri pregledu literature smo našli le na en članek, ki opisuje spremljanje olja med skladiščenjem pri nižjih temperaturah, pri kakršnih shranjujemo olja v laboratorijih v času od prejema vzorcev do opravljanja preskusov. Calligaris in sodelavci (2006) so spremljali primarne in sekundarne produkte oksidacije v oljih, skladiščenih pri temperaturah od 3 do 60 °C z namenom ugotoviti vpliv fizikalnih lastnosti (agregatno stanje in viskoznost) na kinetiko oksidacije. Ostali avtorji so olje skladiščili pri temperaturi 15 °C (Gallardo-Guerrero in sod., 2005; Caponio in sod., 2005; Kanavouras in sod., 2004; Coutelieris in Kanavouras, 2006) ali več.

2.5 ŠTUDIJE SEGREVANJA OLJČNEGA OLJA

Obstaja precej objav o študijah, v katerih so ugotavljali, kaj se dogaja z oljem med segrevanjem pri temperaturi okrog 180 °C – to je temperatura, pri kateri običajno poteka cvrenje. Izvedbe eksperimentov so zasnovane zelo raznoliko. Eden od bolj pogostih načinov je spremljanje izbranih parametrov v olju, v katerem so cvrli določena živila, običajno krompir (Romero in sod., 1999; Andrikopoulos in sod., 2002), lahko pa so olju dodali tudi antioksidante (Naz in sod., 2004). Objavljenih je nekaj študij, v katerih so v fritezi segrevali olje brez živila (Hrncirk in Fritsche, 2005; Danowska-Oziewicz in Karpinska-Tymoszczyk, 2005). Albi in sod. (1997) so olje segrevali v mikrovalovni pečici, Caponio in sod. (2002) pa so olje zmešali s kvarčnim peskom in tako simulirali pripravo testa za pico.

Manj je objav o tem, kaj se dogaja v olju pri temperaturi kuhanja (100 °C). Nisiotis in Tasioula-Margari (2002) sta ugotavljala spremembe v vsebnosti antioksidantov med termično oksidacijo olja pri 60 °C in 100 °C. Olje sta segrevala v steklenih čašah v peči. Ceballos in sod. (2003) so spremljali le spremembe barve in oksidacijsko stabilnost med segrevanjem olja na 100 °C.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ZASNOVA RAZISKAVE

Doktorsko delo obsega dva sklopa raziskav. Prvi sklop je ugotavljanje sprememb v oljčnem olju med skladiščenjem, drugi sklop pa ugotavljanje sprememb med segrevanjem olja.

3.1.1 Vzorčenje

V raziskavo smo vključili vzorce ekstra deviškega oljčnega olja Slovenske Istre letnikov 2003, 2004 in 2005. Sedemnajst vzorcev je bilo sortnih, pridobljenih iz oljk dveh v Slovenski Istri najbolj zastopanih sort, 'Istrska belica' in 'Leccino'. En vzorec je bil mešanica olj, pridobljen iz oljk različnih sort in več pridelovalcev. Vzorci so bili pridobljeni z dvema tehnologijama: s klasično predelavo s stiskanjem in v kontinuirnem dvoipol-faznem sistemu. Vzorce smo dobili neposredno po stiskanju od izbranih pridelovalcev, s katerimi že več let uspešno sodelujemo, s čimer smo zagotovili pristnost oljčnega olja tako glede geografskega izvora kot glede sorte. Podatki o vzorcih so zbrani v preglednici 2.

Vsa v raziskavo vključena olja so bila ekstra deviška oljčna olja, kar pomeni, da so glede parametrov kakovosti ustrezala zahtevam Uredbe Komisije... (1991), ki so podane v preglednici 3. Z vzorčenjem le ekstra deviških oljčnih olj smo zagotovili relevantno primerjavo s podatki v literaturi. Poleg tega je bil eden od ciljev raziskave ugotoviti primerne pogoje za skladiščenje referenčnega vzorca; kot referenčni vzorec pa se vedno uporabi čim bolj kakovostno olje, da se zagotovi stabilnost vzorca v daljšem časovnem obdobju. Za ugotavljanje primernih pogojev skladiščenja torej moramo uporabiti vzorce, katerih kakovost je primerljiva s kakovostjo referenčnih vzorcev. Poleg tega je primerjava vzorcev dveh sort smiselna le, če so bili vsi vzorci v začetku poskusa sveži, pridobljeni iz kakovostnih oljk in z ustreznimi tehnološkimi postopki.

Preglednica 2: Podatki o vzorcih (letnik, pridelovalec, tehnologija pridelave in vrsta olja), vključenih v posamezne eksperimente.

Table 2: Samples data. (crop year, producer, technology and type of oil) included in individual experiment.

Poskus				Oznaka vzorca	Letnik	Pridelovalec	Tehnologija	Olje	
sk	SR	S8	S100						
				IB1	2003	Hlaj	k	IB	
				IB2	2003	Jevnikar	k	IB	
				IB3	2003	Lisjak	k	IB	
				IB4	2003	Sečerov	s	IB	
				L1	2003	Jevnikar	k	L	
				L2	2003	Bošnjak	k	L	
				L3	2003	Dujc	k	L	
				Mv	2003	Oleum nostrum	k	Mv	
					IB5	2004	Hlaj	k	IB
					IB6	2004	Jevnikar	k	IB
					IB7	2004	Lisjak	k	IB
					IB8	2004	Sečerov	s	IB
					L4	2004	Jevnikar	k	L
				L5	2004	Dujc	k	L	
				IB9	2005	več pridelovalcev	k, s	IB	
				L6	2005	več pridelovalcev	k, s	L	
				S1	/	/	/	S	
				IB10	2005	več pridelovalcev	k, s	IB	
				L7	2005	več pridelovalcev	k, s	L	
				S2	/	/	/	S	

Sivo polje v stolpcih 'Poskus' označuje, v kateri poskus so bili vključeni posamezni vzorci.

Poskus: sk: skladiščenje pri temperaturi -20 °C in pri 8 °C; SR: segrevanje v Rancimatu; S8: osemurno segrevanje pri temperaturi 100 °C in pri 180 °C; S100: stournno segrevanje pri temperaturi 180 °C.

Tehnologija: k: kontinuirna; s: stiskanje.

Olje: IB: EDOO sorte 'Istrska belica'; L: EDOO sorte 'Leccino'; Mv: EDOO mešanih sort; S: sončnično olje.

The grey field in the 'Poskus' column shows the experiment in which each sample was included.

Experiment: sk: storing at temperature -20 °C and at 8 °C; SR: heating in Rancimat; S8: heating for 8 hours at 100 °C and at 180 °C; S100: heating for 100 hours at 180 °C.

Technology: K: continuous; S: pressing.

Oil: IB: EVOO from cv. *Istrska belica*; L: EVOO from cv. *Leccino*; Mv: EVOO from several mixed cultivars, S: sunflower oil.

Preglednica 3: Mejne vrednosti parametrov kakovosti za EDOO (Uredba Komisije..., 1991)
Table 3: Limit values of quality parameters for EVOO (Uredba Komisije..., 1991)

Parameter	Mejna vrednost
kislost	$\leq 0,8$ ut. %
peroksidno število	≤ 10 mmol O ₂ /kg
K ₂₃₂	$\leq 2,2$
K ₂₇₀	$\leq 0,25$
ΔK	$\leq 0,01$

V sklop skladiščenja smo vključili 14 vzorcev EDOO: 8 vzorcev sorte 'Istrska belica' (oznake vzorcev IB1 do IB8), pet vzorcev sorte 'Leccino' (oznake vzorcev L1 do L5) in en vzorec mešanega olja (oznaka vzorca Mv). Sveže vzorce smo od pridelovalcev dobili v polnih plastenkah in jih takoj pretočili v temne steklenice (200 mL), ki smo jih napolnili skoraj do roba. Vrat steklenic smo prepihali z dušikom in jih takoj zaprli s plastičnim zamaškom.

V sklop segrevanja v Rancimatu smo vključili osem vzorcev EDOO štiri vzorce Istrske belice (z oznakami IB1 do IB4), tri vzorce Leccina (z oznakami L1 do L3) in en vzorec mešanega olja (z oznako Mv). S svežimi vzorci smo napolnili centrifugirke (50 mL), prepihali vrh centrifugirk z dušikom, jih zaprli in do izvedbe poskusa hranili v zmrzovalniku pri temperaturi -20 °C.

V poskus osemurnega segrevanja pri 100 °C in 180 °C smo vključili dva vzorca EDOO Slovenske Istre (vzorec IB9 sorte 'Istrska belica' in vzorec L6 sorte 'Leccino'), za primerjavo pa tudi sončnično olje (S1), kupljeno v trgovini. Za sončnično olje smo se odločili, ker je to eno izmed najpogostejše uporabljanih olj v slovenskih gospodinjstvih. Oba vzorca EDOO smo pripravili z mešanjem enakih količin sortnih oljčnih olj različnih pridelovalcev iz Slovenske Istre. Z mešanjem olj različnih pridelovalcev smo pripravili reprezentativen povprečen vzorec in tako zagotovili, da je na rezultate vplivala le sorta, ne pa tudi različni pedoklimatski pogoji, različni agronomski ukrepi posameznih pridelovalcev in različni pogoji med pridelavo olja iz oljk.

Tudi v poskus stournega segrevanja pri 180 °C smo vključili dva vzorca ekstra deviškega oljčnega olja Slovenske Istre (vzorec IB10 sorte 'Istrska belica' in vzorec L7 sorte 'Leccino') ter v trgovini kupljeno sončnično olje (S2) za primerjavo. Vzorca EDOO smo pripravili na enak način kot v poskusu osemurnega segrevanja.

3.1.2 Skladiščenje ekstrea deviškega oljčnega olja eno leto pri -20 °C in 8 °C

Vsak vzorec smo analizirali trikrat: svežega, po enem letu skladiščenja v zmrzovalniku pri -20 °C in po enem letu skladiščenja v hladilniku pri 8 °C. V vzorcih smo opravili naslednja določevanja:

- kislost,
- peroksidno število,
- spektrofotometrijsko preiskavo v UV,
- maščobnokislinsko sestavo,
- vsebnost tokoferolov,
- biofenolno sestavo,
- vsebnost skupnih biofenolov,
- oksidacijsko stabilnost (samo v vzorcih letnika 2003).

Metode določevanj so opisane v točki 3.2.

3.1.3 Segrevanje olja

Raziskovanje vpliva segrevanja oljčnega olja na proučevana parametre je potekalo v treh sklopih.

3.1.3.1 Spremljanje proučevanih parametrov v EDOO med segrevanjem v Rancimatu

V kiveto smo odtehtali 20 g olja in jo vstavili v Rancimat 679 (Metrohm, Herisau, Švica). Pred segrevanjem smo olju odstranili vodo z brezvodnim natrijevim sulfatom. Olje smo segrevali pri temperaturi 100 °C in pretoku zraka 10 L/h. Segrevanje je potekalo 142 ur, dokler ni začela krivulja prevodnosti najbolj stabilnega vzorca hitro naraščati. Po segrevanju smo vzorce takoj prenesli v steklene fiole (15 mL), jih prepihal z dušikom, jih zaprli ter jih do analiz hranili pri -20 °C.

Pred segrevanjem in po njem smo opravili analize, ki so našteje v v točki 3.1.2. Indukcijskega časa v vzorcih po segrevanju nismo določali, saj so vzorci med segrevanjem že dosegli in celo presegli točko prevoja krivulje prevodnosti.

3.1.3.2 Spremljanje proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C

S fizikalno-kemijskimi analizami smo spremljali spremembe proučevanih parametrov, do katerih pride v olju v osmih urah segrevanja pri 100 °C in pri 180 °C. V poskus smo vključili dva vzorca EDOO sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' ter sončnično olje za primerjavo. Vzorci so opisani v poglavju 3.1.1.

V stekleno čašo s premerom 105 mm smo natočili 8 dL olja. Čašo smo postavili v kopel s silikonskim oljem, ki je bila predhodno segreta na delovno temperaturo (100 °C oziroma 180 °C). Nivo kopeli je segal približno 1 cm nad nivo vzorca v čaši. Kopel je zagotavljala enakomerno temperaturo tako na dnu kot na vrhu čaše. Temperaturo smo merili na polovični globini olja v osi posode, torej točno na sredini vzorca. Razlike v temperaturi na dnu in na vrhu posode oziroma na sredini in ob obodu posode niso presegale 1 °C. Olje smo segrevali na 100 ± 2 °C oziroma 180 ± 2 °C.

Vsaki dve uri smo s stekleno pipeto odvzeli 100 mL vzorca in ga prenesli v dve temni 50 mL-steklenički. Vrat stekleničk smo prepihali z dušikom, jih zaprli in takoj zamrznili. Vzorce smo do opravljenih analiz hranili pri -20 °C. Pod enakimi pogoji smo shranili tudi vzorce olja pred segrevanjem. Analize smo opravili v roku 1 meseca po segrevanju.

Segrevanje vzorcev olja smo opravili v dveh paralelkah, fizikalno-kemijske analize pa v treh paralelkah.

V vzorcih smo opravili naslednja določevanja:

- kislost,
- peroksidno število,
- *p*-anisidinsko število,
- totoks število,
- UV spektrofotometrijo,
- maščobnokislinsko sestavo,
- vsebnost tokoferolov,
- vsebnost pigmentov (karotenoidov in klorofilnih pigmentov),
- biofenolno sestavo,
- vsebnost skupnih biofenolov in
- antioksidacijsko učinkovitost.

Določevanje vsebnosti skupnih biofenolov v sončničnem olju pred segrevanjem je dalo izredno nizke rezultate, poleg tega tudi v HPLC-kromatogramih sončničnega olja pred segrevanjem nismo detektirali biofenolov, zato v sončničnem olju po segrevanju nismo

določevali biofenolne sestave. Prav tako v metanolnem ekstraktu sončničnega olja nismo določevali antioksidacijske učinkovitosti. Tudi pigmente smo določevali le v obeh vzorcih oljčnega olja.

3.1.3.3 Spremljanje proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju med stournim segrevanjem pri 180 °C

S fizikalno-kemijskimi analizami smo spremljali spremembe proučevanih parametrov, do katerih pride v olju po sto urah segrevanja pri 180 °C. V poskus smo vključili dva vzorca EDOO sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' ter sončnično olje za primerjavo. Vzorci so opisani v poglavju 3.1.1.

Vzorci smo segrevali 100 ur pri 180 °C. Postopek segrevanja je bil enak, kot je opisan v poglavju 3.1.3.2. Za analize smo vzorčili dvakrat, in sicer pred začetkom segrevanja in po končanem segrevanju. V vzorcih smo opravili iste analize kot pri osemurnem segrevanju, naštetih so v poglavju 3.1.3.2. Poleg tega smo določili tudi oksidacijsko stabilnost olj pred segrevanjem in po njem.

3.2 ANALIZNI POSTOPKI

Vse eksperimente smo izvedli v Laboratoriju za preskušanje oljčnega olja v okviru Znanstveno-raziskovalnega središča Koper in v sodelovanju s strokovnjaki LABS d.o.o. Laboratorij je akreditiran za področje preskušanja oljčnega olja. Poleg tega je Mednarodni svet za oljkarstvo na podlagi uspešnega sodelovanja v medlaboratorijskih primerjalnih testih Laboratorij za preskušanje oljčnega olja uvrstil na seznam laboratorijev, ki so pooblaščen za analize oljčnega olja. Pooblastilo najboljšim svetovnim laboratorijem se obnavlja vsako leto, če so le-ti uspešni v mednarodnem medlaboratorijskem primerjalnem testu.

Akreditirane metode, ki smo jih izvajali v okviru naše raziskave, so:

- določevanje kislosti (SIST EN ISO 660; SIST EN ISO 660/A1),
- določevanje peroksidnega števila (SIST EN ISO 3960),
- spektrofotometrijska preiskava v UV (Uredba Komisije..., 1991; COI, 2001),
- določevanje maščobnokislinske sestave (SIST EN ISO 5508; Uredba Komisije..., 1991) in
- določevanje vsebnosti tokoferolov (OSIST prEN ISO 9936).

Akreditiran laboratorij zagotavlja kakovost rezultatov akreditiranih metod na različne načine, med drugim z uporabo ustreznih standardnih spojin, referenčnih vzorcev in z rednim sodelovanjem v mednarodnih medlaboratorijskih primerjavah. Poleg tega so za vsako metodo ocenjene merilne negotovosti, ki upoštevajo prispevke ponovljivosti, obnovljivosti in biasa (odmika od prave vrednosti).

3.2.1 Določevanje kislosti

Kislost smo določali po akreditirani metodi za določevanje kislosti (SIST EN ISO 660; SIST EN ISO 660/A1).

3.2.2 Določevanje peroksidnega števila

Peroksidno število smo določali po akreditirani metodi SIST EN ISO 3960.

3.2.3 Določevanje *p*-anisidinskega števila

p-anisidinsko število smo določali po metodi IUPAC 2.504 (1987).

3.2.4 Določevanje totoks števila

Totoks število je definirano kot vsota *p*-anisidinskega števila in dvakratnika peroksidnega števila. Pri računanju totoks števila moramo biti pozorni na enote, saj imamo peroksidno število izraženo v enotah mmol O₂/kg, *p*-anisidinsko število pa v enotah meq/kg. Totoks število izračunamo po enačbi

$$T\check{S} = 4 \times P\check{S} + A\check{S} \quad \dots(17)$$

kjer je: TŠ... totoks število (meq/kg)
 PŠ... peroksidno število (mmol O₂/kg)
 AŠ... *p*-anisidinsko število (meq/kg)

3.2.5 Spektrofotometrijska preiskava v UV

Spektrofotometrijsko preiskavo v UV-območju smo opravili po akreditirani metodi, opisani v Prilogi IX Uredbe Komisije (EGS) št. 2568/91 (Uredba Komisije...,1991). V bučko (10 mL) smo odtehtali 100 mg vzorca in razredčili z izooktanom do oznake. S spektrofotometrom Milton Roy Spectronic Genesys 5 smo izmerili absorbance pri 232, 266, 270 in 274 nm. Če izmerjena absorbanca ni bila v območju 0,1–0,8, smo pripravili raztopino s tako koncentracijo, da je bila meritev v navedenem območju.

Specifično absorbanco smo izračunali po enačbi:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \times s} \quad \dots(18)$$

kjer je: K_λ... specifična absorbanca pri valovni dolžini
 E_λ... izmerjena absorbanca pri valovni dolžini
 c..... koncentracija raztopine (g/100 mL)
 s..... debelina kivete (cm)

Izračun ΔK:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2} \quad \dots(19)$$

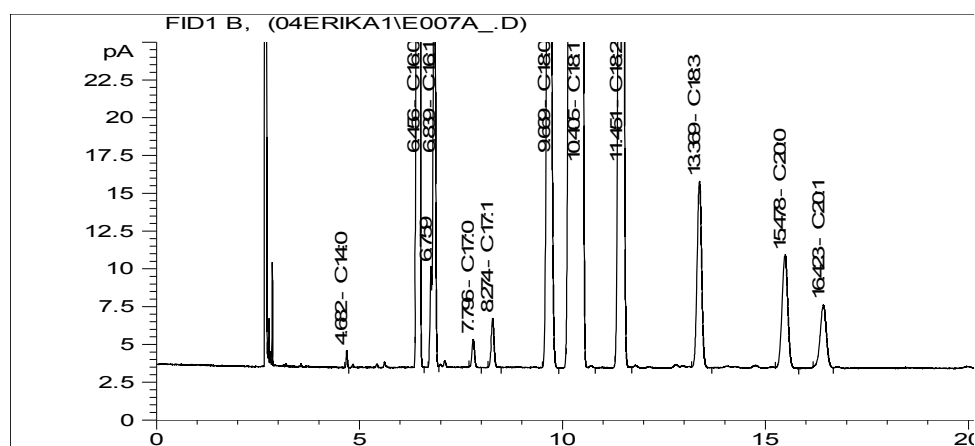
kjer je: K_m... maksimalna specifična absorbanca pri valovni dolžini okoli 270 nm

3.2.6 Določevanje maščobnokislinske sestave

Maščobnokislinsko sestavo smo določali po akreditirani metodi, opisani Prilogah XA in AB Uredbe Komisije (EGS) št. 2568/91 (Uredba Komisije...,1991).

Najprej smo izvedli transesterifikacijo. V fiolo smo dali 100 μ L vzorca, dodali 2 mL heptana in pretresli. Dodali smo 200 μ L raztopine KOH v metanolu (2 M), zaprli fiolo in jo 30 sekund močno stresali, nato pa pustili, da sta se plasti ločili in se je zgornja plast (raztopina metilnih estrov maščobnih kislin v heptanu) zbistrla. Zgornjo plast smo prenesli v fiolo (2 mL) za avtomatski vzorčevalnik in jo uporabili za določitev sestave s pomočjo plinskega kromatografa.

Maščobnokislinsko sestavo smo določili s pomočjo plinskega kromatografa HP 6890 s plamenskimi ionizacijskim detektorjem. Uporabili smo kapilarno kolono INNOWax (dolžina 60 m; notranji premer 0,25 mm; debelina filma 0,25 μ m). Kot nosilni plin smo uporabili dušik. Začetni pritisk na koloni je bil 307 kPa, delilno razmerje 100:1, temperaturni program: 210 $^{\circ}$ C, 50 min, 15 $^{\circ}$ C/min, 240 $^{\circ}$ C, 5 min. Utežni odstotni delež posameznih maščobnih kislin (ut. %) smo izračunali na osnovi površin posameznih metilnih estrov maščobnih kislin glede na vsoto površin vseh metilnih estrov maščobnih kislin. Primer kromatograma je prikazan na sliki 6.



Slika 6: Kromatogram za določevanje maščobnokislinske sestave v EDOO

Figure 6: Chromatogram for determination of fatty acid composition in EVOO

3.2.7 Določevanje vsebnosti tokoferolov

Vsebnost tokoferolov smo določali s tekočinsko kromatografijo po akreditirani metodi OSIST prEN ISO 9936. Uporabili smo tekočinski kromatograf Agilent 1100, opremljen z binarno črpalko BinPump G1312A, termostatiranim avtomatskim vzorčevalnikom ALS G1329A, termostatom za avtomatski vzorčevalnik ALSTherm G1330B, termostatiranim predelom za kolono COLCOM G1316A in fluorescenčnim detektorjem FLD G1321A, ki je deloval pri valovni dolžini vzbujanja 290 nm in emisijski valovni dolžini 330 nm. Separacija je potekala na koloni Phenomenex Luna (250×4,60 mm), polnjeni s silikagelom z velikostjo delcev 5 µm. Kot mobilno fazo smo uporabili heksan/izopropanol (99,3:0,7, v/v) s pretokom 1,0 mL/min. Izomeri so eluirali v naslednjem zaporedju: α-tokoferol, β-tokoferol, γ-tokoferol, δ-tokoferol. Izdelali smo kalibracijsko krivuljo za območje 30 – 1070 mg/kg. Koeficient linearnosti r je znašal 0,99996. Standardizacijo raztopin za pripravo kalibracijske krivulje smo izvedli z merjenjem absorbance metanolnih raztopin posmaznega izomera.

3.2.8 Določevanje vsebnosti skupnih karotenoidov

Karotenoide smo določevali po metodi, ki so jo opisali Mínguez-Mosquera in sod. (1991). Pripravili smo 10 mL raztopine olja v heksanu (0,3 g/mL) in izmerili absorbanco pri 472 nm proti heksanu. Rezultat smo izračunali s podanim ekstinkcijskim koeficientom ($E_0 = 613$).

3.2.9 Določevanje vsebnosti skupnih klorofilnih pigmentov

Klorofilne pigmente smo določevali z dvema spektrofotometrijskima metodama.

3.2.9.1 Metoda po Mínguez-Mosqueri

Vsebnost skupnih klorofilnih pigmentov smo določali po metodi, ki so jo opisali Mínguez-Mosquera in sod. (1991). Pripravili smo 10 mL raztopine olja v heksanu (0,3 g/mL) in izmerili absorbanco pri 670 nm proti heksanu. Rezultat smo izračunali s podanim ekstinkcijskim koeficientom ($E_0 = 2000$).

3.2.9.2 Metoda po Pokornju

Pokorny in sod. (1995) so opisali metodo za določevanje klorofilnih pigmentov, izraženih kot feofitin *a*, v surovih rastlinskih oljih. Spodnja meja določevanja klorofilnih pigmentov po tej metodi je 1 mg/kg.

Izmerili smo absorbance vzorca pri 630, 670 in 710 nm proti zraku kot referenci. Rezultat, izražen v mg feofitina *a* / kg olja, smo izračunali po enačbi:

$$C = \frac{345,3 \times (A_{670} - 0,5 \times A_{630} - 0,5 \times A_{710})}{L} \quad \dots(20)$$

kjer je: C... vsebnost klorofilnih pigmentov (mg feofitina *a*/ kg olja)
 A... absorbanca pri oznčeni valovni dolžini
 L... debelina merilne kivete (mm)

3.2.10 Izračun konstante hitrosti za razgradnjo pigmentov

Enačba za reakcijo prvega reda ima obliko

$$\ln (P) = - k \times t + \ln (P_0) \quad \dots(21)$$

kjer je: P vsebnost pigmenta v vzorcu v času t (mg/kg)
 P₀ ... vsebnost pigmenta pred segrevanjem (mg/kg)
 k konstanta hitrosti razgradnje pigmentov
 t čas (h)

3.2.11 Določevanje vsebnosti skupnih biofenolov – metoda FC

Skupne biofenole smo določevali po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). Odtehtali smo 5 g vzorca in ga s pomočjo 25 mL heksana prenesli v lij ločnik. Dodali smo 10 mL mešanice metanola in vode (6:4 m/m) in stresali 2 minuti. Po ločitvi plasti smo iz lija ločnika odtočili polarno fazo in ekstrakcijo ponovili še dvakrat. Združene polarne faze smo

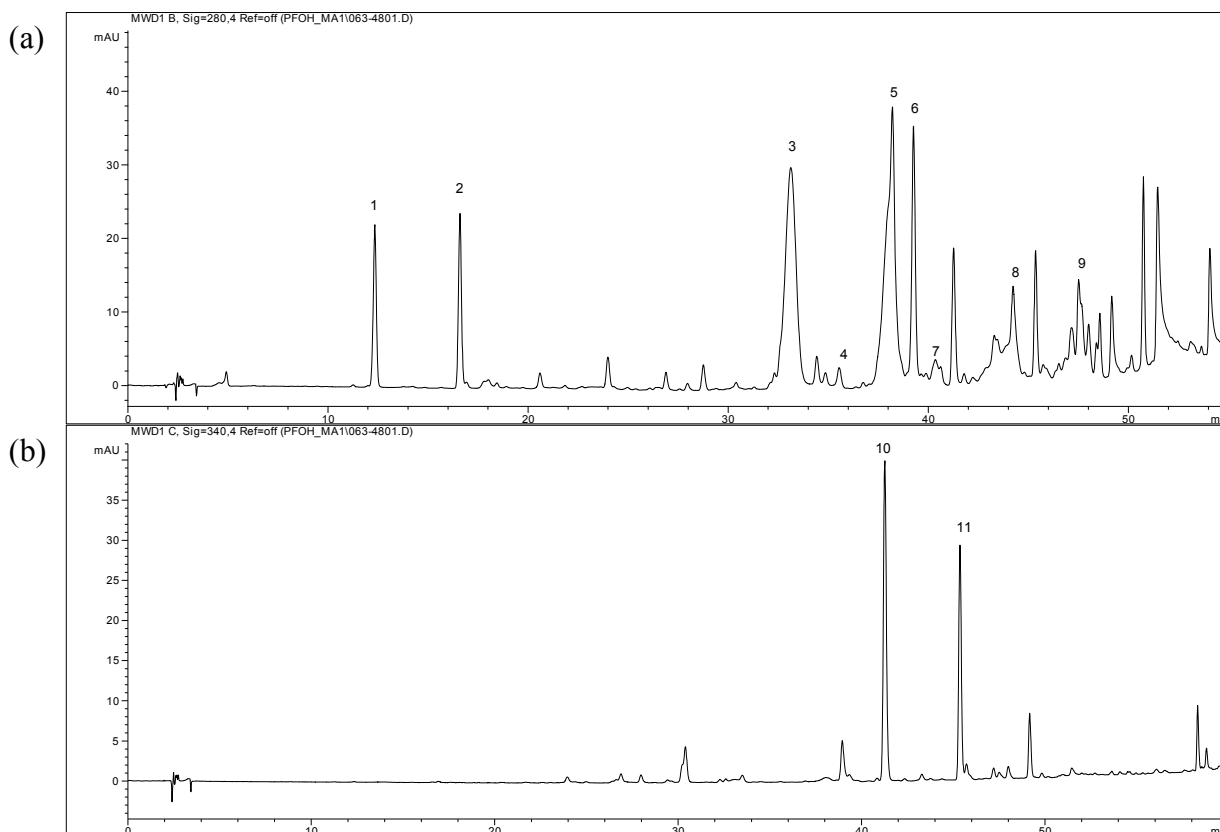
posušili s pomočjo rotavaporja pri 40 °C. Suhemu preostanku smo takoj dodali 1 mL metanola in ga do spektrofotometrijske določitve shranili v hladilniku.

V 10 mL-merilno bučko smo dali 5 mL vode in dodali 100 µL metanolnega ekstrakta. Dodali smo 0,5 mL regenta Folin-Ciocalteu. Točno po treh minutah smo dodali 1 mL nasičene raztopine natrijevega karbonata in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Merili smo pri 725 nm točno po eni uri. Kot referenčno raztopino smo uporabili raztopino, ki smo jo pripravili po enakem postopku brez dodatka ekstrakta.

Umeritveno krivuljo smo pripravili z raztopino kavne kisline, zato je rezultat izražen v mg kavne kisline / kg olja.

3.2.12 Določevanje biofenolne sestave s HPLC

Za določevanje biofenolne sestave smo uporabili iste ekstrakte kot za določevanje skupnih biofenolov z metodo FC. Uporabili smo tekočinski kromatograf Agilent 1100, opremljen z binarno črpalko BinPump G1312A, termostatiranim avtomatskim vzorčevalnikom ALS G1329A, termostatom za avtomatski vzorčevalnik ALSTherm G1330B, termostatiranim predelom za kolono COLCOM G1316A in UV detektor, ki omogoča sočasno detekcijo pri različnih valovnih dolžinah. Separacija je potekala na koloni Phenomenex LUNA ODS2 (5 µm i.d., 250×4,6 mm). Biofenole smo določevali po modificirani metodi Cortesi in sod. (2002). Separacija je potekala z gradientno elucijo pri pretoku mobilne faze 1 mL/min. Mobilna faza A je bila raztopina fosforne kisline (1000 mL vode in 2 mL 98 % fosforne kisline), mobilna faza B pa mešanica metanola in acetonitrila (1:1, v/v). Sestava mobilne faze ob začetku analize je bila 96 % raztopine A in 4 % raztopine B. Delež raztopine A se je znižal na 50 % po 40 minutah analize, na 40 % po 45 minutah analize in na 0 % po 60 minutah analize. Naslednjih 10 minut je bil delež raztopine B 100 %, potem pa se je v 2 minutah znižal nazaj na 4 %. Da bi dosegli boljšo resolucijo, je določevanje potekalo pri 15 °C. Flavonoida luteolin in apigenin smo določali pri 340 nm, vse ostale biofenole pa pri 280 nm. Primer kromatograma je predstavljen na sliki 7.



Slika 7: Kromatogram za določevanje biofenolov v ekstra deviškem oljčnem olju. (a): 280 nm; (b): 340 nm. Identifikacija spojin: (1) hidroksitirozol, (2) tirozol, (3) DMO-Agl-dA, (4) O-Agl-dA, (5) DML-Agl-dA, (6) lignani, (7) L-Agl-dA, (8) O-Agl, (9) L-Agl, (10) luteolin in (11) apigenin.

Figure 7: Chromatogram for determination of biophenol composition in extra virgin olive oil. (a): 280 nm; (b): 340 nm. Peaks correspond to (1) hydroxytyrosol, (2) tyrosol, (3) DMO-Agl-dA, (4) O-Agl-dA, (5) DML-Agl-dA, (6) lignans, (7) L-Agl-dA, (8) O-Agl, (9) L-Agl, (10) luteolin, and (11) apigenin.

Pripravili smo umeritvene krivulje za hidroksitirozol, tirozol, luteolin in apigenin. Za spojine, za katere nismo imeli na voljo standardnih spojin, smo predpostavili, da imajo enak odziv na detektorju kot tirozol.

Hidroksitirozol smo sintetizirali iz 3,4-dihidroksifenilacetne kisline (Baraldi in sod., 1983). Produkt sinteze ni bil čist, ampak je vseboval tudi izhodno spojino, kar smo pokazali s HPLC-kromatogramom: na kromatogramu sta vidna dva vrhova: za hidroksitirozol in za 3,4-dihidroksifenilacetno kislino. Količino slednje smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, pripravljene s 3,4-dihidroksifenilacetno kislino. Količino hidroksitirozola v produktu sinteze smo izračunali kot razliko med maso celotnega produkta in določeno maso 3,4-dihidroksifenilacetne kisline v produktu.

3.2.13 Določevanje antioksidacijske učinkovitosti

3.2.13.1 Priprava ekstrakta

Ekstrakte za določevanje antioksidacijske aktivnosti smo pripravili na podoben način kot za določevanje biofenolov. 10 g olja smo raztopili v 50 mL heksana in ekstrahirali trikrat z 20 mL metanola in vode (6:4 m/m). Ostanke maščobe smo iz združenih metanolnih frakcij odstranili z ekstrahiranjem s 50 mL heksana. Med polarno in nepolarno fazo je nastala obstojna plast emulzije. Spodnjo bistro polarno fazo smo spustili iz lija ločnika v čisto čašo, emulzijo pa v 50-mL cenrifugirko. Emulzijo smo centrifugirali 2 minuti s 4000 obrati na minuto. Spodnjo polarno plast smo prenesli v čašo k polarni fazi iz lija ločnika. Topilo smo odparili z rotavaporjem pri 40 °C in suh preostanek raztopili v 2 mL metanola. Do analize smo ga hranili pri –20 °C.

3.2.13.2 Določitev antioksidacijske učinkovitosti

V kiveto (1 cm) smo dali 3 mL raztopine DPPH (10^{-4} mol/L) in izmerili absorbanco A_0 pri 515 nm. Dodali smo od 0 do 300 μ L metanola (V_m) in $(300-V_m)$ μ L pripravljenega ekstrakta, ki smo ga po potrebi predhodno razredčili (za faktor redčenja F). Kiveto smo postavili v temo in točno 15 minut po dodatku ekstrakta ponovno izmerili absorbanco A_{15} . Za vsak vzorec smo opravili najmanj štiri meritve z različnimi volumni dodanega ekstrakta. Volumne smo izbirali tako, da sta bili najmanj dve meritvi A_{15} manjši od $A_0/2$ in najmanj dve meritvi A_{15} večji od $A_0/2$.

Antioksidacijsko učinkovitost podajamo kot I_{50} , ki je po definiciji masa olja, ki razgradi polovico 1 mL raztopine DPPH. Rezultat smo dobili z grafičnim postopkom. Narisali smo graf, v katerem smo na absciso nanašali tretjino mase olja, dodanega v kiveto z DPPH, na ordinato pa delež nerazgrajenega DPPH po 15 minutah. Vrednosti, ki smo jih vnašali v graf, smo izračunali po enačbah 22 in 23.

$$M = \frac{m \times V_v \times F}{6000} \quad \dots(22)$$

kjer je:

M masa olja, dodanega v kiveto (mg)

m odtehta olja pri pripravi ekstrakta (g)

V_V volumen (razredčenega) ekstrakta, ki ga dodamo v kiveto (μL)

F faktor redčenja ekstrakta

$$\% \text{ preostalega DPPH} = \frac{1,1 \times A_{15}}{A_0} \quad \dots(23)$$

kjer je:

A₀ absorbanca raztopine DPPH

A₁₅ absorbanca 15 minut po dodatku metanola in ekstrakta

Z grafa smo z linearno interpolacijo določili I₅₀ (maso olja, ki bi v 15 minutah razpolovila absorbanco 1 mL raztopine DPPH). ARP izračunamo kot 1/I₅₀.

3.2.14 Določevanje oksidacijske stabilnosti olja

Oksidacijsko stabilnost smo določili s pomočjo aparata Rancimat (Metrohm 679, Herisau, Switzerland). Pred analizo smo vzorce v temi na sobni temperaturi prefiltrirali preko brezvodnega natrijevega sulfata. V celico smo odtehtali 3 g vzorca. Določitev indukcijskega časa je potekala pri 100 °C in s pretokom zraka 10 L/h. Indukcijski čas je bil določen kot čas, v katerem je bil prevoj krivulje prevodnosti destilirane vode.

Pogoji določevanja:

- Oksidacijsko stabilnost vzorcev v sklopu ugotavljanja sprememb med skladiščenjem (ti vzorci so bili vključeni tudi v poskus segrevanja vzorcev v Rancimatu) smo določevali pri pogojih, ki jih je opisal Gutiérrez-Rosales (1989): 100 °C in pretok zraka 10 L/h.
- Oksidacijsko stabilnost vzorcev pred stournim segrevanjem in po njem smo določevali z Rancimatom pri 110 °C in pretoku zraka 10 L/h.

3.2.15 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software, Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model).

V statistične modele smo vključili več vplivov ter interakcijo teh vplivov. Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

Statistični model za skladiščenje:

$$y_{ij} = \mu + S_i + T_j + S*T_{ij} + e_{ij} \quad \text{Statistični model 1}$$

kjer je:

y_{ij} opazovana vrednost

μ povprečna vrednost

S_i vpliv sorte: 'Istrska belica', 'Leccino' in mešane sorte

T_j vpliv skladiščenja: sveži vzorci; vzorci, skladiščeni v zmrzovalniku pri -20 °C; vzorci, skladiščeni v hladilniku pri 8 °C

$S*T_{ij}$ interakcija sorte in skladiščenja

e_{ij} ostanek

Statistični model za segrevanje v Rancimatu:

$$y_{ij} = \mu + S_i + P_j + S * P_{ij} + e_{ij} \quad \text{Statistični model 2}$$

kjer je:

- y_{ij} opazovana vrednost
- μ povprečna vrednost
- S_i vpliv sorte: 'Istrska belica', 'Leccino' in mešane sorte
- P_j vpliv segrevanja: pred segrevanjem in po njem
- $S * P_{ij}$ interakcija sorte in segrevanja
- e_{ij} ostanek

Statistični model za osemurno segrevanje pri 100 °C in 180 °C:

$$y_{ijk} = \mu + O_i + T_j + C_k + O * T * C_{ijk} + e_{ij} \quad \text{Statistični model 3}$$

kjer je:

- y_{ij} opazovana vrednost
- μ povprečna vrednost
- O_i vpliv olja: EDOO sorte 'Istrska belica', EDOO sorte 'Leccino', sončnično olje
- T_j vpliv temperature segrevanja: 100 °C in 180 °C
- C_k vpliv časa segrevanja: 0, 2, 4, 6 in 8 ur
- $O * T * C_{ijk}$ interakcija olja, temperature in časa segrevanja
- e_{ijk} ostanek

Statistični model za stourno segrevanje pri 180 °C:

$$y_{ij} = \mu + O_i + P_j + O * P_{ij} + e_{ij} \quad \text{Statistični model 4}$$

kjer je:

- y_{ij} opazovana vrednost
- μ povprečna vrednost
- O_i vpliv olja: EDOO sorte 'Istrska belica', EDOO sorte 'Leccino', sončnično olje
- P_j vpliv segrevanja: pred segrevanjem, po segrevanju
- $O * P_{ij}$ interakcija olja in segrevanja
- e_{ij} ostanek

4 REZULTATI

Rezultate eksperimentalnega dela, v katerem smo proučevali oksidacijsko stabilnost oljčnega olja, smo zbrali v štiri sklope glede na vpliv:

- skladiščenja pri različnih pogojih,
- segrevanja olja v Rancimatu,
- osemurnega segrevanja olja pri 100 °C in 180 °C,
- stournega segrevanja olja pri 180 °C.

4.1 REZULTATI ANALIZ EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA SKLADIŠČENEGA PRI RAZLIČNIH POGOJIH

V tem poglavju so podani rezultati analiz štirinajstih vzorcev ekstra deviškega oljčnega olja:

- svežih vzorcev pred skladiščenjem,
- vzorcev po enem letu skladiščenja pri –20 °C,
- vzorcev po enem letu skladiščenja pri 8 °C.

4.1.1 Rezultati analiz parametrov kakovosti v svežih in v eno leto skladiščenih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

V skladu z Uredbo Komisije (EGS) št. 2568/91 (Uredba Komisije..., 1991) se kakovost oljčnega olja ugotavlja na podlagi rezultatov treh fizikalno-kemijskih določevanj: kislosti, peroksidnega števila in spektrofotometrijske preiskave v UV. Rezultati teh določitev v svežih vzorcih in v vzorcih, skladiščenih eno leto pri –20 °C in pri 8 °C, so podani v Preglednici 4.

Preglednica 4: Povprečne vrednosti parametrov kakovosti v svežih in v skladiščenih (eno leto pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Table 4: Average quality parameters in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and at $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one year

Parameter	Sorta	Vzorci ekstra deviškega oljčnega olja		
		Sveži	Po enem letu skladiščenja	
			pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$
kislost (ut. %)	IB	0,14 ^{aA}	0,15 ^{aA}	0,16 ^{aA}
	L	0,07 ^{bB}	0,08 ^{bAB}	0,09 ^{bA}
	Mv	0,12 ^{aB}	0,13 ^{aAB}	0,14 ^{aA}
peroksidno število (mmol O ₂ /kg)	IB	2,4 ^{aB}	3,1 ^{aB}	6,6 ^{aA}
	L	2,0 ^{aC}	3,1 ^{aB}	6,6 ^{aA}
	Mv	2,37 ^{aB}	2,95 ^{aAB}	3,13 ^{aA}
K ₂₃₂	IB	1,669 ^{aB}	1,719 ^{aB}	1,849 ^{aA}
	L	1,622 ^{aB}	1,692 ^{aB}	1,890 ^{aA}
	Mv	1,795 ^{aA}	1,782 ^{aA}	1,841 ^{aA}
K ₂₇₀	IB	0,133 ^{aA}	0,137 ^{aA}	0,143 ^{bA}
	L	0,120 ^{aA}	0,126 ^{aA}	0,132 ^{bA}
	Mv	0,143 ^{aB}	0,149 ^{aB}	0,203 ^{aA}
ΔK	IB	-0,001 ^{aAB}	-0,002 ^{aB}	-0,001 ^{abA}
	L	-0,001 ^{aA}	-0,002 ^{aA}	-0,001 ^{bA}
	Mv	-0,001 ^{aB}	-0,001 ^{aB}	0,002 ^{aA}

Sorta: IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte.

^{a, b, c} Srednje vrednosti posameznega parametra v istem stolpcu, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

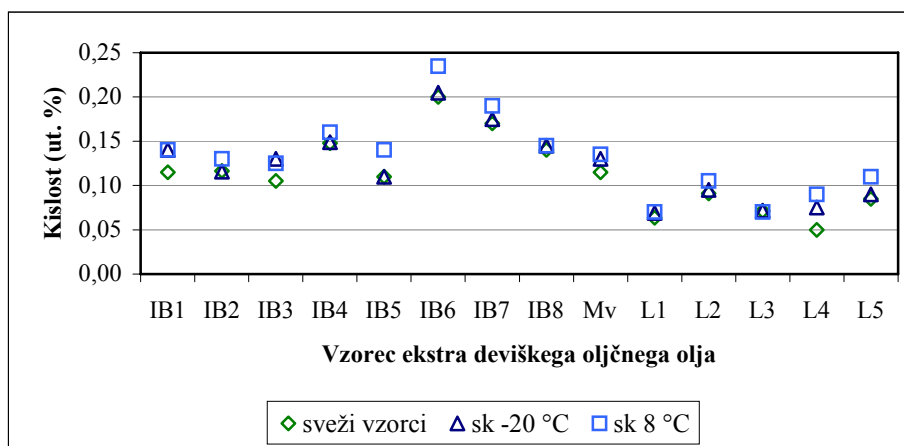
^{A, B, C} Srednje vrednosti v isti vrstici, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

Cultivar: IB: *Istrska belica*; L: *Leccino*; Mv: mixed cultivars.

^{a, b, c} The average values of individual parameter in the same column, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

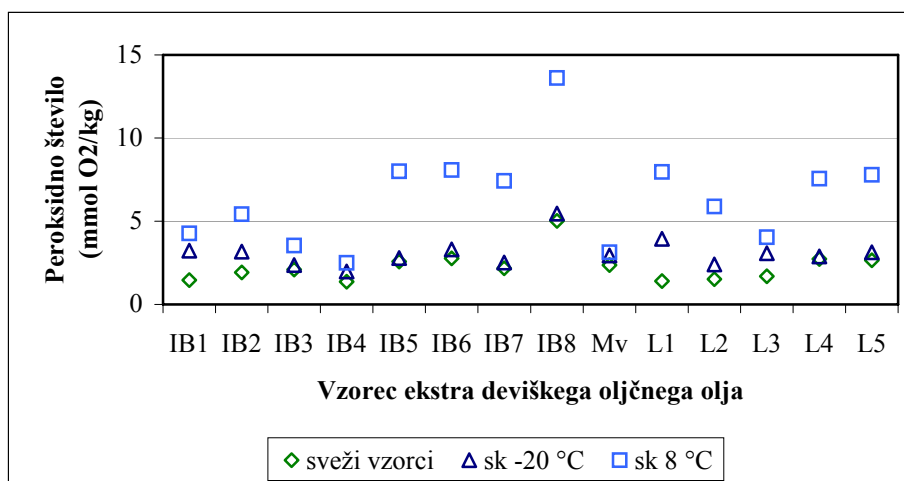
^{A, B, C} The average values in the same row, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

S slike 8 je razvidno, da so sveži vzorci 'Istrske belice' vsebovali več prostih maščobnih kislin kot vzorci 'Leccina'. V enem letu skladiščenja vzorcev pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se je kislost povečala, vendar povečanje ni bilo statistično značilno. Nekoliko bolj se je kislost v skladu s pričakovanji povečala pri skladiščenju v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, vendar je bila kislost statistično značilno večja od kislosti v svežih vzorcih le v vzorcih 'Leccina'. Tudi po enem letu skladiščenja je bila kislost v vseh vzorcih še daleč pod mejo za ekstra deviško oljčno olje ($\leq 0,8\text{ ut. }%$).



Slika 8: Kislost v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

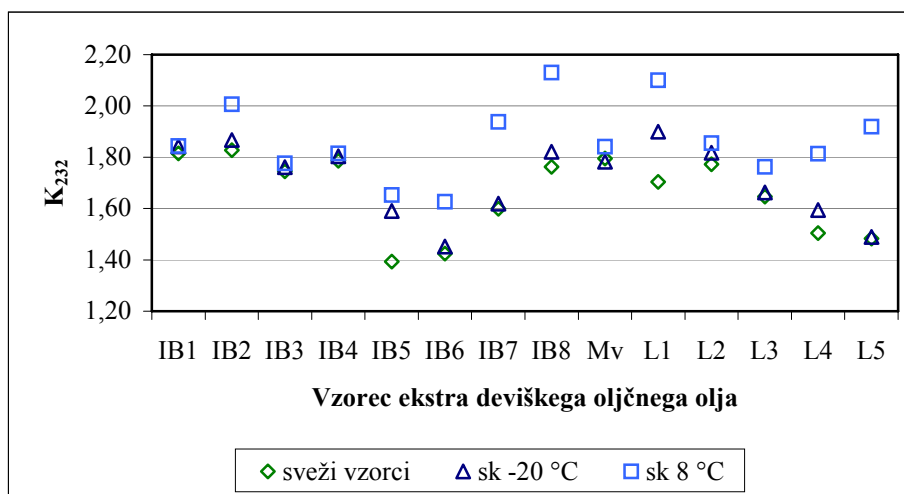
Figure 8: Acidity in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at -20 °C and at 8 °C for one year



Slika 9: Peroksidno število v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Figure 9: Peroxide value in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at -20 °C and at 8 °C for one year

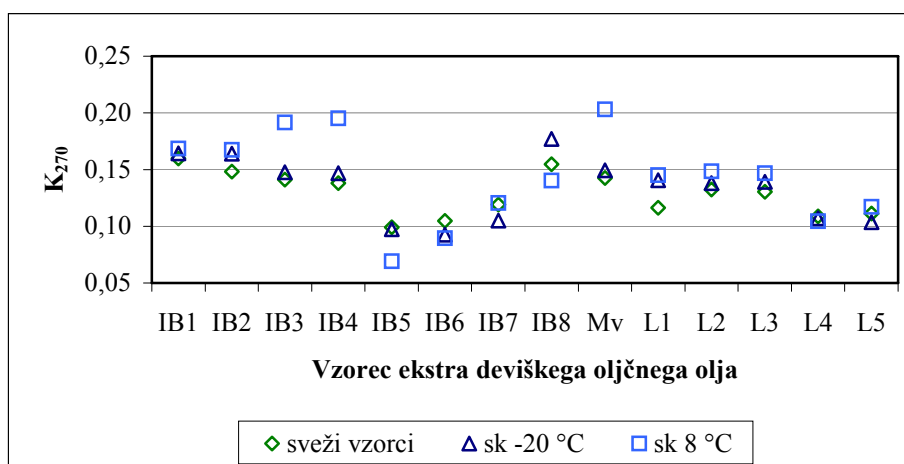
Med svežimi olji obeh sort ni bilo statistično značilnih razlik v peroksidnem številu. Pri skladiščenju v zmrzovalniku se je peroksidno število rahlo povečalo, močno pa se je povečalo v vzorcih, skladiščenih v hladilniku. Na sliki 9 je razvidno, da se je peroksidno število bistveno bolj povečalo v vzorcih 'Istrske belice' letnika 2004 (vzorci IB5 do IB8) kot v vzorcih 'Istrske belice' letnika 2003 (vzorci IB1 do IB4). Pri vzorcih sorte Leccino niso opazne tako velike razlike med letnikoma.



Slika 10: Vrednost K_{232} v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Figure 10: K_{232} in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at -20 °C and at 8 °C for one year

Vrednost K_{232} je bila v obeh sortah EDOO letnika 2003 nekoliko višja kot v vzorcih letnika 2004. Med skladiščenjem v zmrzovalniku se je vrednost statistično neznačilno povišala, med skladiščenjem v hladilniku pa je bilo zvišanje vrednosti K_{232} statistično značilno. Enako velja za vrednost K_{270} (slika 11).



Slika 11: Vrednost K_{270} v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Figure 11: K_{270} in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at -20 °C and at 8 °C for one year

4.1.2 Rezultati določevanja maščobnokislinske sestave v svežih in v eno leto skladiščenih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Preglednica 5 podaja maščobnokislinsko sestavo v svežih in v skladiščenih vzorcih.

Preglednica 5: Povprečna maščobnokislinska sestava v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Table 5: Average fatty acid composition in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of EVOO stored at -20 °C and at 8 °C for one year

Maščobna kislina (ut. %)	Sorta	Vzorci ekstra deviškega oljčnega olja		
		Sveži	Po enem letu skladiščenja	
			pri -20 °C	pri 8 °C
C 14:0	IB	0,01 ^{aA}	0,01 ^{aA}	0,01 ^{aA}
	L	0,01 ^{aA}	0,02 ^{aA}	0,01 ^{bA}
	Mv	0,01 ^{abB}	0,01 ^{aA}	0,01 ^{abB}
C 16:0	IB	11,88 ^{aA}	12,13 ^{bA}	12,16 ^{bA}
	L	13,06 ^{aA}	13,17 ^{aA}	13,25 ^{aA}
	Mv	13,16 ^{aA}	12,63 ^{abC}	12,81 ^{abB}
C 16:1	IB	1,07 ^{bA}	1,10 ^{bA}	1,10 ^{bA}
	L	1,39 ^{aA}	1,40 ^{aA}	1,41 ^{aA}
	Mv	1,31 ^{abA}	1,24 ^{abB}	1,26 ^{abB}
C 17:0	IB	0,06 ^{aA}	0,06 ^{aA}	0,06 ^{aA}
	L	0,05 ^{bA}	0,05 ^{bA}	0,05 ^{bA}
	Mv	0,06 ^{aA}	0,05 ^{aB}	0,06 ^{aA}
C 17:1	IB	0,10 ^{aA}	0,10 ^{aA}	0,11 ^{aA}
	L	0,10 ^{aA}	0,10 ^{aA}	0,11 ^{aA}
	Mv	0,11 ^{abB}	0,11 ^{aA}	0,11 ^{abB}
C 18:0	IB	3,18 ^{aA}	3,17 ^{aA}	3,17 ^{aA}
	L	2,29 ^{cA}	2,29 ^{cA}	2,28 ^{cA}
	Mv	2,82 ^{bB}	2,89 ^{bA}	2,85 ^{bA}
C 18:1	IB	76,50 ^{aA}	76,27 ^{aA}	76,26 ^{aA}
	L	74,54 ^{aA}	74,47 ^{aA}	74,40 ^{aA}
	Mv	74,4 ^{aC}	74,87 ^{aA}	74,87 ^{abB}
C 18:2	IB	5,56 ^{bA}	5,54 ^{bA}	5,53 ^{aA}
	L	7,06 ^{aA}	7,00 ^{aA}	6,99 ^{aA}
	Mv	6,57 ^{abA}	6,55 ^{abA}	6,55 ^{aA}
C 18:3	IB	0,57 ^{bA}	0,56 ^{bA}	0,56 ^{bA}
	L	0,71 ^{aA}	0,70 ^{aA}	0,70 ^{abA}
	Mv	0,70 ^{aA}	0,69 ^{aA}	0,69 ^{aA}

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5: Povprečna maščobnokislinska sestava v svežih in v skladiščenih (eno leto pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Maščobna kislina (ut. %)	Sorta	Vzorci ekstra deviškega oljčnega olja		
		Sveži	Po enem letu skladiščenja	
			pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$
C 20:0	IB	0,51 ^{aA}	0,51 ^{aA}	0,50 ^{aA}
	L	0,36 ^{bA}	0,37 ^{cA}	0,36 ^{aA}
	Mv	0,42 ^{bA}	0,46 ^{bA}	0,46 ^{aA}
C 20:1	IB	0,32 ^{aA}	0,32 ^{aA}	0,31 ^{aA}
	L	0,28 ^{aA}	0,28 ^{bA}	0,28 ^{aA}
	Mv	0,29 ^{aA}	0,31 ^{aA}	0,31 ^{aA}
C 22:0	IB	0,16 ^{aA}	0,16 ^{aA}	0,16 ^{aA}
	L	0,11 ^{bA}	0,11 ^{cA}	0,11 ^{aA}
	Mv	0,12 ^{bA}	0,14 ^{bA}	0,14 ^{aA}
C 24:0	IB	0,07 ^{aA}	0,08 ^{aA}	0,07 ^{aA}
	L	0,04 ^{bB}	0,05 ^{cAB}	0,05 ^{aA}
	Mv	0,04 ^{bA}	0,06 ^{bA}	0,06 ^{aA}

Sorta: IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte.

^{a, b, c} srednje vrednosti posameznega parametra v istem stolpcu, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

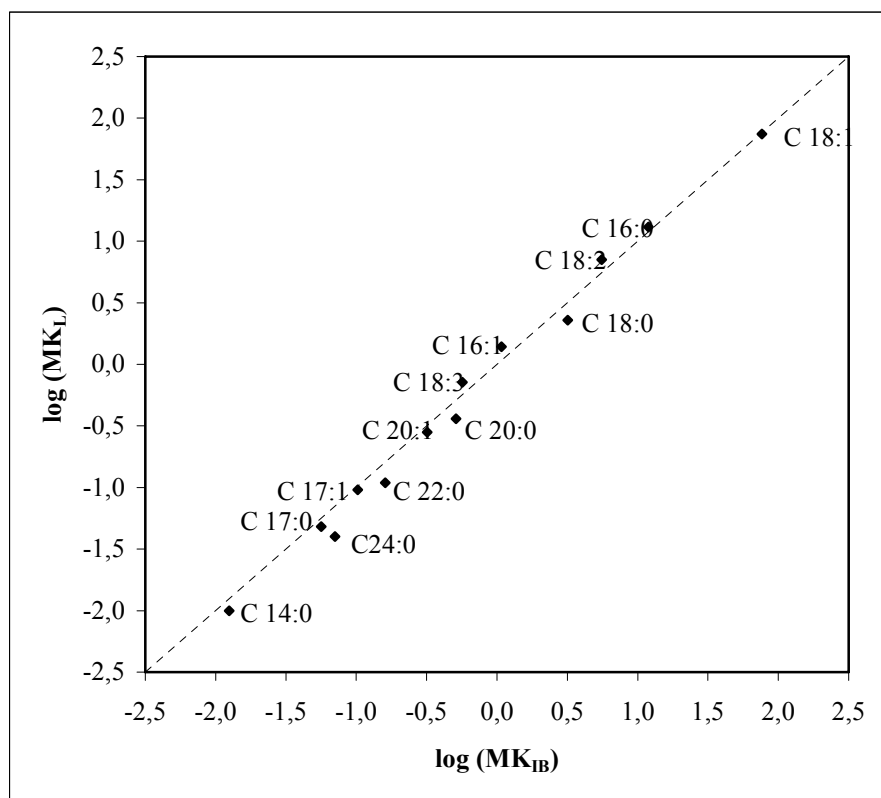
^{A, B, C} srednje vrednosti v isti vrstici, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

Cultivar: IB: *Istrska belica*; L: *Leccino*; Mv: mixed cultivars.

^{a, b, c} The average values of individual parameter in the same column, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

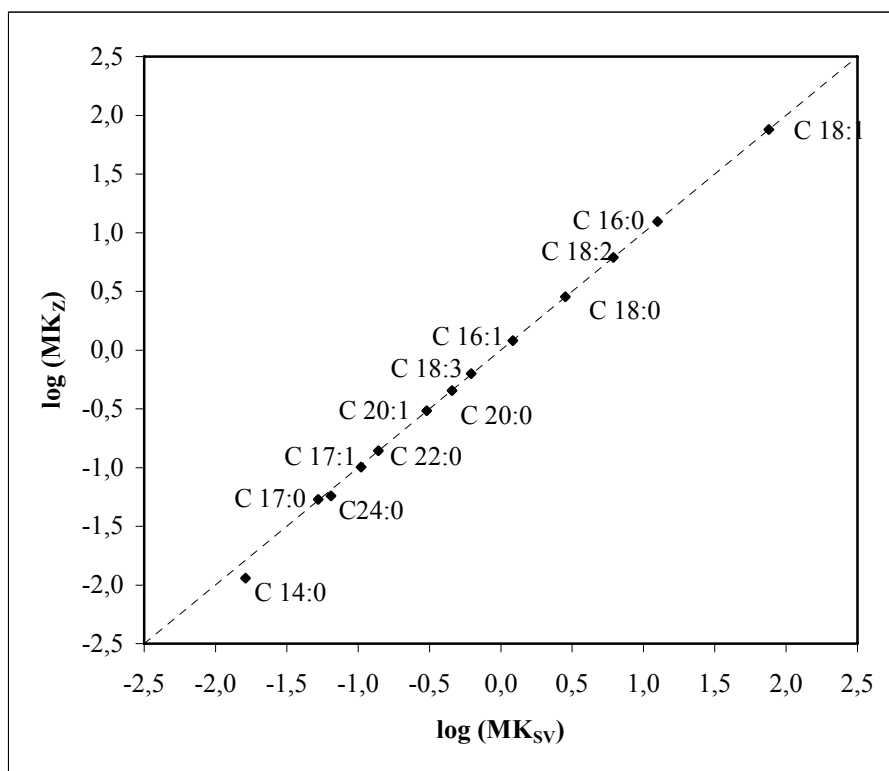
^{A, B, C} The average values in the same row, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

Na sliki 12 je podana primerjava med povprečno maščobnokislinsko sestavo v svežih EDOO sorte 'Istrska belica' in 'Leccino'. Olja sorte 'Leccino' vsebujejo v primerjavi z olji sorte 'Istrska belica' več tistih kislin, ki se na grafu nahajajo nad črtkano črto, in manj tistih kislin, ki se na grafu nahajajo pod črtkano črto. Z grafa je torej razvidno, da olja sorte 'Istrska belica' vsebujejo več nasičenih in enkrat nenasičenih maščobnih kislin kot olja sorte 'Leccino' (z izjemo palmitinske in palmitoleinske kisline, ki ju je več v oljih sorte 'Leccino'). Vsebnost večkrat nenasičenih kislin pa je večja v oljih sorte 'Leccino'.



Slika 12: Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' (MK_{IB}: % maščobne kisline v EDOO sorte 'Istrska belica'; MK_L: % maščobne kisline v ekstra deviškem oljčnem olju sorte 'Leccino')

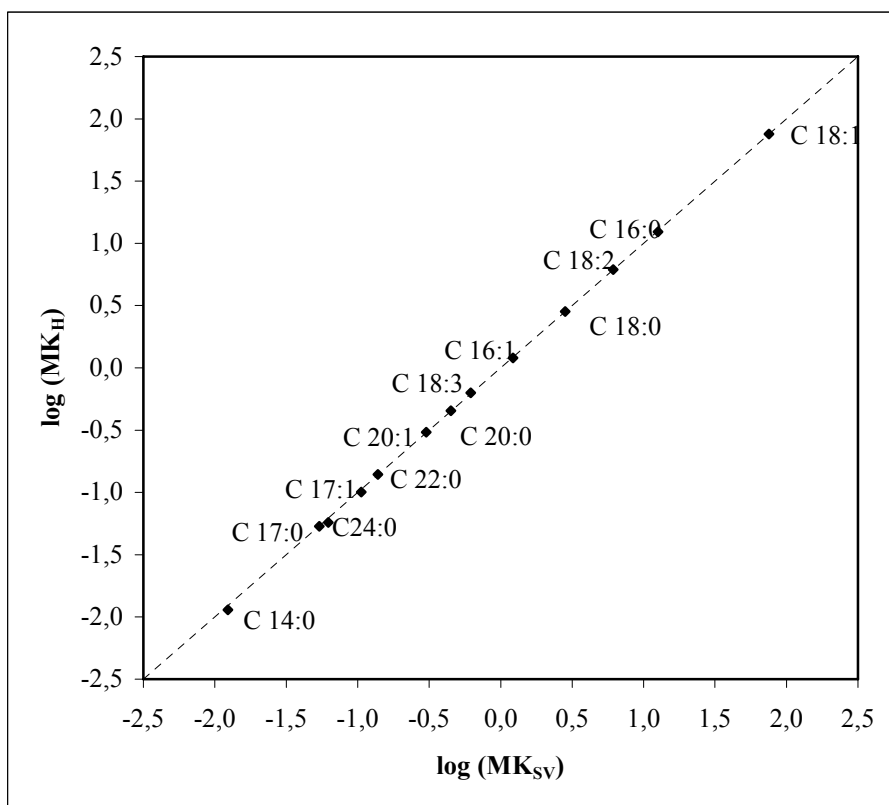
Figure 12: Comparison of average contents of individual fatty acids in extra virgin olive oil samples of *Istrska belica* and *Leccino* (MK_{IB}: % of fatty acid in extra virgin olive oil cv. *Istrska belica*; MK_L: % of fatty acid after in extra virgin olive oil cv. *Leccino*).



Slika 13: Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v svežih in v skladiščenih (eno leto pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja (MK_Z: % maščobne kisline v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja, skladiščenih eno leto v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; MK_{SV}: % maščobne kisline v svežih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja)

Figure 13: Comparison of average contents of individual fatty acids in fresh samples of extra virgin olive oil and in samples of extra virgin olive oil stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one year (MK_{SV}: % of fatty acid in fresh samples of extra virgin olive oil; MK_Z: % of fatty acid in samples of extra virgin olive oil stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one year)

Slika 13 prikazuje primerjavo med povprečno maščobnokislinsko sestavo v svežih vzorcih EDOO in v vzorcih, ki smo jih skladiščili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vse maščobne kisline razen miristinske kisline (C 14:0) ležijo na črtkani črti, torej je sestava ostala skoraj nespremenjena. Na sliki 14, ki prikazuje primerjavo med maščobnokislinsko sestavo v svežih vzorcih in v vzorcih skladiščenih pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, vidimo, da tudi pri skladiščenju v hladilniku ni prišlo do spremembe maščobnokislinske sestave.



Slika 14: Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v svežih in v skladiščenih (eno leto pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja (MK_H: % maščobne kisline v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja, skladiščenih eno leto v hladilniku pri 8 °C; MK_{sv}: % maščobne kisline v svežih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja)

Figure 14: Comparison of average contents of individual fatty acids in fresh samples of extra virgin olive oil and in samples of extra virgin olive oil stored at 8 °C for one year (MK_{sv}: % of fatty acid in fresh samples of extra virgin olive oil; MK_H: % of fatty acid in samples of extra virgin olive oil stored at 8 °C for one year)

4.1.3 Rezultati določevanja vsebnosti antioksidantov v svežih in v eno leto skladiščenih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Preglednica 6 podaja vsebnost antioksidantov (α -tokoferola in biofenolov) v svežih vzorcih EDOO in v oljih, skladiščenih pri -20 °C oziroma 8 °C.

Preglednica 6: Povprečna vsebnost α -tokoferola in biofenolov v svežih in v skladiščenih (eno leto pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Table 6: Average α -tocopherol and biophenols contents in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and at $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one year

Parameter (mg/kg)	Sorta	Vzorci ekstra deviškega oljčnega olja		
		Sveži	Po enem letu skladiščenja	
			pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$
α -tokoferol	IB	117 ^{cA}	112 ^{cA}	104 ^{cA}
	L	335 ^{aA}	317 ^{aA}	304 ^{aA}
	Mv	200 ^{bA}	196 ^{bB}	174 ^{bC}
vsebnost skupnih biofenolov po metodi FC	IB	467 ^{aA}	419 ^{abAB}	362 ^{abB}
	L	365 ^{aA}	299 ^{bB}	271 ^{bB}
	Mv	534 ^{aA}	522 ^{aA}	471 ^{aB}
vanilinska kislina	IB	0,2 ^{aA}	0,3 ^{aA}	0,2 ^{aA}
	L	0,3 ^{aA}	0,4 ^{aA}	0,4 ^{aA}
	Mv	< LOD ^{abB}	0,2 ^{aA}	0,2 ^{aA}
lignani	IB	50,5 ^{aA}	43,9 ^{aAB}	35,1 ^{aB}
	L	13,2 ^{bA}	11,4 ^{bA}	10,6 ^{bA}
	Mv	31,4 ^{bB}	36,4 ^{aA}	24,3 ^{aC}
luteolin	IB	4,0 ^{aA}	3,5 ^{aAB}	3,1 ^{aB}
	L	2,9 ^{aA}	2,7 ^{aA}	2,4 ^{aA}
	Mv	2,8 ^{aB}	3,8 ^{aA}	2,8 ^{aB}
apigenin	IB	2,5 ^{aA}	2,1 ^{aAB}	1,9 ^{aB}
	L	1,2 ^{bA}	1,0 ^{bA}	0,9 ^{bA}
	Mv	1,5 ^{abB}	2,0 ^{aA}	1,5 ^{abB}
oleuropein	IB	14,1 ^{aA}	10,3 ^{aA}	4,1 ^{bB}
	L	6,2 ^{bA}	2,0 ^{aB}	0,7 ^{bB}
	Mv	13,7 ^{aA}	14,3 ^{aA}	9,7 ^{aA}
O-Agl-A	IB	63,1 ^{aA}	47,5 ^{abAB}	29,7 ^{aB}
	L	17,9 ^{bA}	16,6 ^{bA}	11,6 ^{bA}
	Mv	49,0 ^{abA}	50,2 ^{aA}	28,4 ^{aB}
O-Agl-dA	IB	21,6 ^{aA}	12,8 ^{aB}	7,1 ^{abB}
	L	4,6 ^{bA}	2,8 ^{bB}	2,0 ^{bB}
	Mv	17,2 ^{aA}	10,9 ^{abB}	10,7 ^{aB}
DMO-Agl-dA	IB	120,5 ^{aA}	98,9 ^{bAB}	61,9 ^{cB}
	L	166,2 ^{aA}	157,9 ^{abA}	124,1 ^{bA}
	Mv	162,7 ^{aB}	223,2 ^{aA}	167,0 ^{aB}

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 6: Povprečna vsebnost α -tokoferola in biofenolov v svežih in v skladiščenih (eno leto pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Parameter (mg/kg)	Sorta	Vzorci ekstra deviškega oljčnega olja		
		Sveži	Po enem letu skladiščenja	
			pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$
(DMO-Agl-dA)ox	IB	9,7 ^{aA}	15,9 ^{aA}	13,3 ^{aA}
	L	2,2 ^{aB}	6,7 ^{aA}	6,4 ^{aA}
	Mv	< LOD ^{aC}	14,1 ^{aA}	12,8 ^{aB}
TyrOH	IB	12,5 ^{aA}	15,6 ^{aA}	7,6 ^{aA}
	L	2,3 ^{aAB}	2,8 ^{aA}	1,4 ^{bB}
	Mv	7,9 ^{aA}	16,8 ^{aA}	6,4 ^{aA}
L-Agl-A	IB	41,5 ^{aA}	28,1 ^{aB}	11,8 ^{aC}
	L	7,3 ^{bAB}	7,7 ^{aA}	3,9 ^{bB}
	Mv	26,9 ^{abA}	18,4 ^{aB}	7,9 ^{abC}
L-Agl-dA	IB	33,4 ^{aA}	25,2 ^{aB}	15,5 ^{aC}
	L	4,1 ^{bA}	3,1 ^{bAB}	2,0 ^{bB}
	Mv	23,4 ^{aA}	24,1 ^{aB}	17,1 ^{aA}
DML-Agl-dA	IB	142,8 ^{aA}	118,2 ^{abA}	66,2 ^{bB}
	L	103,6 ^{aA}	86,5 ^{bA}	66,5 ^{bA}
	Mv	156,4 ^{aB}	217,8 ^{aA}	137,0 ^{aC}
(DML-Agl-dA)ox	IB	10,3 ^{aA}	19,5 ^{aA}	13,4 ^{aA}
	L	8,6 ^{aB}	23,6 ^{aA}	13,7 ^{aAB}
	Mv	< LOD ^{aB}	< LOD ^{aB}	15,8 ^{aA}
Tyr	IB	17,3 ^{aA}	22,7 ^{aA}	12,0 ^{aA}
	L	3,6 ^{aA}	3,4 ^{aA}	2,8 ^{aB}
	Mv	7,6 ^{aB}	11,3 ^{aA}	6,3 ^{aC}
Skupni biofenoli, določeni s HPLC	IB	544 ^{aA}	464 ^{abA}	283 ^{bB}
	L	344 ^{bA}	329 ^{bA}	249 ^{bA}
	Mv	500 ^{aB}	643 ^{aA}	447 ^{aC}

Sorta: IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte

LOD: meja detekcije.

^{a, b, c} srednje vrednosti posameznega parametra v istem stolpcu, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

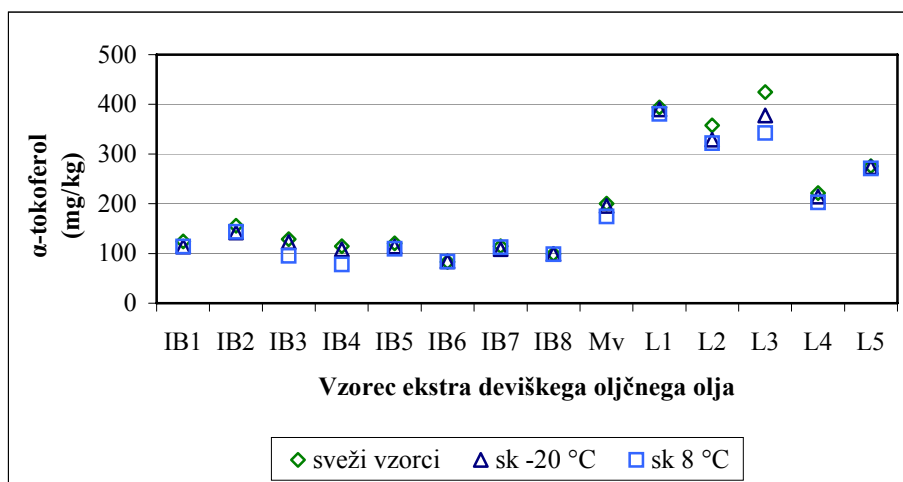
^{A, B, C} srednje vrednosti v isti vrstici, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

Cultivar: IB: *Istrska belica*; L: *Leccino*; Mv: mixed cultivars.

LOD: limit of detection.

^{a, b, c} The average values of individual parameter in the same column, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

^{A, B, C} The average values in the same row, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

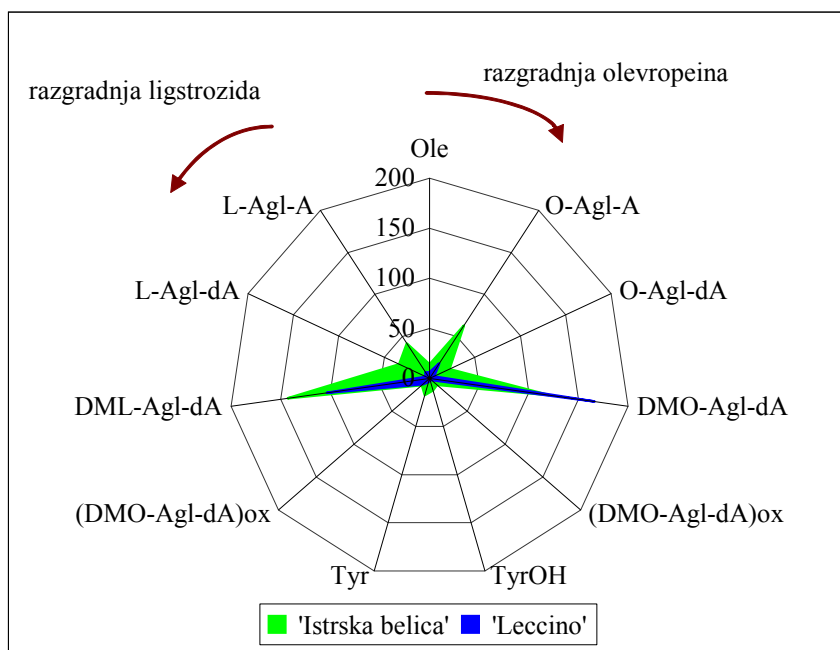


Slika 15: Vsebnost α -tokoferola v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Figure 15: α -tocopherol content in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at -20 °C and at 8 °C for one year

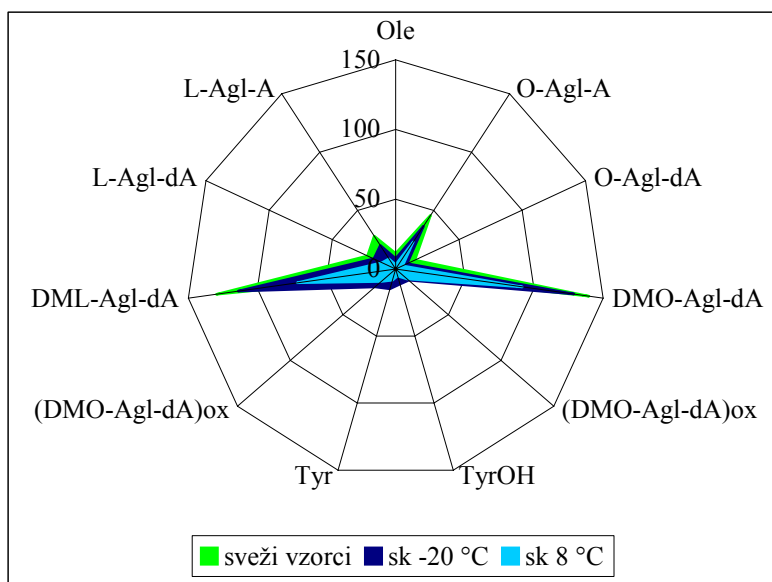
Ena najbolj očitnih razlik med oljčnim oljem obravnavanih sort je vsebnost α -tokoferola. V oljih sorte 'Leccino' smo ga določili mnogo več kot v oljih sorte 'Istrska belica'. Zmanjšanje vsebnosti tokoferolov med skladiščenjem je bila zanemarljivo tako v zmrzovalniku kot tudi v hladilniku (slika 15).

V svežih vzorcih so prevladovali sekoiridoidni biofenoli. Slika 16 prikazuje vsebnost sekoiridoidnih biofenolov in njihovih derivatov v svežih vzorcih. Na desni strani polarnega grafa so od vrha proti dnu po vrsti razvrščene spojine, ki so sestavni del razgradne poti oleuropeina, opisane v poglavju 2.1.5, na levi strani grafa pa so od vrha proti dnu razvrščeni razgradni produkti ligstrozida. Vzorci so vsebovali majhne količine oleuropeina. S slike je razvidno, da sta v vzorcih prevladovali obe dialdehidni obliki dekarboksimetil aglikonov, sledila sta oba aglikona in dialdehidni obliki aglikonov. Končnih razgradnih produktov – tirosola in hidroksitirosola je bilo malo. Slika je približno simetrična - razgradna pot je pri ligstrozidu približno enako napredovala kot pri oleuropeinu. Razmerje med vsoto obeh aglikonov in vsoto obeh dialdehidnih oblik dekarboksimetil aglikonov je v vzorcih 'Istrske belice' večje kot v vzorcih 'Leccina'. Tako vsota kot vsebnost posameznih sekoiridoidnih biofenolov je večja v oljih 'Istrske belice' kot v oljih 'Leccina'.



Slika 16: Povprečna vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v svežih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino'

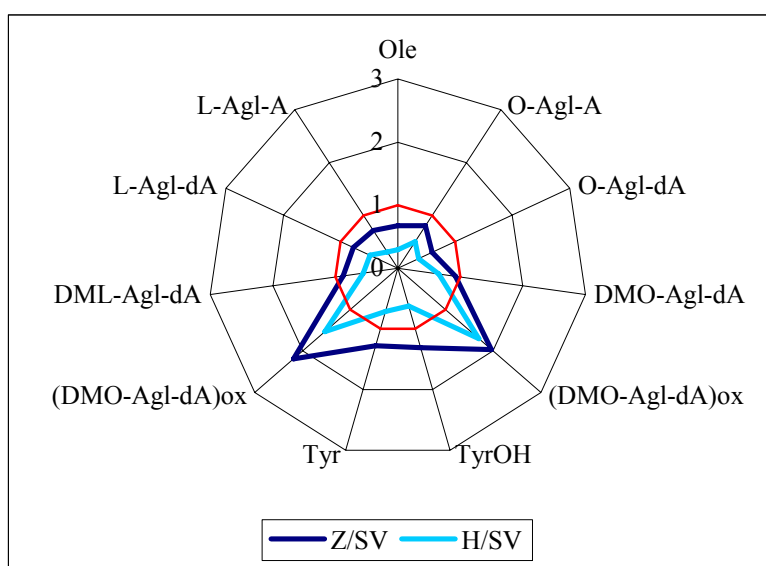
Figure 16: Average secoiridoid biophenols contents (mg/kg) in fresh samples of extra virgin olive oil from cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino*



Slika 17: Povprečna vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v svežih in v skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

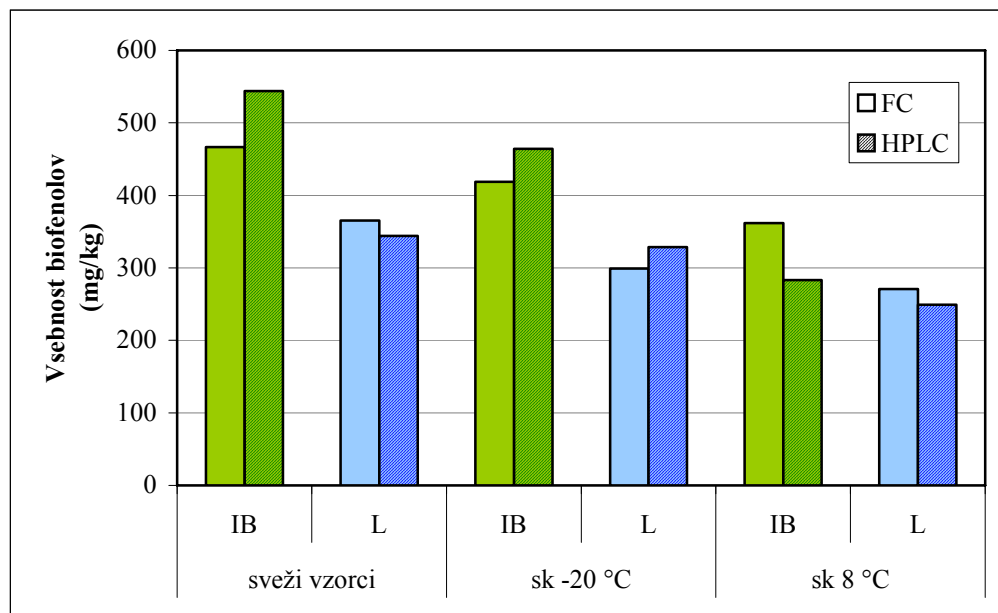
Figure 17: Average secoiridoid biophenols contents in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at -20 °C and at 8 °C for one year

Slika 17 prikazuje povprečno sestavo sekoiridoidnih biofenolov v svežih in v skladiščenih vzorcih. S slike je razvidno, da je med skladiščenjem prišlo do razgradnje biofenolov, in sicer v večji meri pri 8 °C kot pri –20 °C. Oblika grafa je na prvi pogled enaka tako v svežih kot v skladiščenih vzorcih, pogled na sliko 18 pa nam vendarle razkrije razlike. Na sliki 18 sta prikazani razmerji med vsebnostjo sekoiridoidnih biofenolov v skladiščenih in v svežih vzorcih. Razmerja so za spojine z začetka razgradne poti manjša od ena (vrednost ena je na grafu označena z rdečo črto), torej so se vsebnosti teh spojin v olju zmanjšale. Povečale pa so se vsebnosti oksidiranih oblik obeh dekarboksimetil aglikonov, v oljih, skladiščenih pri –20 °C pa tudi vsebnosti tirosoola in hidroksitirosoola.



Slika 18: Razmerje med vsebnostmi sekoiridoidnih biofenolov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja: Z/SV: v skladiščenih (eno leto v zmrzovalniku pri –20 °C) in v svežih vzorcih; H/SV: v skladiščenih (eno leto v hladilniku pri 8 °C) in v svežih vzorcih

Figure 18: Ratio between the secoiridoid biophenols contents in samples of extra virgin olive oil: Z/SV: in stored (one year at –20°C) and in fresh samples; H/SV: in stored (one year at 8°C) and in fresh samples



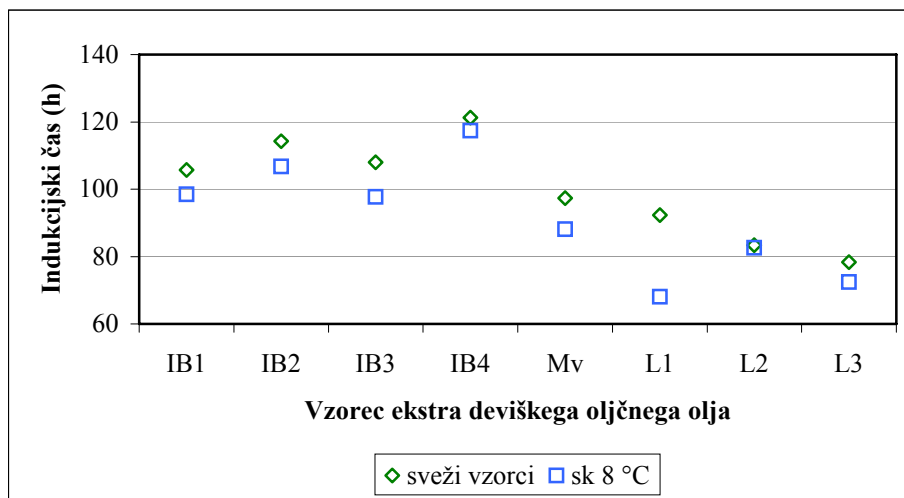
Slika 19: Vsebnost skupnih biofenolov v svežih in skladiščenih (eno leto pri -20 °C in pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja (IB: povprečje vzorcev 'Istrske belice'; L: povprečje vzorcev 'Leccina'; HPLC: vsebnost skupnih biofenolov, določenih s HPLC; FC: vsebnost skupnih biofenolov, določenih z metodo FC)

Figure 19: Total biophenols in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at -20 °C and at 8 °C for one year (IB: average of samples of cv. *Istrska belica*; L: average of samples of cv. *Leccino*; HPLC: the sum of all identified biophenols determined with HPLC; FC: total biophenols, determined with FC method)

Na sliki 19 je podana primerjava med vsebnostjo skupnih biofenolov določenih z metodo FC in vsoto vseh s HPLC določenih biofenolov. S slike vidimo, da je vsebnost skupnih biofenolov tako v svežih kot v skladiščenih vzorcih večja v oljih 'Istrske belice' kot v oljih 'Leccina' ne glede na uporabljeno metodo določevanja. Tako v vzorcih 'Istrske belice' kot v vzorcih 'Leccina' se je vsebnost skupnih biofenolov med skladiščenjem zmanjšala; sprememba je bila večja pri skladiščenju v hladilniku kot pri skladiščenju v zmrzovalniku.

4.1.4 Rezultati določevanja oksidacijske stabilnosti v svežih in v eno leto skladiščenih vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Indukcijski čas smo spremljali le v vzorcih EDOO letnika 2003, in sicer v svežih vzorcih in v vzorcih, hranjenih v hladilniku pri 8 °C . Razen v enem vzorcu se je indukcijski čas v vseh vzorcih po skladiščenju skrajšal.



Slika 20: Indukcijski čas v svežih in v skladiščenih (eno leto pri 8 °C) vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja

Figure 20: Induction time in fresh samples of extra virgin olive oil, and in samples of extra virgin olive oil stored at 8 °C for one year

4.2 REZULTATI ANALIZ VZORCEV EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA PRED SEGREVANJEM IN PO SEGREVANJU V RANCIMATU

V poskus smo vključili osem vzorcev EDOO, in sicer štiri vzorce sorte 'Istrska belica', tri vzorce 'Leccino' in en vzorec mešanega olja. Podatki o vzorcih so v preglednici 2 v poglavju 3.1.1.

Vzorci EDOO smo 142 ur segrevali v Rancimatu pri temperaturi 100 °C in pretoku zraka 10 L/h. V tem poglavju so podani rezultati analiz vzorcev pred segrevanjem in po njem.

4.2.1 Rezultati določevanja parametrov kakovosti v ekstra deviškem oljčnem olju pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu

Preglednica 7 podaja parametre kakovosti v svežih vzorcih EDOO in v vzorcih po segrevanju v Rancimatu. Segrevanje pri temperaturi 100 °C in pretoku zraka 10 L/h je potekalo 142 ur.

Preglednica 7: Povprečja parametrov kakovosti v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu

Table 7: Average quality parameters in extra virgin olive oil samples before and after heating in Rancimat

Parameter	Sorta	Vzorci ekstra deviškega oljčnega olja	
		Pred segrevanjem	Po segrevanju
kislost (ut. %)	IB	0,13 ^{aB}	0,20 ^{bA}
	L	0,08 ^{bB}	1,94 ^{aA}
peroksidno število (mmol O ₂ /kg)	IB	3,6 ^{bB}	30,1 ^{bA}
	L	6,0 ^{aB}	359 ^{aA}
K ₂₃₂	IB	1,811 ^{aB}	3,000 ^{bA}
	L	1,805 ^{aB}	3,373 ^{aA}
K ₂₇₀	IB	0,155 ^{aB}	0,518 ^{bA}
	L	0,141 ^{bB}	1,503 ^{aA}
Δ K	IB	-0,002 ^{aB}	0,013 ^{bA}
	L	-0,002 ^{aB}	0,020 ^{aA}

Sorta: IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'

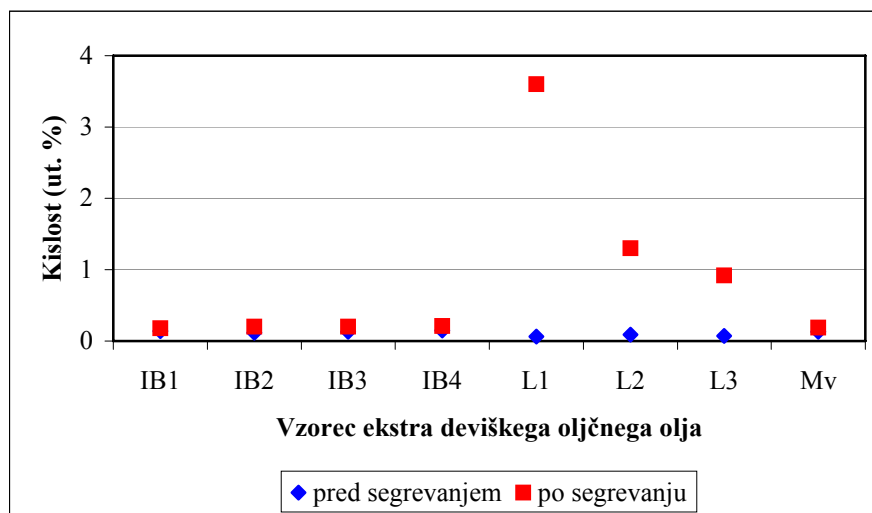
^{a, b} Srednje vrednosti posameznega parametra v istem stolpcu, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

^{A, B} Srednje vrednosti v isti vrstici, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

Cultivar: IB: *Istrska belica*; L: *Leccino*.

^{a, b} The average values of individual parameter in the same column, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

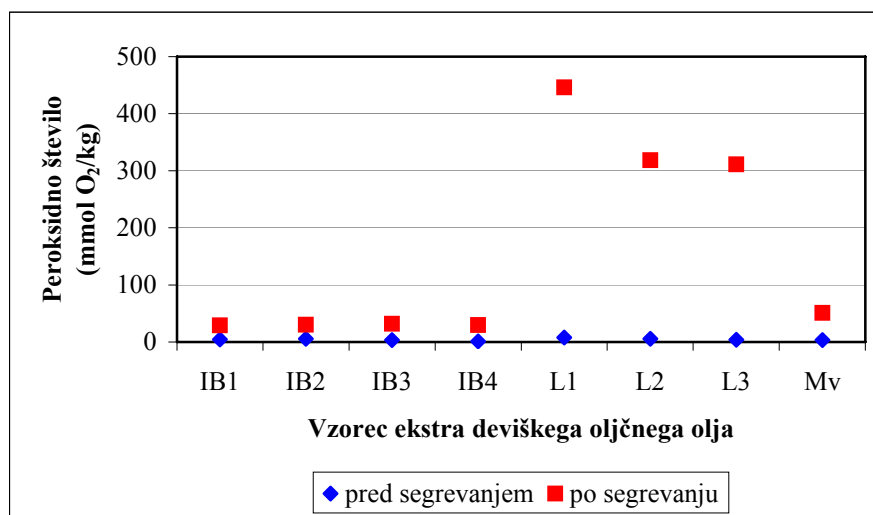
^{A, B} The average values in the same row, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).



Slika 21: Kislost v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)

Figure 21: Acidity in extra virgin olive oil samples before and after heating in Rancimat (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*; Mv: blend of different cultivars)

Kislost je bila v svežih vzorcih olja sorte 'Leccino' statistično značilno manjša kot v vzorcih olja sorte 'Istrska belica', vendar je bila tudi v slednjih še daleč pod vrednostjo, dovoljeno za ekstra deviško oljčno olje ($\leq 0,8$ ut. %). Med segrevanjem se je statistično značilno povečala v vseh vzorcih, vendar je s slike 21 razvidno, da je bila sprememba v vzorcih 'Istrske belice' relativno majhna v primerjavi s spremembo v vzorcih 'Leccina'.

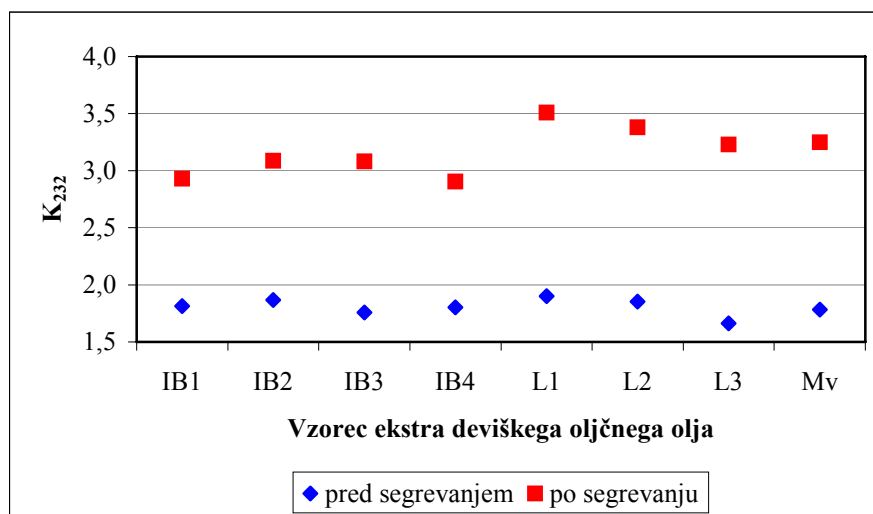


Slika 22: Peroksidno število v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)

Figure 22: Peroxide value in extra virgin olive oil samples before and after heating in Rancimat (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*; Mv: blend of different cultivars)

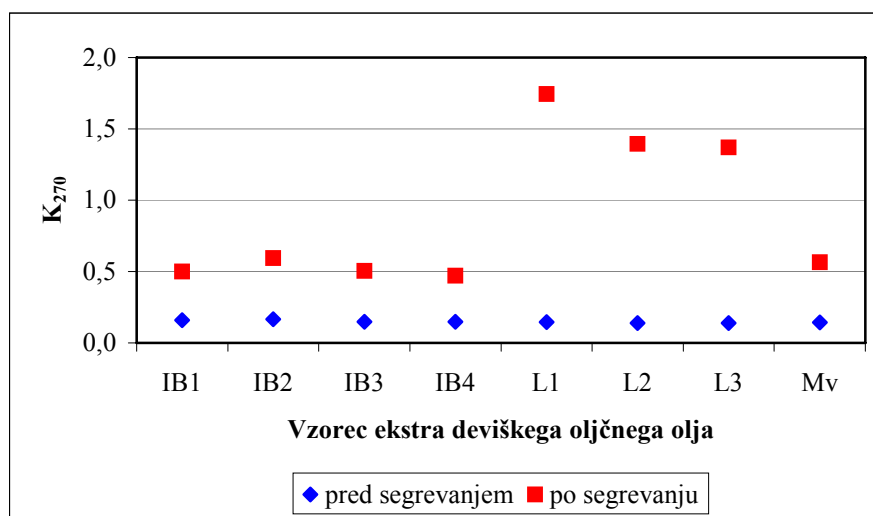
Slika 22 prikazuje vrednosti peroksidnega števila v vzorcih pred segrevanjem in po njem. Pred segrevanjem so imeli vzorci 'Istrske belice' statistično značilno nižje vrednosti peroksidnega števila kot vzorci 'Leccina'. Med segrevanjem so se vrednosti peroksidnega števila v vseh vzorcih močno povišale, povprečne vrednosti peroksidnega števila v vzorcih 'Istrske belice' se je povečalo približno osemkrat, v vzorcih 'Leccina' pa celo približno šestdesetkrat.

Pred segrevanjem ni bilo statistično značilne razlike v vrednosti K_{232} med vzorci olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino', pač pa je bila vrednost K_{232} po segrevanju statistično značilno višja v vzorcih 'Leccina', vendar razlike niso bile tako velike kot pri kislosti in peroksidnem številu. Vrednost K_{270} je bila pred segrevanjem statistično značilno višja v vzorcih 'Istrske belice' kot v vzorcih 'Leccina', med segrevanjem pa se je bistveno bolj povišala v vzorcih 'Leccina'. Graf na sliki 24 ima podobno obliko kot graf za peroksidno število na sliki 22.



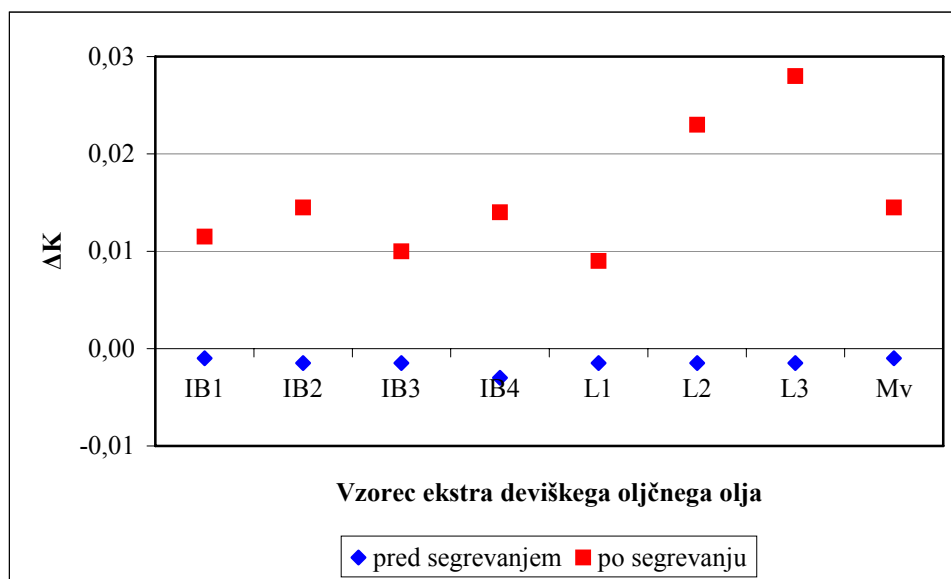
Slika 23: Vrednost K_{232} v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)

Figure 23: K_{232} in extra virgin olive oil samples before and after heating in Rancimat (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*; Mv: blend of different cultivars)



Slika 24: Vrednost K_{270} v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)

Figure 24: K_{270} in extra virgin olive oil samples before and after heating in Rancimat (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*; Mv: blend of different cultivars)



Slika 25: Vrednost ΔK v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)

Figure 25: ΔK in extra virgin olive oil samples before and after heating in Rancimat (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*; Mv: blend of different cultivars)

Med vzorci olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem ni bilo statistično značilnih razlik v vrednosti ΔK . Med segrevanjem se je vrednost ΔK v vseh vzorcih močno povišala, izstopata zlasti vzorca L2 in L3 (slika 25).

4.2.2 Rezultati določevanja maščobnokislinske sestave v ekstra deviškem oljčnem olju pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu

Maščobnokislinska sestava v vzorcih EDOO pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu je podana v preglednici 8.

Preglednica 8: Povprečna maščobnokislinska sestava v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimat

Table 8: Average fatty acid composition in extra virgin olive oil samples before and after heating in Rancimat (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*)

Maščobna kislina (ut. %)	Sorta	Vzorci ekstra deviškega oljčnega olja	
		Pred segrevanjem	Po segrevanju
C 14:0	IB	0,018 ^{aA}	0,018 ^{aA}
	L	0,010 ^{bB}	0,017 ^{aA}
C 16:0	IB	12,759 ^{bA}	12,733 ^{bA}
	L	13,805 ^{aB}	16,430 ^{aA}
C 16:1	IB	1,143 ^{bA}	1,115 ^{bA}
	L	1,533 ^{aA}	1,478 ^{aA}
C 17:0	IB	0,060 ^{aA}	0,058 ^{bA}
	L	0,050 ^{bB}	0,063 ^{aA}
C 17:1	IB	0,110 ^{aA}	0,110 ^{aA}
	L	0,113 ^{aA}	0,113 ^{aA}
C 18:0	IB	3,210 ^{aA}	3,278 ^{aA}
	L	2,283 ^{bB}	2,823 ^{bA}
C 18:1	IB	75,349 ^{aA}	75,734 ^{aA}
	L	72,739 ^{bA}	73,900 ^{bA}
C 18:2	IB	5,739 ^{bA}	5,373 ^{aA}
	L	7,965 ^{aA}	2,437 ^{bB}
C 18:3	IB	0,625 ^{bB}	0,545 ^{aA}
	L	0,772 ^{aA}	0,090 ^{bB}
C 20:0	IB	0,481 ^{aB}	0,504 ^{aA}
	L	0,335 ^{bB}	0,445 ^{bA}
C 20:1	IB	0,296 ^{aA}	0,303 ^{aA}
	L	0,255 ^{bB}	0,273 ^{bA}
C 22:0	IB	0,145 ^{aB}	0,169 ^{bA}
	L	0,097 ^{bB}	1,867 ^{aA}
C 24:0	IB	0,059 ^{aA}	0,063 ^{aA}
	L	0,033 ^{bA}	0,073 ^{aA}

Sorta: IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'

^{a, b} Statistično značilne razlike posameznega parametra v istem stolpcu so podane z različnimi malimi črkami ($P < 0,05$).

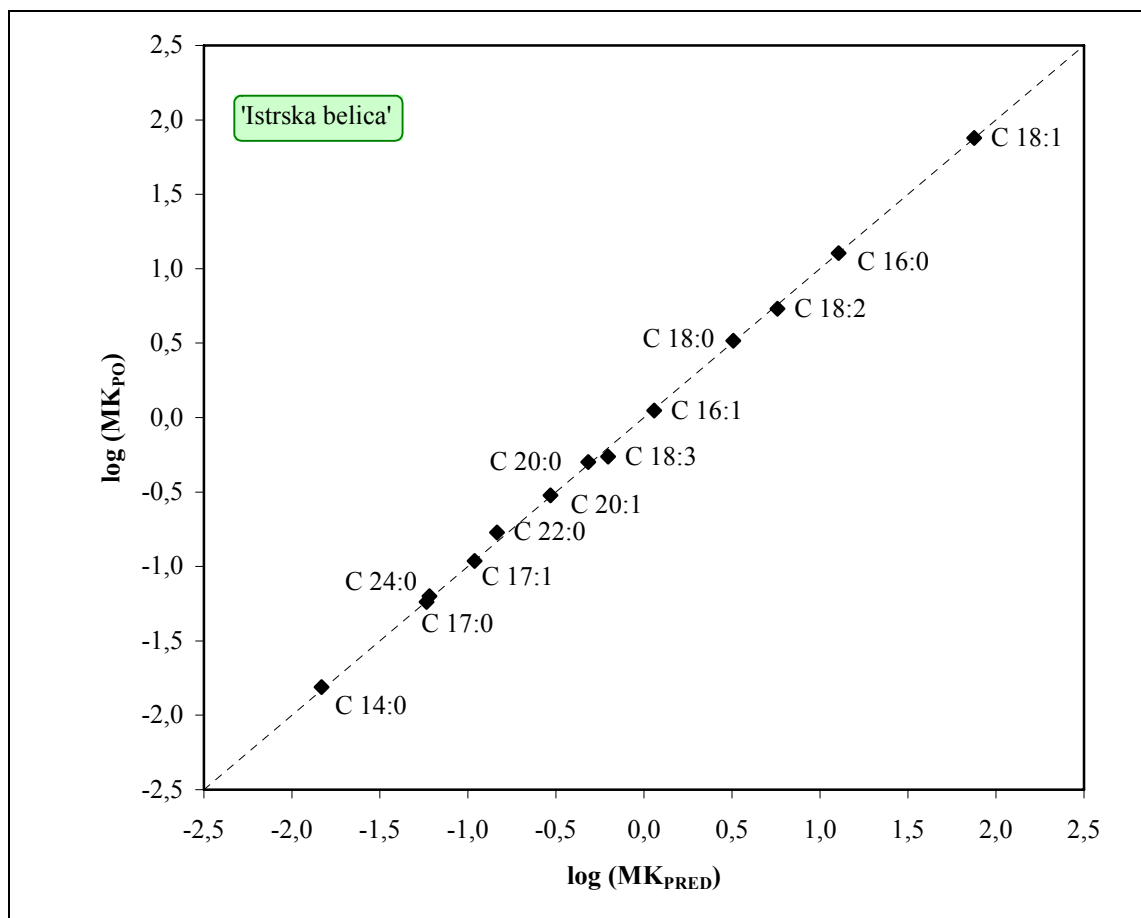
^{A, B} Statistično značilne razlike v isti vrstici so podane z različnimi velikimi črkami ($P < 0,05$).

Cultivar: IB: *Istrska belica*; L: *Leccino*.

^{a, b} The average values of individual parameter in the same column, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

^{A, B} The average values in the same row, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

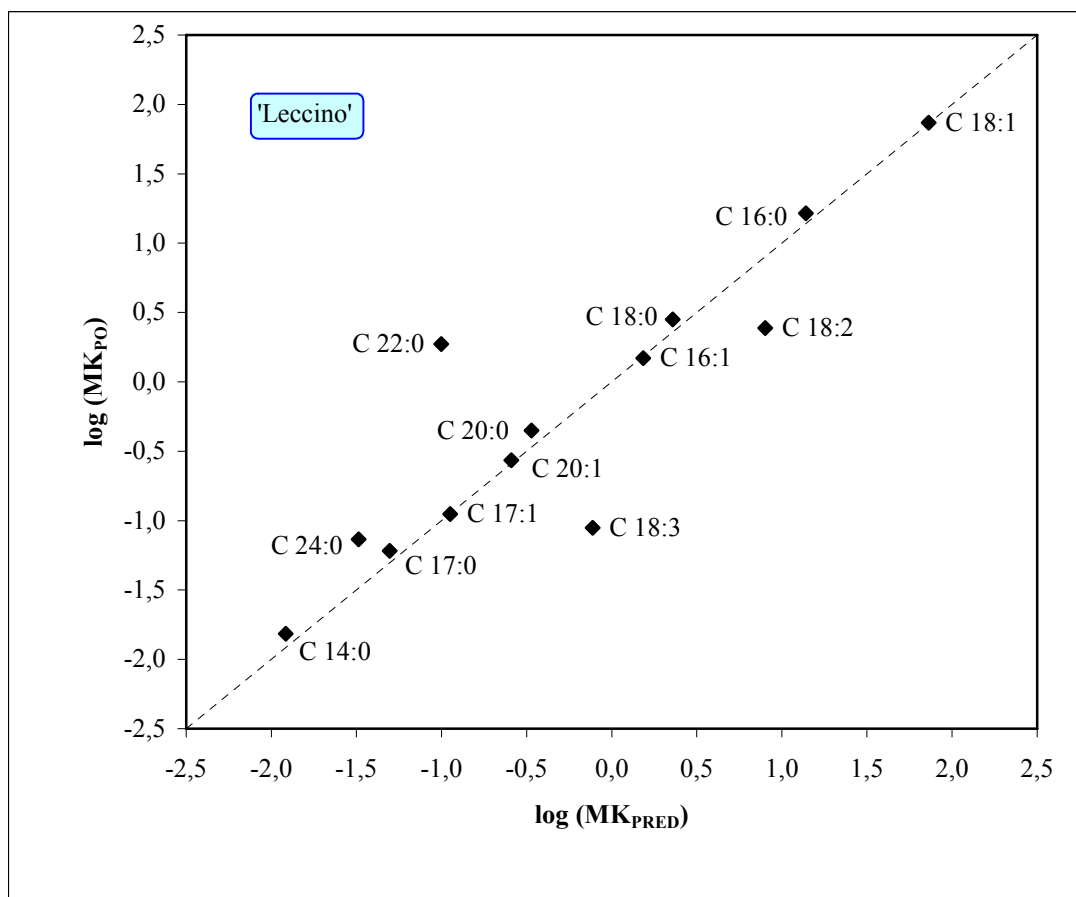
Primerjava maščobnokislinske sestave v vzorcih EDOO pred segrevanjem in po njem je podana na slikah 26 in 27. Slika 26 prikazuje primerjavo maščobnokislinske sestave v vzorcih EDOO sorte 'Istrska belica' pred segrevanjem in po njem, slika 27 pa primerjavo maščobnokislinske sestave v vzorcih sorte EDOO 'Leccino' pred segrevanjem in po njem. Deleži maščobnih kislin, ki so na sliki pod črtkano črto, so se med segrevanjem zmanjšali, deleži kislin nad črto pa so se povečali. Čim dlje od črtkane črte se nahaja vzorec, tem bolj se je spremenil delež kisline v vzorcu.



Slika 26: Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' pred segrevanjem v Rancimatu in po njem (MK_{PRED}: % maščobne kisline pred segrevanjem; MK_{PO}: % maščobne kisline po segrevanju)

Figure 26: Comparison of average contents of individual fatty acids in extra virgin olive oil samples (cv. *Istrska belica*) before and after heating in Rancimat apparatus (MK_{PRED}: % of fatty acid before thermal treatment; ; MK_{PO}: % of fatty acid after thermal treatment)

Maščobnokislinska sestava v vzorcih 'Istrske belice' je med segrevanjem v Rancimatu ostala skoraj nespremenjena, značilno se je zmanjšal le delež linolenske kisline, povečala pa sta se deleža arašidove (C 20:0) in behenske kisline (C 22:0). Deleži ostalih maščobnih kislin se niso statistično značilno spremenili. Več sprememb je bilo v vzorcih 'Leccina'. S slike 26 je razvidno, da se je močno zmanjšal delež linolne in linolenske kisline. Deleži drugih kislin se niso zmanjšali. Med segrevanjem so se statistično značilno povečali deleži nasičenih maščobnih kislin, medtem ko so ostali deleži enkrat nenasičenih kislin nespremenjeni, med njimi tudi delež prevladujoče oleinske kisline.



Slika 27: Primerjava povprečnih deležev posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Leccino' pred segrevanjem v Rancimatu in po njem (MK_{PRED} : % maščobne kisline pred segrevanjem; MK_{PO} : % maščobne kisline po segrevanju)

Figure 27: Comparison of average contents of individual fatty acids in extra virgin olive oil samples (cv. *Leccino*) before and after heating in Rancimat (MK_{PRED} : % of fatty acid before thermal treatment; ; MK_{PO} : % of fatty acid after thermal treatment)

4.2.3 Rezultati določevanja vsebnosti antioksidantov v ekstra deviškem oljčnem olju pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu

Preglednica 9 prikazuje povprečne vsebnosti α -tokoferola in biofenolov v vzorcih EDOO sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem v Rancimatu in po njem.

Preglednica 9: Povprečne vsebnosti α -tokoferola in biofenolov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem in po segrevanju v Rancimatu

Table 9: Average α -tocopherol and biophenols contents in extra virgin olive oil samples before and after heating in Rancimat

Spojina (mg/kg)	Sorta	Vzorci ekstra deviškega oljčnega olja	
		Pred segrevanjem	Po segrevanju
α -tokoferol	IB	129 ^b	< LOQ
	L	390 ^a	< LOQ
vsebnost skupnih biofenolov po metodi FC	IB	598 ^{aA}	240 ^{aB}
	L	399 ^{bA}	176 ^{bB}
lignani	IB	38,3 ^{aB}	101,0 ^{aA}
	L	10,0 ^{bA}	20,3 ^{bA}
luteolin	IB	3,1 ^{aA}	1,8 ^{aB}
	L	1,8 ^{bA}	0,1 ^{bB}
apigenin	IB	1,8 ^{aA}	1,6 ^{aA}
	L	0,7 ^{bA}	0,4 ^{bB}
Ole	IB	17,3 ^{aA}	0 ^{aB}
	L	6,4 ^{bA}	0 ^{aB}
O-Agl-A	IB	83,1 ^{aA}	5,7 ^{aB}
	L	27,8 ^{bA}	1,3 ^{bB}
O-Agl-dA	IB	23,8 ^{aA}	2,0 ^{aB}
	L	5,3 ^{bA}	1,5 ^{aB}
DMO-Agl-dA	IB	165,5 ^{aA}	4,6 ^{aB}
	L	184,2 ^{aA}	4,7 ^{aB}
TyrOH	IB	8,0 ^{aA}	3,6 ^{aA}
	L	2,5 ^{aA}	< LOD ^{bB}
L-Agl	IB	46,3 ^{aA}	12,1 ^{aB}
	L	9,6 ^{bA}	6,0 ^{bA}
L-Agl-dA	IB	31,3 ^{aA}	1,6 ^{aB}
	L	3,5 ^{bA}	1,9 ^{aA}
DML-Agl-dA	IB	182,0 ^{aA}	20,9 ^{aB}
	L	132,3 ^{bA}	6,8 ^{bB}
Tyr	IB	11,0 ^{aB}	18,4 ^{aA}
	L	3,0 ^{bB}	13,9 ^{bA}

IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; LOQ: meja določevanja; LOD: meja zaznavnosti.

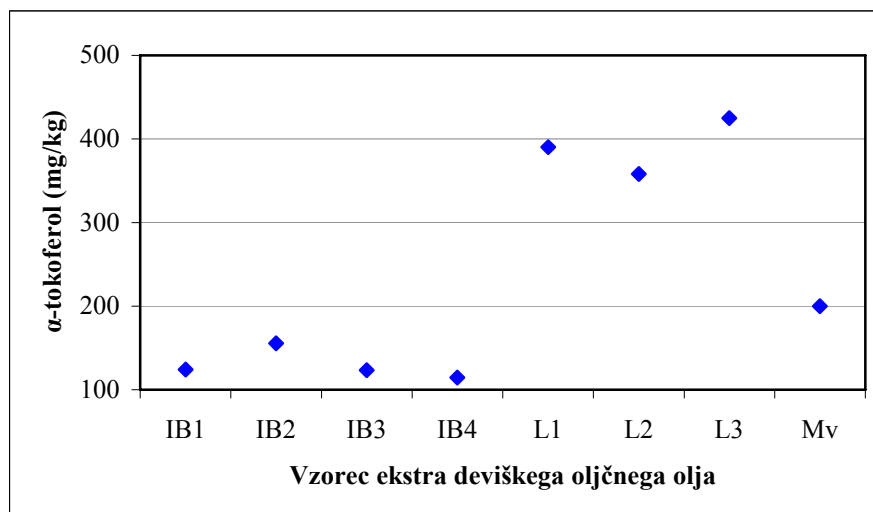
^{a, b} Statistično značilne razlike posameznega parametra v istem stolpcu so podane z različnimi malimi črkami ($P < 0,05$).

^{A, B} Statistično značilne razlike v isti vrstici so podane z različnimi velikimi črkami ($P < 0,05$).

IB: *Istrska belica*; L: *Leccino*; LOQ: limit of quantification; LOD: limit of detection.

^{a, b} The average values of individual parameter in the same column, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

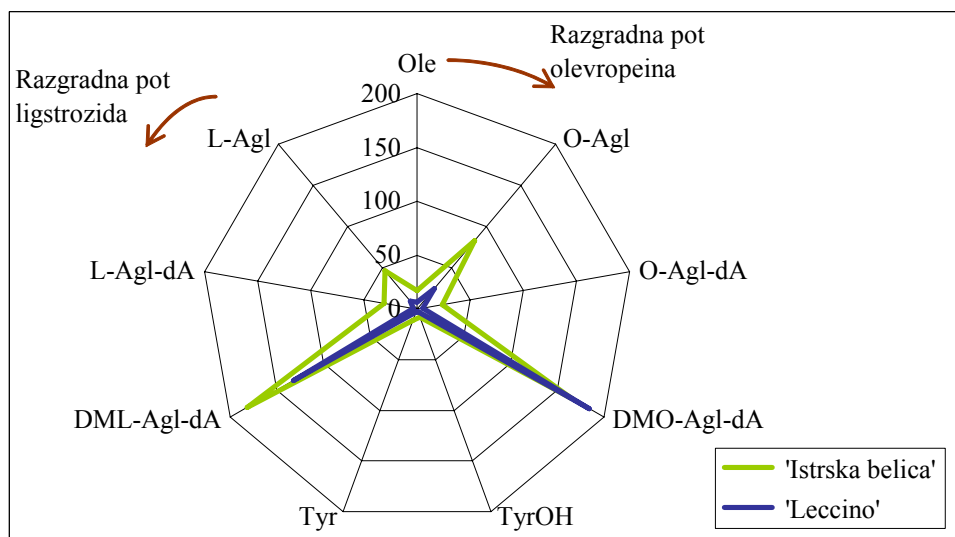
^{A, B} The average values in the same row, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).



Slika 28: Vsebnost α -tokoferola v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)

Figure 28: α -tocopherol contents in extra virgin olive oil samples before heating in Rancimat (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*; Mv: blend of different cultivars)

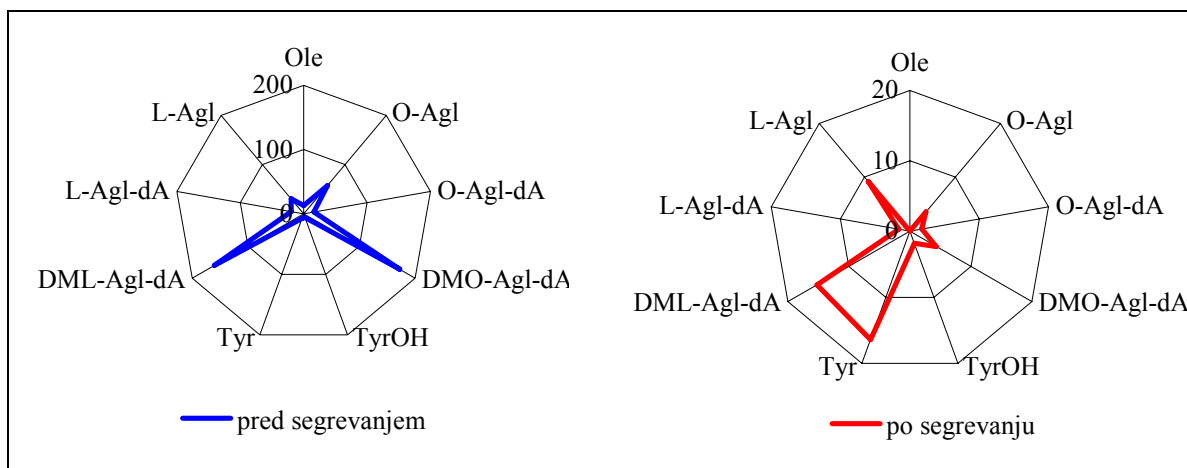
Vsebnost α -tokoferola je bila pred segrevanjem v vzorcih 'Istrske belice' statistično značilno manjša kot v vzorcih 'Leccina' (slika 28). Med segrevanjem se je količina α -tokoferola v vseh vzorcih zmanjšala pod mejo določevanja (pod 2 mg/kg).



Slika 29: Povprečna vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sort 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem v Rancimatu

Figure 29: Average secoiridoid biophenol content (mg/kg) in extra virgin olive oil samples from cv. *Istrska belica* (green) and cv. *Leccino* (blue) before heating in Rancimat

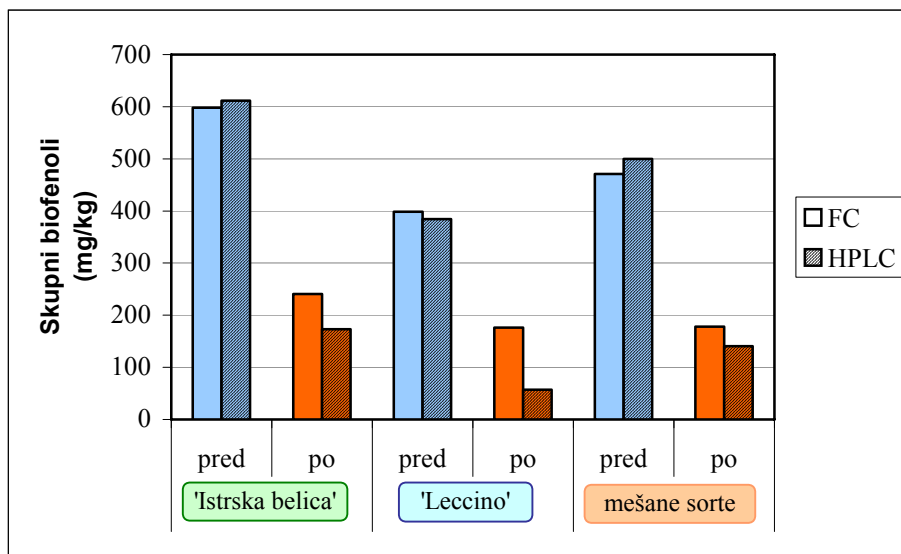
V vzorcih EDOO pred segrevanjem so prevladovali sekoiridoidni biofenoli, predstavljali so 90,0-96,8 % vsote vseh s HPLC določenih biofenolov. Slika 29 prikazuje vsebnost sekoiridoidnih biofenolov in njihovih derivatov v svežih vzorcih. Na desni strani polarnega grafa so od vrha proti dnu po vrsti razvrščene spojine, ki so sestavni del razgradne poti oleuropeina, opisane v poglavju 2.1.5, na levi strani grafa pa so od vrha proti dnu razvrščeni razgradni produkti ligstrozida. Vzorci so vsebovali majhne količine oleuropeina. S slike 29 je razvidno, da sta v vzorcih prevladovala DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA, sledila sta O-Agl in L-Agl ter O-Agl-dA in L-Agl-dA. Končnih razgradnih produktov, tirosola in hidroksitirosola, je bilo malo. Slika je približno simetrična, razgradna pot je pri ligstrozidu približno enako napredovala kot pri oleuropeinu. Razmerje med vsoto obeh aglikonov in vsoto obeh dialdehidnih oblik dekarboksimetil aglikonov je v vzorcih 'Istrske belice' večje kot v vzorcih 'Leccina'. Razmerje med derivati oleuropeina in derivati ligstrozida je bilo nižje v vzorcih 'Istrske belice' (1,1) kot v vzorcih 'Leccina' (1,5). Tako vsebnost posameznih sekoiridoidnih biofenolov kot vsota posameznih vsebnosti je bila večja v vzorcih 'Istrske belice' kot v vzorcih 'Leccina'.



Slika 30: Povprečna vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem v Rancimatu in po njem

Figure 30: Average secoiridoid biophenol composition (mg/kg) in extra virgin olive oil samples before (blue) and after (red) heating in Rancimat

Na sliki 30 je podana primerjava med povprečnimi vsebnostmi sekoiridoidnih biofenolov v vzorcih pred segrevanjem in po njem. Vsebnost posameznih biofenolov se je med segrevanjem bolj ali manj zmanjšala. Ugotovili smo, da se je spremenilo tudi razmerje med posameznimi spojinami. V vzorcih pred segrevanjem je bilo nekoliko več derivatov oleuropeina kot derivatov ligstrozida, po segrevanju pa je slednjih precej več kot derivatov oleuropeina. Količina tirosola se je v vseh vzorcih med segrevanjem povečala. Močno se je povečal tudi kromatografski vrh za lignane.



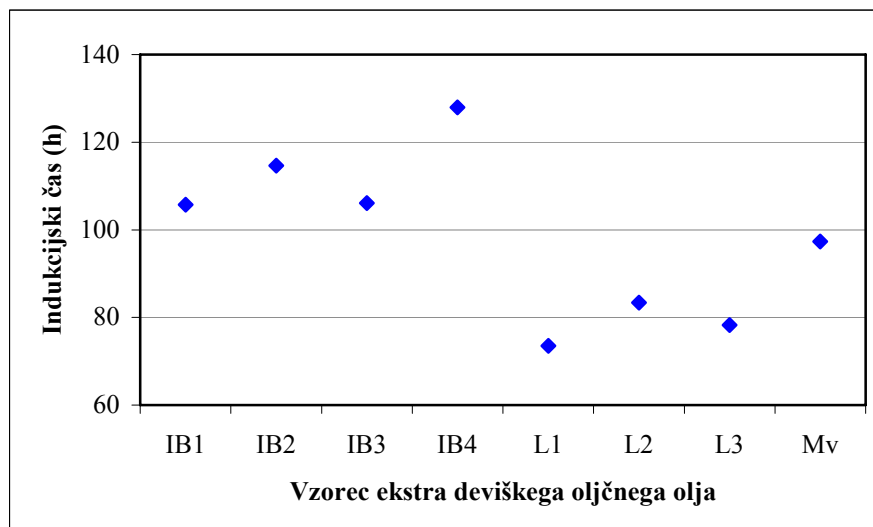
Slika 31: Vsebnost skupnih biofenolov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem (modra) v Rancimatu in po njem (oranžna). (FC: metoda FC; HPLC: metoda HPLC)

Figure 31: Total biophenols in extra virgin olive oil samples before (blue) and after (orange) heating in Rancimat. (FC: FC method; HPLC: HPLC method)

Vsebnost skupnih biofenolov je bila tako pred segrevanjem kot po njem statistično značilno večja v vzorcih 'Istrske belice' kot v vzorcih 'Leccina', ne glede na način določitve. V vzorcih pred segrevanjem smo dobili zelo podobne rezultate z obema metodama, medtem ko smo v vzorcih po segrevanju dobili z metodo HPLC dobili nekoliko nižje rezultate kot z metodo FC.

4.2.4 Rezultati določevanja oksidacijske stabilnosti v ekstra deviškem oljčnem olju pred segrevanjem v Rancimatu

Vzorci olja sorte 'Istrska belica' so pred segrevanjem imeli statistično značilno daljše indukcijske čase kot vzorci olja sorte 'Leccino' (Slika 32).



Slika 32: Indukcijski čas v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja pred segrevanjem v Rancimatu (IB: 'Istrska belica'; L: 'Leccino'; Mv: mešane sorte)

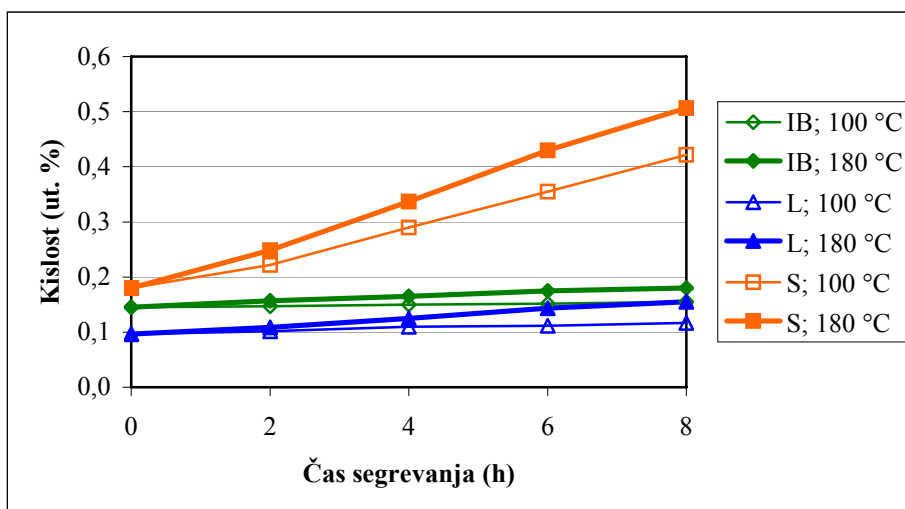
Figure 32: Induction period in extra virgin olive oil samples before heating in Rancimat (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*; Mv: blend of different cultivars)

4.3 REZULTATI SPREMLJANJA PROUČEVANIH PARAMETROV V EKSTRA DEVIŠKEM OLJČNEM OLJU IN SONČNIČNEM OLJU MED OSEMURNIM SEGREVANJEM

Dva vzorca EDOO (povprečna vzorca sorte 'Istrska belica' in 'Leccino') ter vzorec sončničnega olja smo segrevali osem ur pri temperaturi 100 °C in pri 180 °C. V tem poglavju so podani rezultati analiz vzorcev pred segrevanjem in vzorcev po različnih časih segrevanja (2, 4, 6 in 8 ur). Preglednica z vsemi rezultati je podana v prilogi C1.

4.3.1 Rezultati spremljanja stopnje oksidiranosti olja v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C

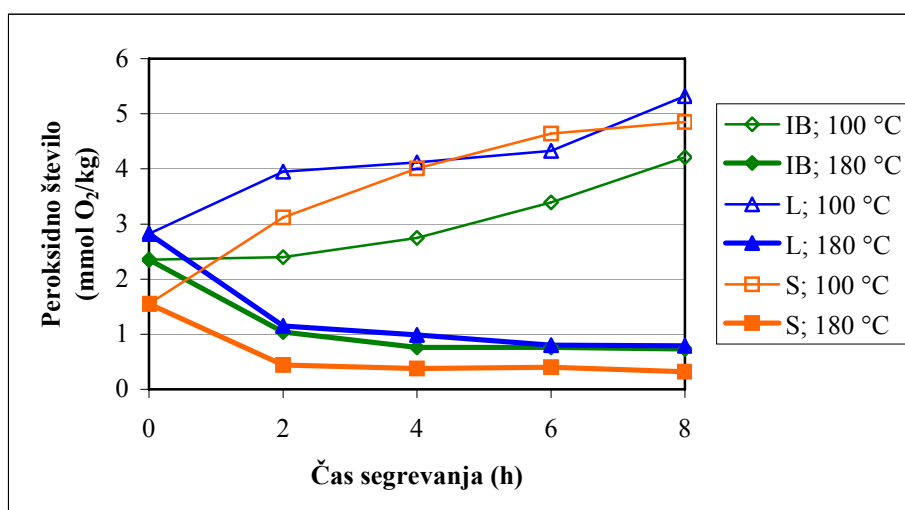
Vsa olja so pred začetkom segrevanja vsebovala zelo malo prostih maščobnih kislin, od 0,10 ut. % pri olju 'Leccino' do 0,18 ut. % pri sončničnem olju. Med segrevanjem se je kislost večala, intenzivneje pri 180 °C kot pri 100 °C. Najbolj se je povečala v sončničnem olju, v olju 'Leccino' pa le nekoliko bolj kot v olju 'Istrske belice' (slika 33).



Slika 33: Kislost v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)

Figure 33: Acidity in extra virgin olive oil and in sunflower oil as a function of heating time and temperature (IB: extra virgin olive oil cv. *Istrska belica*; L: extra virgin olive oil cv. *Leccino*; S: sunflower oil)

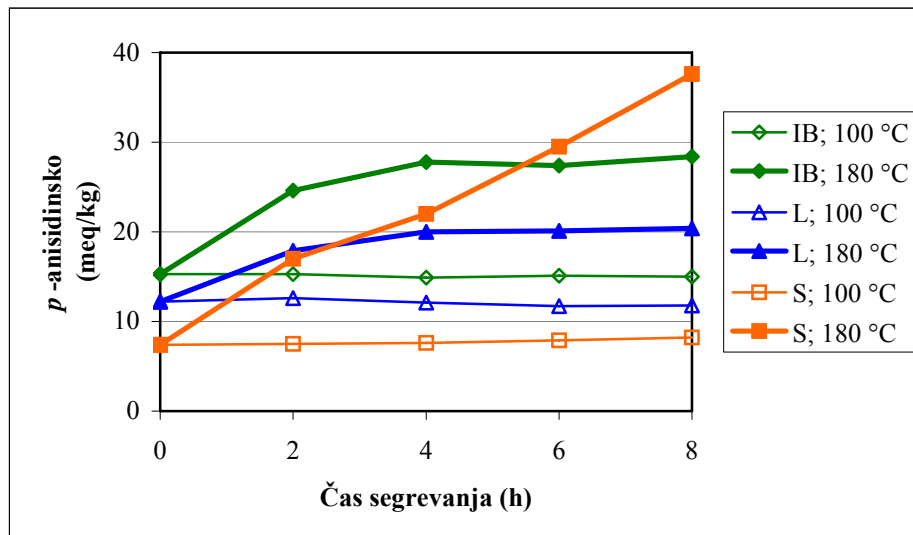
Pred začetkom segrevanja so bila peroksidna števila v vzorcih od 1,55 mmol O₂/kg v sončničnem olju do 2,82 mmol O₂/kg v vzorcu EDOO sorte 'Leccino'. Med segrevanjem pri 100 °C so se vrednosti peroksidnega števila v vseh treh vzorcih povišale, medtem ko so med segrevanjem pri 180 °C znižale (slika 34).



Slika 34: Peroksidno število v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)

Figure 34: Peroxide value in extra virgin olive oil and in sunflower oil as a function of heating time and temperature (IB: extra virgin olive oil cv. *Istrska belica*; L: extra virgin olive oil cv. *Leccino*; S: sunflower oil)

sunflower oil)

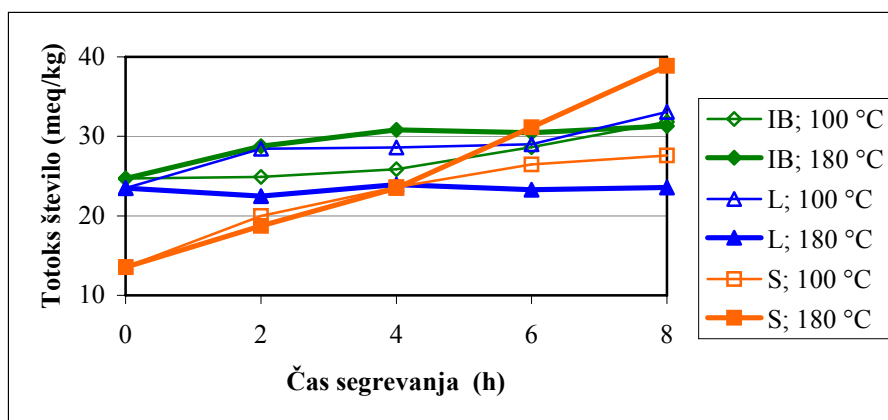


Slika 35: *p*-anisidinsko število v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)

Figure 35: *p*-anisidine value in extra virgin olive oil and in sunflower oil as a function of heating time and temperature (IB: extra virgin olive oil cv. *Istrska belica*; L: extra virgin olive oil cv. *Leccino*; S: sunflower oil)

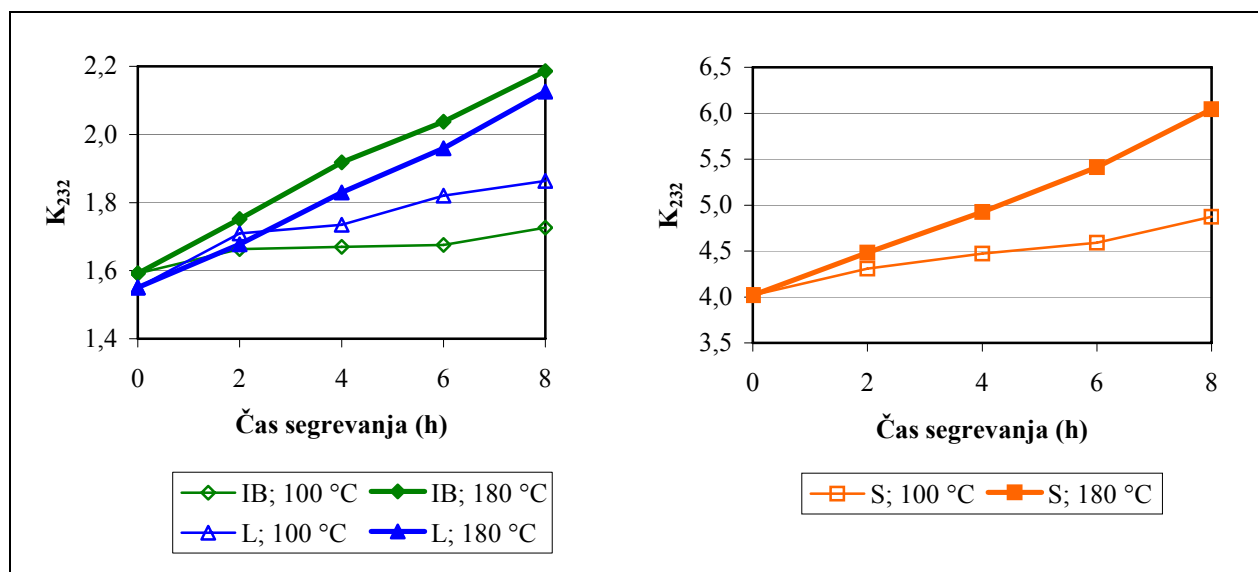
Pred začetkom segrevanja je imelo sončnično olje (7,4 meq/kg) precej manjše *p*-anisidinsko število kot oba vzorca EDOO ('Istrska belica' 15,3 meq/kg in 'Leccino' 12,2 meq/kg). Spremembe *p*-anisidinskega števila med segrevanjem prikazuje slika 35. Med segrevanjem vzorcev olja pri 100 °C se vrednost *p*-anisidinskega števila ni bistveno spreminjala, pač pa se je povečala med segrevanjem pri 180 °C. V obeh vzorcih oljčnega olja je po štirih urah dosegla vrednosti, ki se v naslednjih štirih urah niso več dosti spremenile, medtem ko se je v sončničnem olju večala skozi celoten čas eksperimenta.

Tako kot vrednost peroksidnega in *p*-anisidinskega števila je bila tudi vrednost totoks števila pred segrevanjem najnižja v sončničnem olju (13,6 meq/kg), v obeh oljčnih oljih pa skoraj dvakrat tolikšna (24,7 meq/kg v vzorcu 'Istrske belice' in 23,5 meq/kg v vzorcu 'Leccina'). Med segrevanjem se je totoks število v vsakem olju spreminjalo drugače (slika 36). V vzorcu 'Istrske belice' je med segrevanjem na 100 °C začelo naraščati šele po 4 urah, medtem ko je pri 180 °C nekoliko naraslo v prvih štirih urah segrevanja in se potem ni več bistveno spremenilo. V vzorcu 'Leccina' je med segrevanjem pri 180 °C ostalo skoraj nespremenjeno, pri 100 °C pa je ves čas rahlo naraščalo. V sončničnem olju je prve štiri ure naraščalo približno enako pri obeh temperaturah segrevanja, po štirih urah pa je začelo pri 180 °C naraščati hitreje kot pri 100 °C.



Slika 36: Totoks število v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)

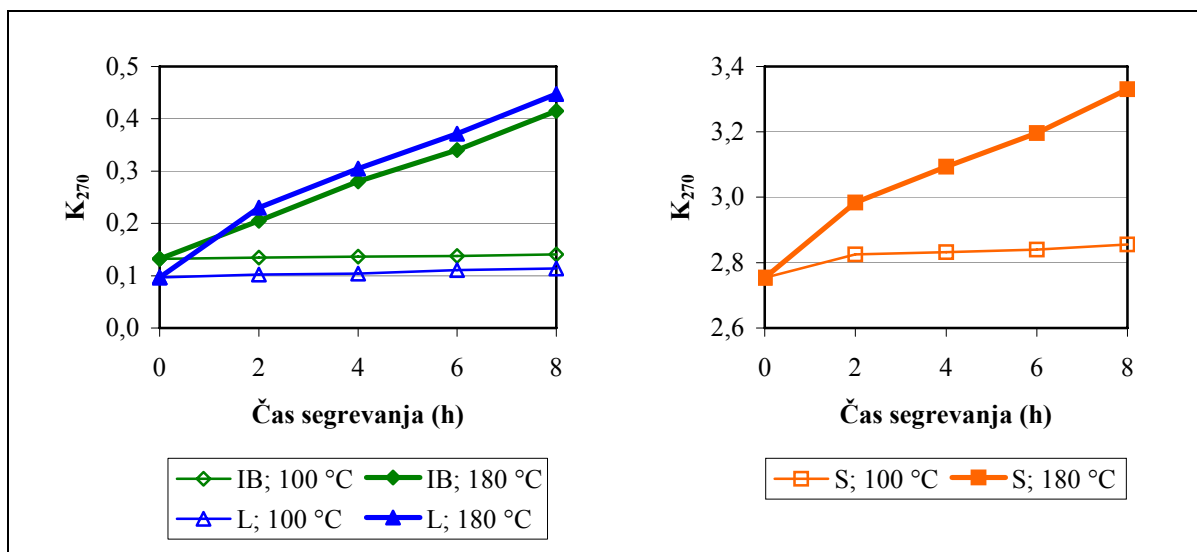
Figure 36: Totox value in extra virgin olive oil and in sunflower oil as a function of heating time and temperature (IB: extra virgin olive oil cv. *Istrska belica*; L: extra virgin olive oil cv. *Leccino*; S: sunflower oil)



Slika 37: Vrednost K_{232} v ekstra deviškem oljčnem in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: EDOO sorte 'Istrska belica'; L: EDOO sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)

Figure 37: K_{232} in extra virgin olive oil and in sunflower oil as a function of heating time and temperature (IB: extra virgin olive oil cv. *Istrska belica*; L: extra virgin olive oil cv. *Leccino*; S: sunflower oil)

Spremljanje vrednosti K_{232} med segrevanjem vzorcev EDOO in sončničnega olja je prikazano na sliki 37. Vrednost K_{232} je bila pred segrevanjem bistveno nižja v obeh vzorcih EDOO (1,55 v vzorcu 'Leccina' in 1,59 v vzorcu 'Istrske belice') kot v vzorcu sončničnega olja (4,02). Med segrevanjem je v vseh vzorcih konstantno naraščala. Naraščanje je bilo hitrejše pri 180 °C kot pri 100 °C.



Slika 38: Vrednost K_{270} v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)

Figure 38: K_{270} in extra virgin olive oil and in sunflower oil as a function of heating time and temperature (IB: extra virgin olive oil cv. *Istrska belica*; L: extra virgin olive oil cv. *Leccino*; S: sunflower oil)

Spremljanje vrednosti K_{270} med segrevanjem je prikazano na sliki 38. Podobno kot pri K_{232} je bila tudi vrednost K_{270} pred segrevanjem najvišja v sončničnem olju (2,754), v obeh vzorcih EDOO pa bistveno nižja (0,123 v vzorcu 'Istrske belice' in 0,097 v vzorcu 'Leccina'). Med segrevanjem pri 100 °C se v vzorcu 'Istrske belice' skoraj ni spremenila, v vzorcu 'Leccina' je rahlo naraščala, v sončničnem olju pa je bilo naraščanje najhitrejše. Pri segrevanju pri 180 °C je bilo naraščanje K_{270} hitrejše.

4.3.2 Rezultati spremljanja maščobnokislinske sestave ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C

Preglednica 10 podaja maščobnokislinsko sestavo vzorcev EDOO in sočničnega olja pred segrevanjem. V obeh oljčnih oljih je bilo največ oleinske kisline (77,31 ut. % v vzorcu 'Istrske belice' in 77,61 ut. % v vzorcu 'Leccina'), sledile so palmitinska, linolna, stearinska in palmitoleinska kislina. V sončničnem olju pa je bilo največ linolne kisline (64,60 ut. %), nato oleinske, palmitinske in stearinske kisline. Deleži vseh ostalih kislin so bili v vseh treh vzorcih manjši od 1 ut. %.

Preglednica 10: Maščobnokislinska sestava v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred osemurnim segrevanjem

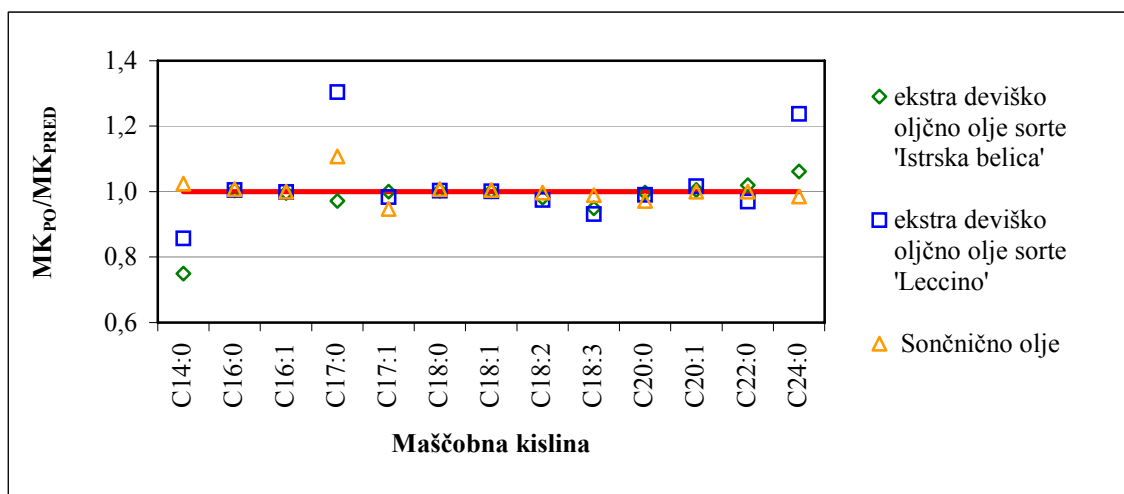
Table 10: Fatty acid composition in extra virgin olive oil and sunflower oil samples before heating for 8 hours

Maščobna kislina (ut. %)	Vzorci olja		
	ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje
	'Istrska belica'	'Leccino'	
C14:0	0,02 ^b	0,01 ^c	0,07 ^a
C16:0	11,43 ^b	12,85 ^a	6,27 ^c
C16:1	0,96 ^b	1,30 ^a	0,09 ^c
C17:0	0,06 ^a	0,04 ^c	0,05 ^b
C17:1	0,09 ^b	0,10 ^a	0,03 ^c
C18:0	3,15 ^b	1,97 ^c	4,26 ^a
C18:1	77,31 ^b	77,61 ^a	22,30 ^b
C18:2	5,40 ^b	4,74 ^c	64,60 ^a
C18:3	0,49 ^b	0,59 ^a	0,49 ^c
C20:0	0,53 ^a	0,35 ^b	0,30 ^c
C20:1	0,33 ^a	0,30 ^b	0,18 ^c
C22:0	0,17 ^b	0,11 ^c	0,68 ^a
C24:0	0,08 ^b	0,04 ^c	0,23 ^a

^{a, b, c} Statistično značilne razlike med vrstami olja so podane z različnimi črkami ($P < 0,05$).

^{a, b, c} Values in the same row, which don't have the same letters, are significantly different ($P < 0,05$).

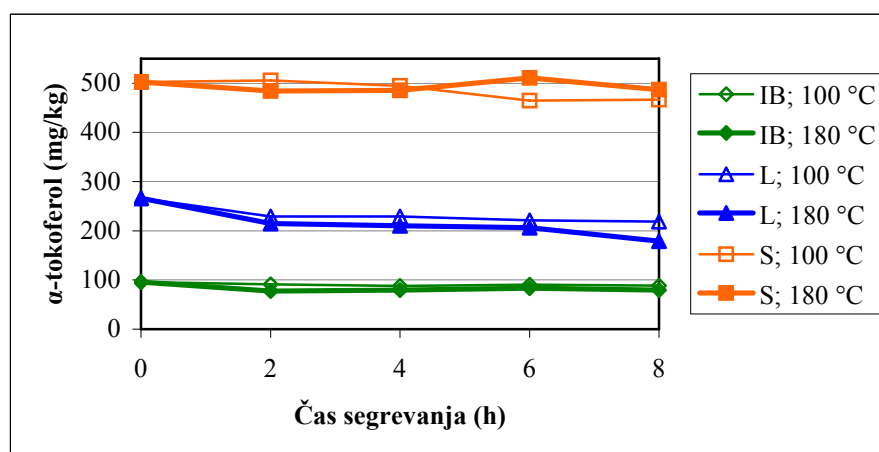
Maščobnokislinska sestava analiziranih olj se med osemurnim segrevanjem skorajda ni spremenila. Na sliki 39 so prikazana razmerja med deležem posamezne maščobne kisline v vzorcu pred segrevanjem in deležem te kisline v vzorcu po osmih urah segrevanja pri 180 °C. Če je razmerje večje od 1, torej če točka za to kislino leži nad rdečo črto, se je delež maščobne kisline v vzorcu med segrevanjem povečal; če pa je delež manjši od 1 in se točka nahaja na grafu pod rdečo črto, se je delež maščobne kisline zmanjšal.



Slika 39: Razmerja med vsebnostmi posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja po segrevanju (8 ur pri 180 °C) in pred segrevanjem. (MK_{PO}: delež maščobne kisline po segrevanju; MK_{PRED}: delež maščobne kisline pred segrevanjem)

Figure 39: Relationships between the contents of individual fatty acid in samples of extra virgin olive oil and in sunflower oil after and before heating for 8 hours at 180 °C. (MK_{PO}: % of fatty acid after thermal treatment; MK_{PRED}: % of fatty acid before thermal treatment)

4.3.3 Rezultati spremljanja vsebnosti antioksidantov in antioksidacijske učinkovitosti ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C

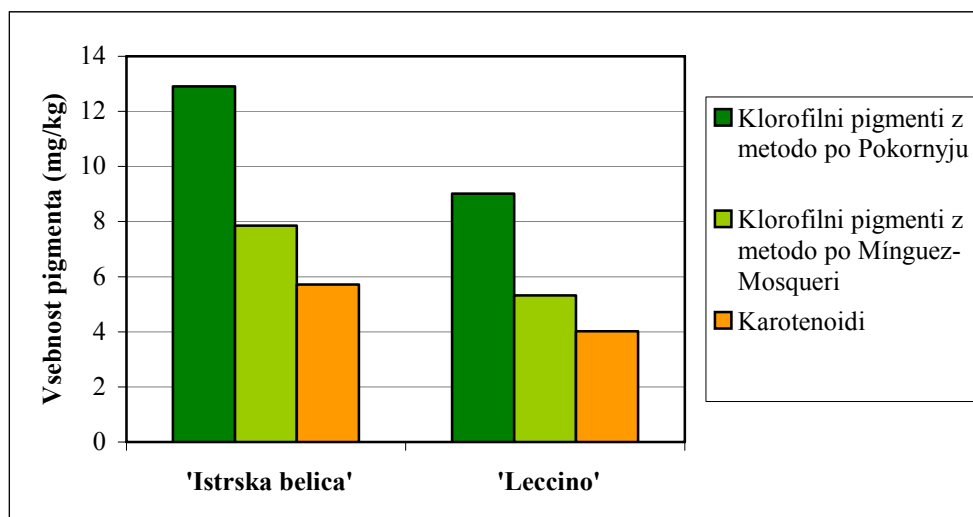


Slika 40: Vsebnost α -tokoferola v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje)

Figure 40: α -tocopherol contents in extra virgin olive oil and in sunflower oil as a function of heating time and temperature (IB: extra virgin olive oil cv. *Istrska belica*; L: extra virgin olive oil cv. *Leccino*; S: sunflower oil)

Slika 40 prikazuje spremljanje vsebnosti α -tokoferola v vzorcih analiziranih olj med segrevanjem. Vsebnost α -tokoferola je bila med celotnim poskusom največja v sončničnem olju (okrog 500 mg/kg) in se je s časom segrevanja malo, a statistično značilno zmanjšala. V vzorcu 'Leccina' se je statistično značilno zmanjšala z 266 mg/kg na 219 mg/kg med segrevanjem pri 100 °C oziroma na 179 mg/kg med segrevanjem pri 180 °C. Manj izrazito, a še vedno statistično značilno, je bilo zmanjševanje v vzorcu 'Istrske belice', v katerem se je vsebnost α -tokoferola z začetnih 96 mg/kg zmanjšala na 88 mg/kg med segrevanjem pri 100 °C oziroma na 79 mg/kg med segrevanjem pri 180 °C.

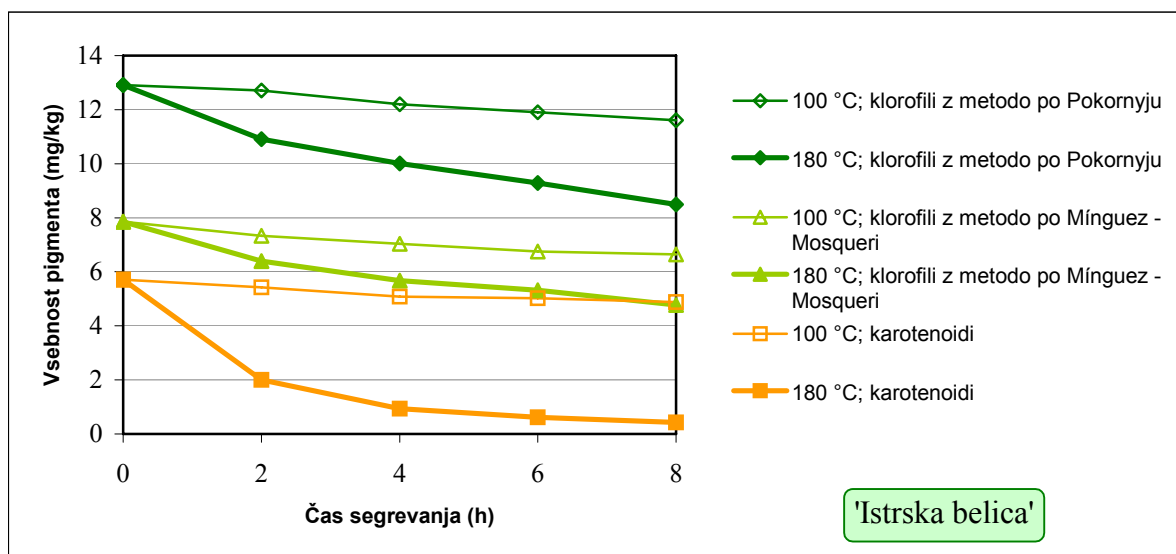
Vzorec EDOO sorte 'Istrska belica' je pred segrevanjem vseboval več pigmentov, tako klorofilnih kot karotenoidov, kot vzorec EDOO sorte 'Leccino'. V obeh vzorcih je bila vsebnost klorofilnih pigmentov večja od vsebnosti karotenoidov.



Slika 41: Vsebnosti klorofilnih pigmentov in karotenoidov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred osemurnim segrevanjem

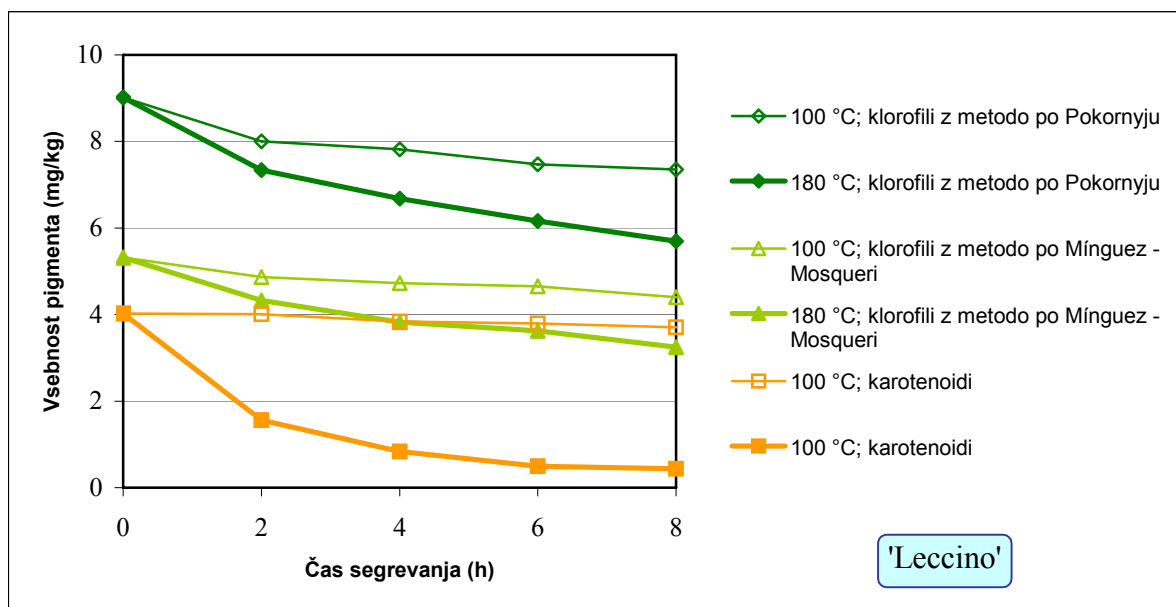
Figure 41: Chlorophyll pigments and carotenoids in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* before thermal treatment

Na sliki 41 vidimo, da smo z metodo po Mínguez-Mosqueri določili manjšo vsebnost klorofilnih pigmentov kot z metodo po Pokornju. Korelacija med metodama je bila tesna, koelacijski koeficient je bil 0,99.



Slika 42: Vsebnost klorofilnih pigmentov, določenih z dvema različnima metodama, in karotenoidov v vzorcu ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' v odvisnosti od časa in temperature segrevanja

Figure 42: Contents of chlorophyll pigments, determined with two different methods, and carotenoids in EVOO sample of cv. *Istrska belica* as a function of heating time and temperature



Slika 43: Vsebnost klorofilnih pigmentov, določenih z dvema različnima metodama, in karotenoidov v vzorcu ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Leccino' v odvisnosti od časa in temperature segrevanja

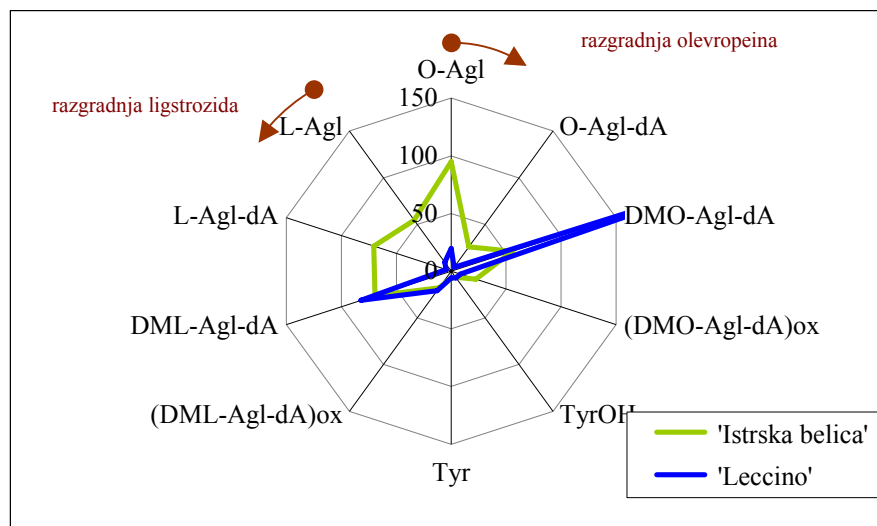
Figure 43: Contents of chlorophyll pigments, determined with two different methods, and carotenoids in EVOO sample of cv. *Leccino* as a function of heating time and temperature

Vsebnost pigmentov se je v obeh vzorcih EDOO med segrevanjem zmanjševala (sliki 42 in 43). Pri 100 °C se je vsebnost klorofilnih pigmentov zmanjševala nekoliko hitreje kot vsebnost karotenoidov, pri 180 °C pa je bila hitrost zmanjševanja vsebnosti karotenoidov precej večja od hitrosti zmanjševanja vsebnosti klorofilnih pigmentov. Konstante hitrosti zmanjševanja vsebnosti pigmentov so prikazane v preglednici 11.

Preglednica 11: Konstante hitrosti zmanjševanja vsebnosti pigmentov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in pri 180 °C

Table 11: Rate constants for the decrease of pigments contents in samples of extra virgin olive oil during heating at 100 °C and 180 °C for 8 hours

Pigment	Temperatura segrevanja	Konstanta hitrosti zmanjševanja vsebnosti pigmenta	
		'Istrska belica'	'Leccino'
Klorofilni pigmenti z metodo po Pokornyju	100 °C	0,014	0,022
	180 °C	0,015	0,054
Klorofilni pigmenti z metodo po Mínguez -Mosqueri	100 °C	0,022	0,021
	180 °C	0,059	0,059
Karotenoidi	100 °C	0,019	0,010
	180 °C	0,326	0,288

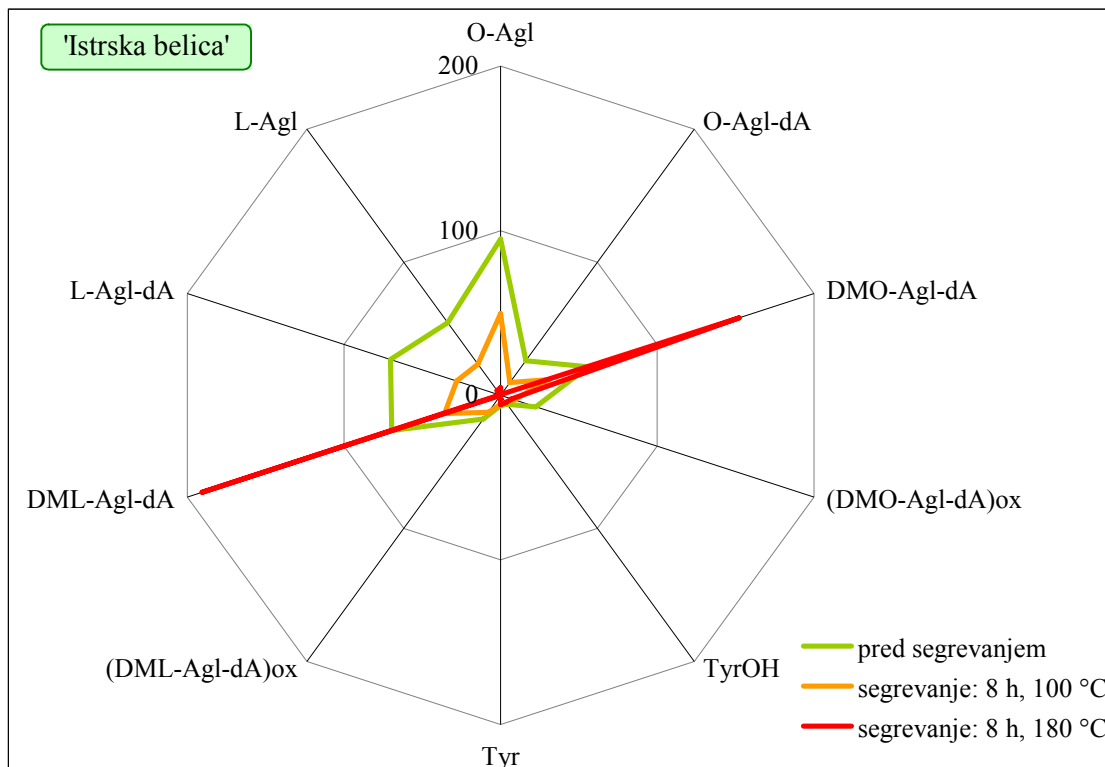


Slika 44: Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred osemurnim segrevanjem

Figure 44: Secoiridoid biophenols contents (mg/kg) in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* before heating for eight hours

Vsebnosti sekoiridoidnih biofenolov v vzorcih EDOO sorte 'Istrska belica' in EDOO sorte 'Leccino' pred segrevanjem so se precej razlikovale (slika 44). Vzorec 'Istrske belice' je vseboval pretežno sekoiridoidne biofenole z začetka razgradne poti, v vzorcu 'Leccino' pa sta prevladovala DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA. Vsebnost končnih biofenolnih produktov

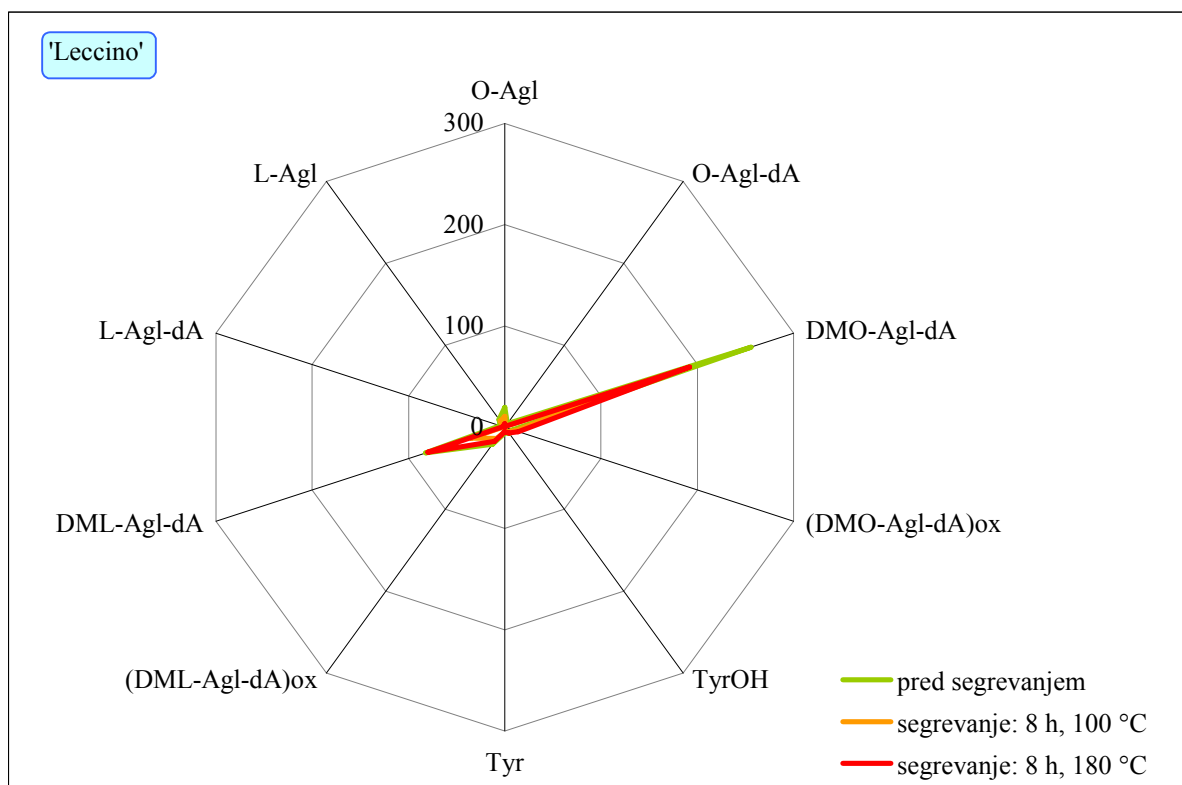
razgradne verige, tirosola in hidroksitirosola, je bila v obeh vzorcih EDOO pred segrevanjem majhna.



Slika 45: Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' pred segrevanjem ter po osmih urah segrevanja pri 100 °C in pri 180 °C

Figure 45: Secoiridoid biophenols composition (mg/kg) in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* before heating and after eight hours of heating at 100 °C and at 180 °C

Slika 45 prikazuje vsebnosti sekoiridoidnih biofenolov v vzorcu EDOO sorte 'Istrska belica' pred začetkom segrevanja ter po osmih urah segrevanja pri 100 °C in pri 180 °C. Obliki grafov za vzorec pred segrevanjem in po segrevanju pri 100 °C sta zelo podobni, le vsebnosti posameznih biofenolov so se med segrevanjem zmanjšale. Povsem drugačne pa so bile vsebnosti sekoiridoidnih biofenolov v vzorcu po segrevanju pri 180 °C, saj sta se močno povečala pika za DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA, vsakega izmed ostalih sekoiridoidov pa je vzorcu manj kot 6 mg/kg.



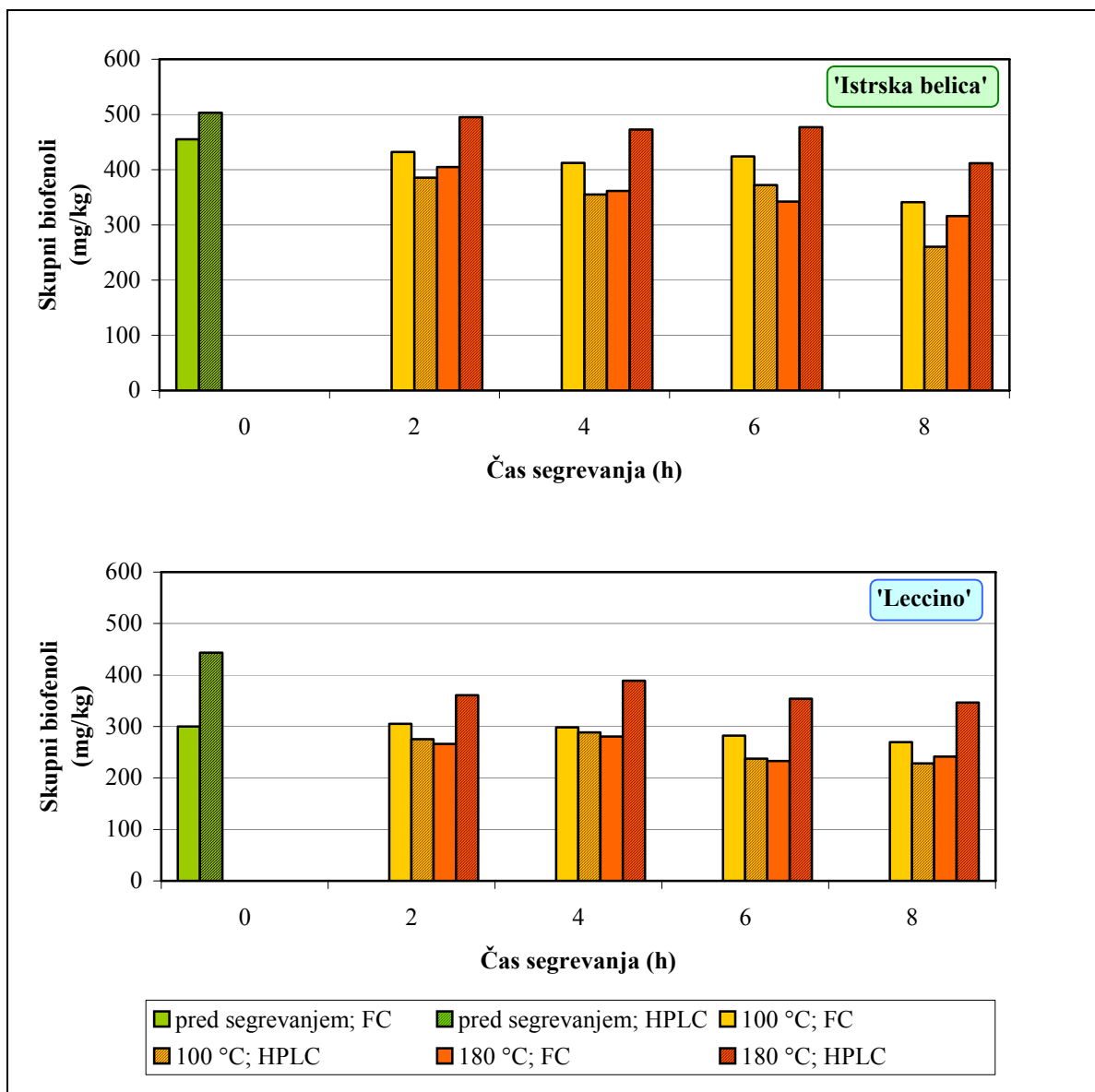
Slika 46: Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Leccino' pred segrevanjem ter po osmih urah segrevanja pri 100 °C in pri 180 °C

Figure 46: Secoiridoid biophenols composition (mg/kg) in extra virgin olive oil samples of cv. *Leccino* before heating and after eight hours of heating at 100 °C and at 180 °C

Slika 46 prikazuje vsebnosti sekoiridoidnih biofenolov v vzorcu EDOO sorte 'Leccino' pred začetkom segrevanja ter po osmih urah segrevanja pri 100 °C in pri 180 °C. Vsi trije vzorci so vsebovali največ DMO-Agl-dA, DML-Agl-dA je bilo približno trikrat manj, vsebnosti vsakega izmed ostalih sekoiridoidov pa so bile še precej manjše.

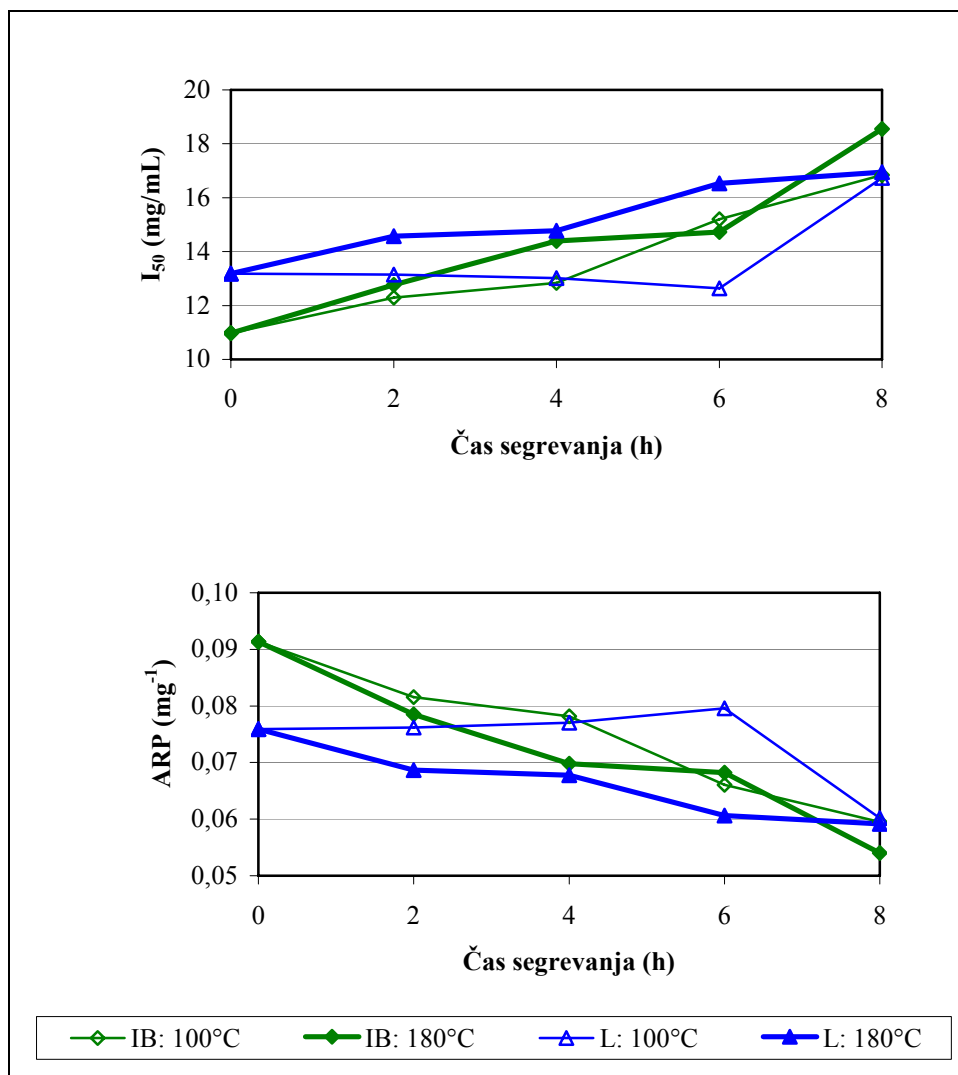
Vsebnost skupnih biofenolov je prikazana na sliki 47. Ugotavljamo, da se je vsebnost skupnih biofenolov določenih z metodo FC v vzorcu EDOO sorte 'Istrska belica' v prvih šestih urah segrevanja pri 100 °C le malo, a statistično značilno, spremenila, bolj pa se je zmanjšala v naslednjih dveh urah segrevanja. Bolj izrazito je bilo zmanjševanje med segrevanjem pri 180 °C. V vzorcu EDOO sorte 'Leccino' se je vsebnost skupnih biofenolov med segrevanjem pri 100 °C vas čas rahlo zmanjševala, a so spremembe postale statistično značilne šele po štirih urah segrevanja. Tudi med segrevanjem pri 180 °C se je vsebnost skupnih biofenolov v vzorcu 'Leccina' zmanjšala manj kot v vzorcu 'Istrske belice'.

Vsebnost skupnih biofenolov, določenih z metodo FC, je lahko manjša ali večja od vsote s HPLC določenih biofenolov. Korelacija med metodama ni bila tesna (korelacijski koeficient je bil 0,53).



Slika 47: Vsebnost skupnih biofenolov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino', v odvisnosti od časa in temperature segrevanja. (FC: metoda FC; HPLC: metoda HPLC)

Figure 47: Spectrophotometrically (FC) and chromatographically (HPLC) determined total biophenols in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* as a function of heating time and temperature.



Slika 48: Antioksidacijska učinkovitost vzorcev ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' v odvisnosti od časa in temperature segrevanja (IB: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino')

Figure 48: Antioxidant activity of extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* as a function of heating time and temperature (IB: cv. *Istrska belica*; L: cv. *Leccino*)

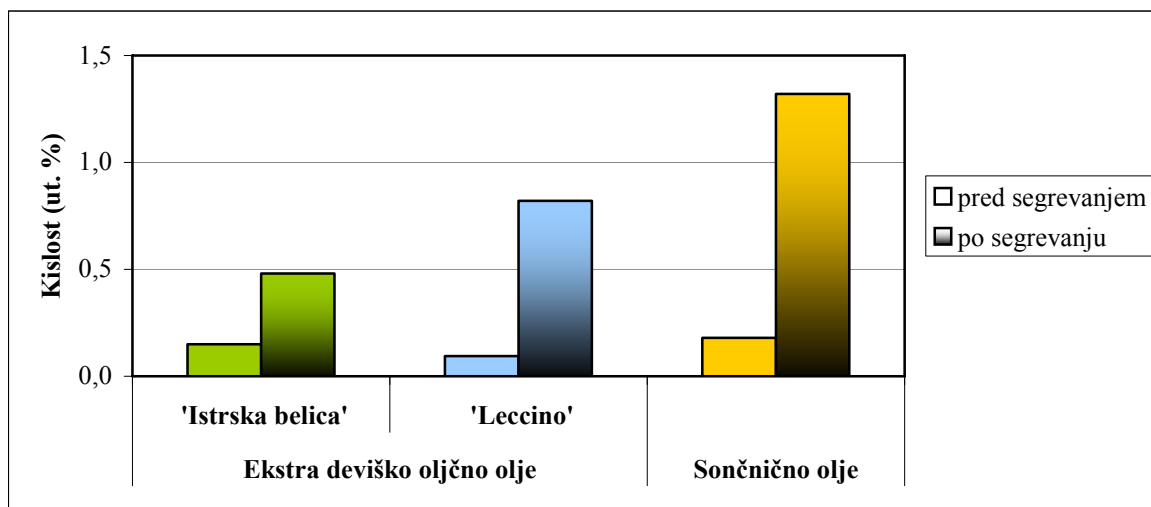
Odvisnost antioksidacijske učinkovitosti od časa in temperature segrevanja je podana na sliki 48. I_{50} je izračunana kot količina olja, ki zmanjša začetno količino radikala DPPH na polovico. Bolj nazoren pa je prikaz ARP, to je $1/I_{50}$. ARP se je med segrevanjem vzorcev zmanjševala, izjema je prvih šest ur segrevanja vzorca 'Leccina' pri 100 °C, ko je ARP celo rahlo naraščala. Med segrevanjem pri 180 °C se je ARP zmanjševala hitreje kot pri 100 °C.

4.4 SPREMEMBE PROUČEVANIH PARAMETROV V EKSTRA DEVIŠKEM OLJČNEM OLJU IN SONČNIČNEM OLJU PO STOURNEM SEGREVANJU PRI 180 °C

Dva vzorca EDOO (povprečna vzorca sorte 'Istrska belica' in 'Leccino') ter vzorec sončničnega olja smo segrevali sto ur pri temperaturi 180 °C. V tem poglavju so podani rezultati analiz vzorcev pred segrevanjem in vzorcev po segrevanju. Preglednica z vsemi rezultati je podana v Prilogi D1.

4.4.1 Rezultati ugotavljanja stopnje oksidiranosti ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po stournem segrevanju pri 180 °C

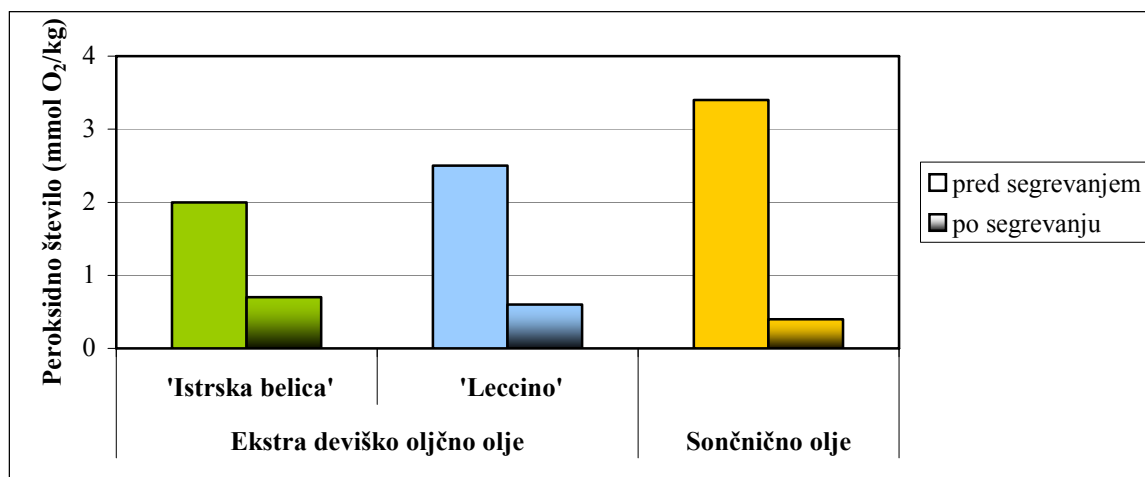
Vrednosti parametrov, ki so pokazatelji stopnje oksidiranosti olja, v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja so podane v prilogi D1.



Slika 49: Kislost v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 49: Acidity in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours

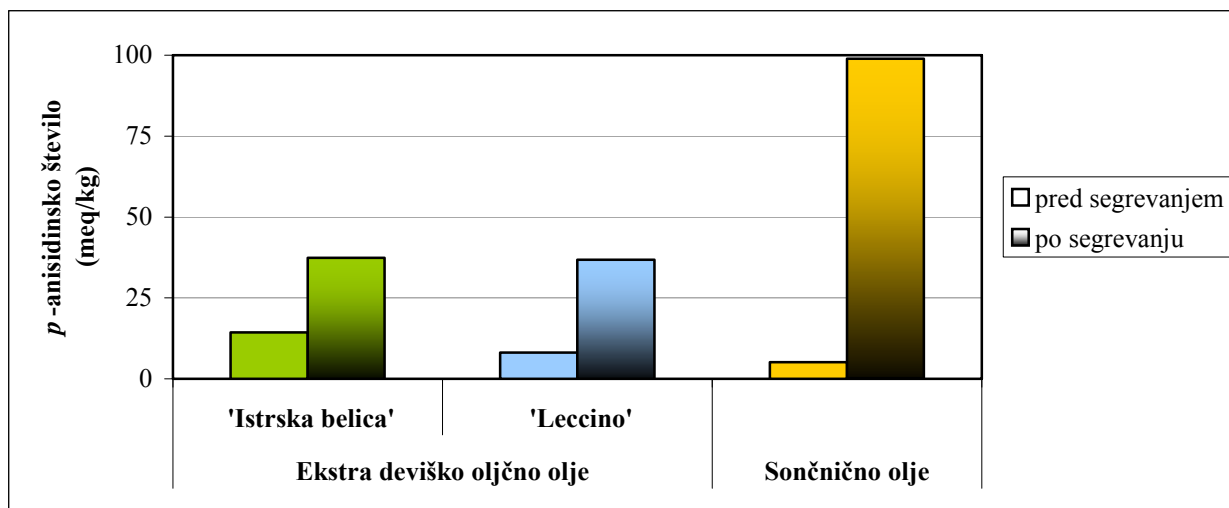
Pred začetkom segrevanja je imel največjo kislost vzorec sončničnega olja (0,18 ut. %), najmanjšo pa vzorec EDOO sorte 'Leccino' (0,095 ut. %). Po stotih urah segrevanja pri 180 °C se je kislost v vseh vzorcih povečala, najmanj v vzorcu 'Istrske belice', najbolj pa v sončničnem olju (slika 49).



Slika 50: Peroxidno število v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 50: Peroxide value in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours

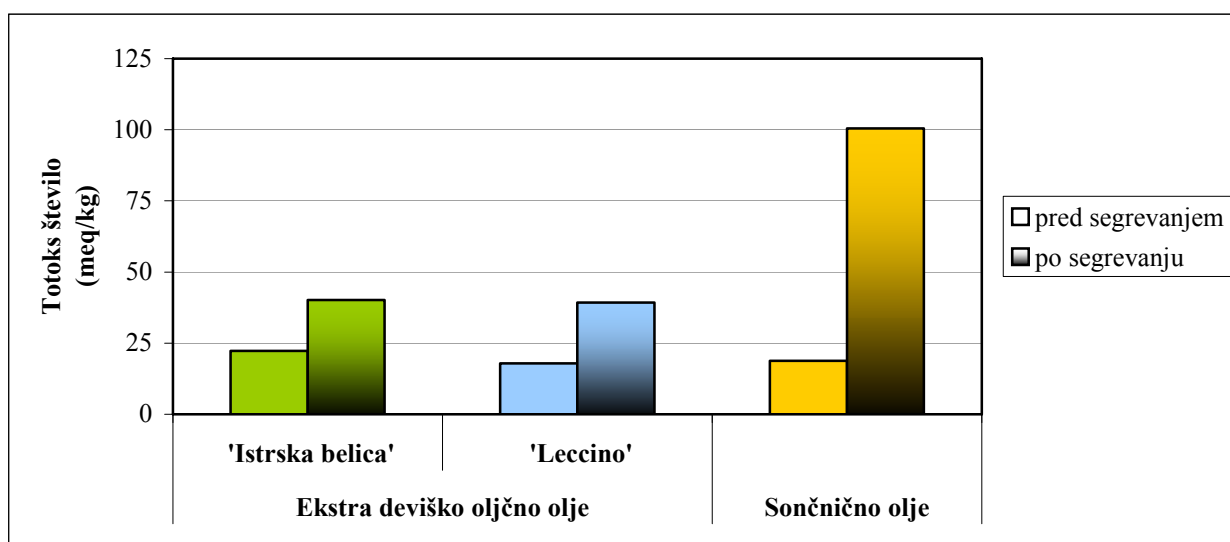
Pred segrevanjem je bilo peroksidno število najmanjše v vzorcu EDOO sorte 'Istrska belica' (2,0 mmol O₂/kg), naječje pa v sončničnem olju (3,4 mmol O₂/kg). Med segrevanjem se je peroksidno število v vseh vzorcih zmanjšalo na vrednosti pod 1 mmol O₂/kg (Slika 50).



Slika 51: *p*-anisidinsko število v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 51: *p*-anisidine value in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours

Slika 51 prikazuje vrednosti *p*-anisidinskega števila v vzorcih pred segrevanjem in po njem. Pred segrevanjem je bilo *p*-anisidinsko število najmanjše v sončničnem olju (5,1 meq/kg), največje pa v vzorcu EDOO sorte 'Istrska belica' (14,3 meq/kg). Med segrevanjem je v obeh oljčnih oljih doseglo vrednost 37 meq/kg, v sončničnem pa je bilo precej večje (99 meq/kg).

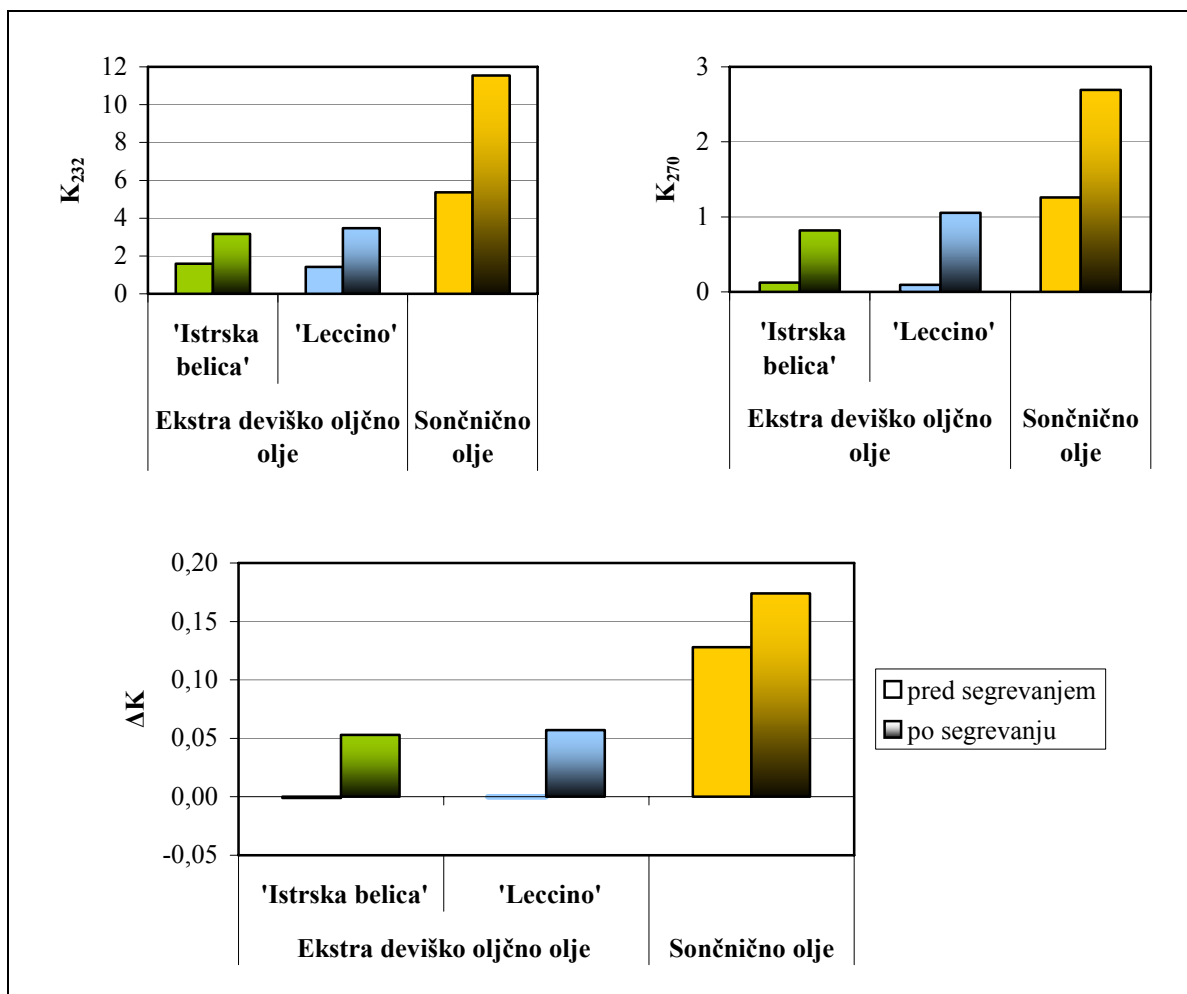


Slika 52: Totoks število v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 52: Totox value in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours

Pred segrevanjem so bile med vzorci EDOO sorte 'Istrska belica' in sorte 'Leccino' ter sončničnega olja relativno majhne, a statistično značilne razlike v totoks številu. Totoks število se je v vseh oljih med segrevanjem povečalo (slika 52). Po segrevanju se oba vzorca oljčnega olja med sabo nista razlikovala glede na totoks število (približno 40 meq/kg), v vzorcu sončničnega olja pa je bilo totoks število precej večje (101 meq/kg).

Slika 53 prikazuje vrednosti spektrofotometrijskih parametrov K_{232} , K_{270} in ΔK v vzorcih pred segrevanjem in po njem. Vrednosti vseh treh parametrov so bile v obeh oljčnih oljih veliko nižje kot v sončničnem olju. V vseh vzorcih so se med segrevanjem močno povišale.



Slika 53: Vrednosti K_{232} , K_{270} in ΔK v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 53: Values of K_{232} , K_{270} and ΔK in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours

4.4.2 Rezultati določevanja maščobnokislinske sestave ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po stournem segrevanju pri 180 °C

Preglednica 12 prikazuje maščobnokislinsko sestavo vzorcev EDOO in sončničnega olja pred segrevanjem in po njem. V obeh oljčnih oljih je bilo pred segrevanjem največ oleinske kisline (78,02 ut. % v vzorcu 'Istrske belice' in 77,80 ut. % v vzorcu 'Leccina'), sledile so palmitinska, linolna, stearinska in palmitoleinska kislina. V sončničnem olju pa je bilo največ linolne kisline (66,94 ut. %), nato so sledile oleinska, palmitinska in

stearinska kislina. Deleži ostalih kislin so bili v vseh treh obravnavanih vzorcih manjši od 1 ut. %.

Preglednica 12: Maščobnokislinska sestava v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

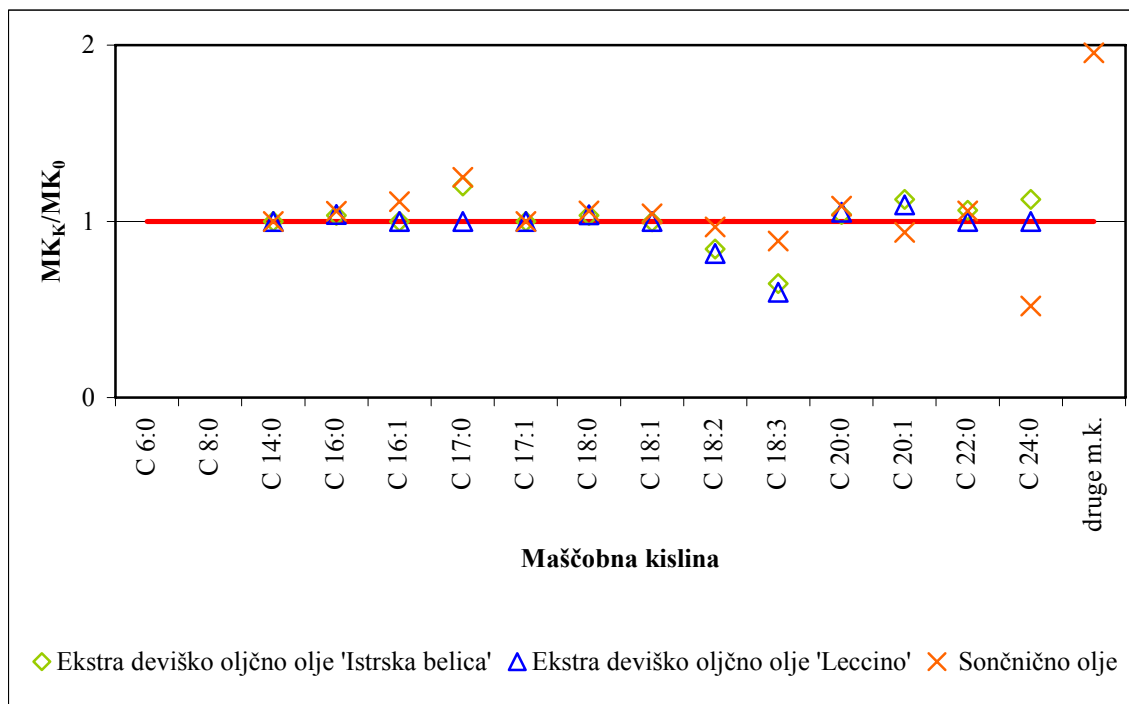
Table 12: Fatty acid composition in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours

Maščobna kislina (ut. %)	Vzorci olja					
	Ekstra deviško oljčno olje 'Istrska belica'		Ekstra deviško oljčno olje 'Leccino'		Sončnično olje	
	Pred	Po	Pred	Po	Pred	Po
C 6:0	-	0,01	-	0,02	-	-
C 8:0	-	0,04	-	0,05	-	0,10
C 14:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,07	0,07
C 16:0	11,20	11,58	12,17	12,65	6,23	6,59
C 16:1	0,97	0,97	1,11	1,11	0,09	0,10
C 17:0	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05
C17:1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,03	0,03
C 18:0	2,97	3,07	2,15	2,23	3,44	3,64
C 18:1	78,02	77,87	77,80	77,76	21,05	21,96
C 18:2	5,10	4,30	5,11	4,18	66,94	64,78
C 18:3	0,51	0,33	0,62	0,37	0,09	0,08
C 20:0	0,51	0,53	0,38	0,40	0,23	0,25
C 20:1	0,32	0,36	0,32	0,35	0,16	0,15
C 22:0	0,16	0,17	0,12	0,12	0,68	0,72
C 24:0	0,08	0,09	0,06	0,06	0,25	0,13
druge mk	-	0,52	-	0,54	0,69	1,35

Pred: pred segrevanjem; Po: po segrevanju; mk: maščobne kisline.

Pred: before heating; Po: after heating; mk: fatty acids.

Prva razlika, ki jo opazimo glede maščobnokislinske sestave v vzorcih po stournem segrevanju pri 180 °C, je pojav maščobnih kislin, ki jih v vzorcih pred segrevanjem ni bilo. V vseh treh vzorcih smo namreč po segrevanju določili prisotnost kaprilne kisline (C 8:0), v vzorcih obeh oljčnih olj pa tudi kapronske kisline (C 6:0). Poleg tega smo v kromatogramih olj po segrevanju opazili tudi vrhove za maščobne kisline, ki jih nismo identificirali, njihova vsota pa je podana kot 'druge maščobne kisline'. Izmed kislin, ki so bile prisotne v vzorcih že pred segrevanjem, se je najbolj zmanjšal delež linolenske kisline, v sončničnem olju pa tudi delež lignocerinske kisline (C 24:0). V vseh treh vzorcih se je statistično značilno zmanjšal tudi delež linolne kisline. Statistično značilno so se povečali deleži nenasičenih maščobnih kislin: palmitinske, stearinske, arašidove (C 20:0) in behenske kisline (C 22:0). Spremembe maščobnokislinske sestave obravnavanih vzorcev med stournim segrevanjem pri 180 °C prikazuje slika 54.



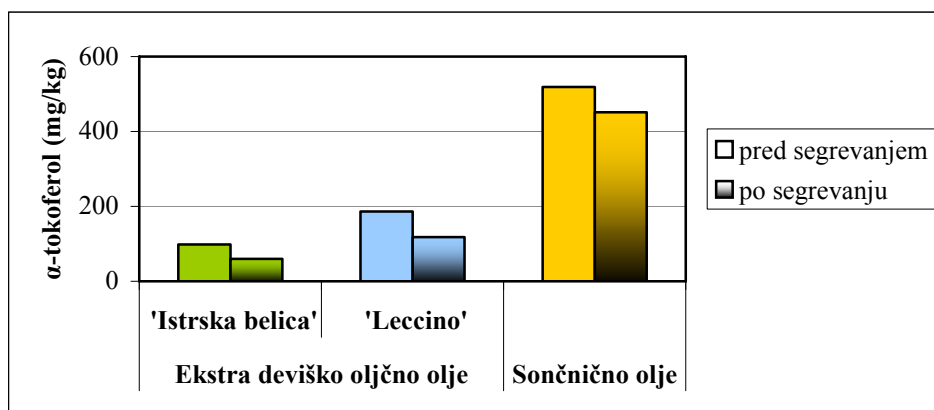
Slika 54: Razmerje med vsebnostjo posameznih maščobnih kislin v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C (MK_{PO} : ut. % maščobne kisline po segrevanju; MK_{PRED} – ut. % maščobne kisline pred segrevanjem; m.k.: maščobne kisline)

Figure 54: Relationship between the content of individual fatty acids in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours. (MK_{PO} : % of fatty acid after thermal treatment; MK_{PRED} - % of fatty acid before thermal treatment; druge m.k.: other fatty acids)

4.4.3 Rezultati določevanja vsebnosti antioksidantov in antioksidacijske učinkovitosti v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju pred segrevanjem in po stournem segrevanju pri 180 °C

Rezultati določevanja vsebnosti antioksidantov in antioksidacijske učinkovitosti v vzorcih EDOO in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C so podani v Prilogi D1.

Vsebnost α -tokoferola je bila pred segrevanjem največja v sončničnem olju, najmanjša pa v vzorcu 'Istrske belice'. Med segrevanjem se je v vseh vzorcih zmanjšala.



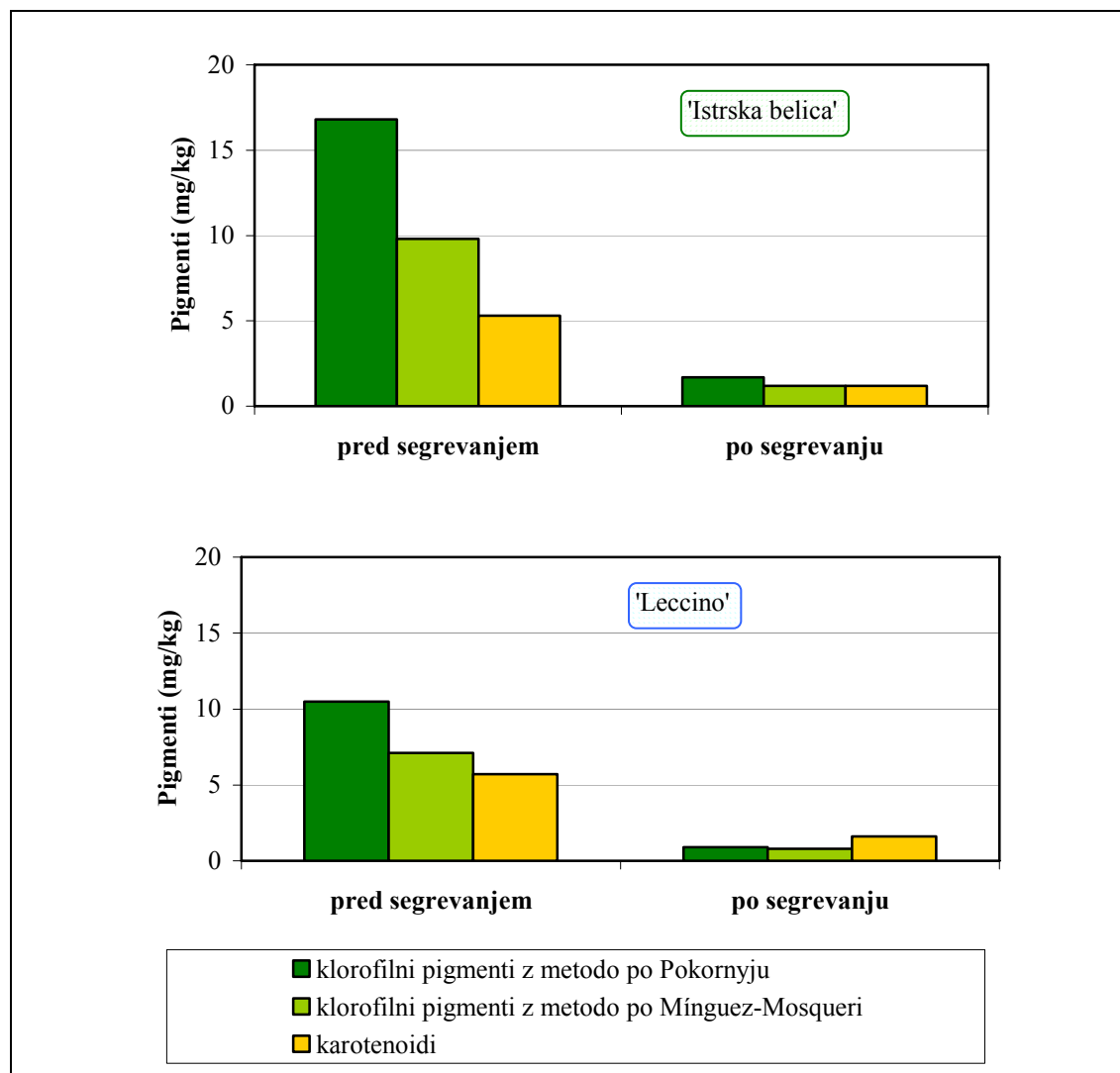
Slika 55: Vsebnosti α -tokoferola v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 55: α -tocopherol in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours

Vzorec EDOO sorte 'Istrska belica' je pred segrevanjem vseboval več pigmentov, tako klorofilnih kot karotenoidov, kot vzorec EDOO sorte 'Leccino'. V obeh vzorcih je bila vsebnost klorofilnih pigmentov večja od vsebnosti karotenoidov (slika 56).

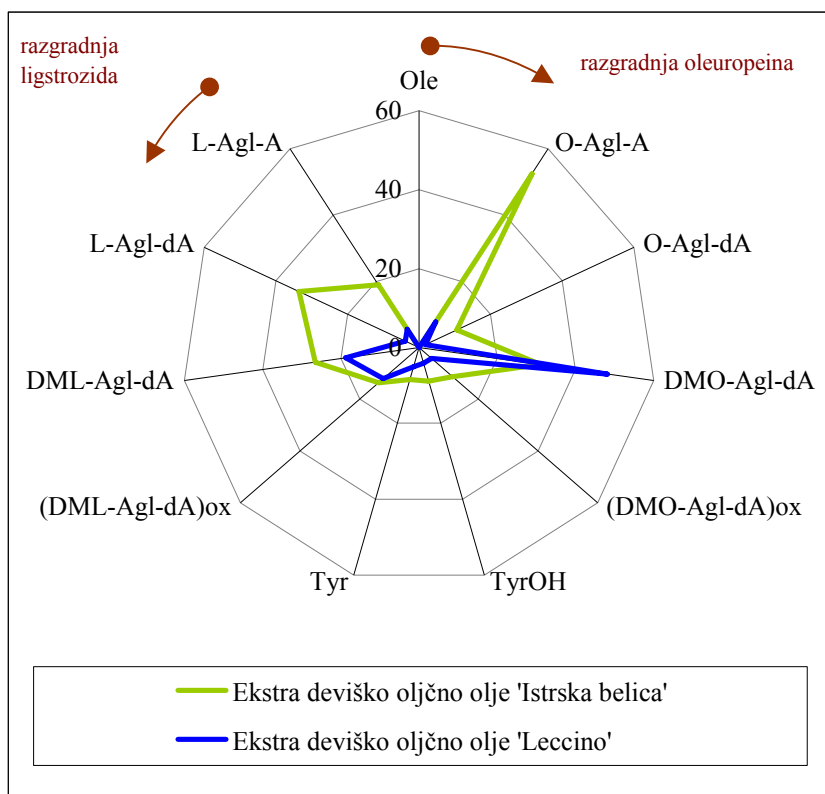
Z metodo po Mínguez-Mosqueri smo določili manjšo vsebnost klorofilnih pigmentov kot z metodo po Pokornyju. Korelacija med metodama je bila zelo tesna, korelacijski koeficient je bil 0,99.

Med segrevanjem vzorcev EDOO se je vsebnost pigmentov zmanjšala. Vsebnost klorofilnih pigmentov, določenih z metodo po Mínguez-Mosqueri, v vzorcu 'Istrske belice' je bila po končanem segrevanju enaka vsebnosti karotenoidov (1,2 mg/kg). Z metodo po Pokornyju pa smo določili nekoliko večjo vsebnost klorofilnih pigmentov (1,7 mg/kg). V vzorcu 'Leccina' smo z obema metodama določili enako vsebnost klorofilnih pigmentov (0,8 oziroma 0,9 mg/kg), vsebnost karotenoidov pa je bila večja (1,6 mg/kg).



Slika 56: Vsebnosti klorofilnih pigmentov in karotenoidov v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 56: Chlorophyllic pigments and carotenoids in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* before and after heating at 180 °C for 100 hours

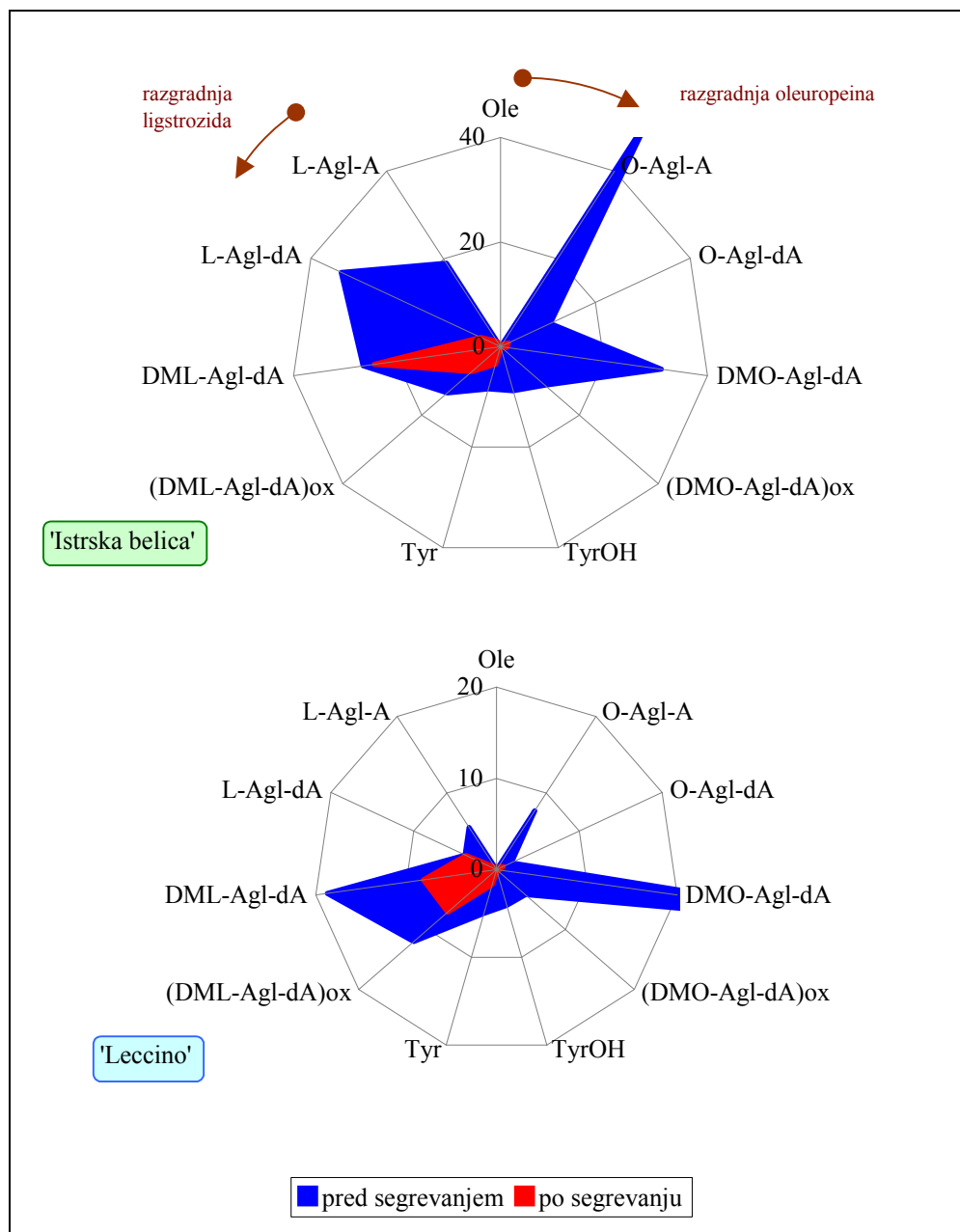


Slika 57: Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred stournim segrevanjem

Figure 57: Secoiridoid biophenols composition (mg/kg) in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* before heating for 100 hours

Slika 57 prikazuje sestavo sekoiridoidnih biofenolov v obeh vzorcih EDOO pred segrevanjem. Vsebnost posameznih biofenolov je bila večja v vzorcu 'Istrske belice' kot v vzorcu 'Leccina'. V vzorcu 'Istrske belice' sta med derivati oleuropeina prevladovala O-Agl in DMO-Agl-dA, ostalih derivatov oleuropeina pa je bilo v olju 10 mg/kg ali celo manj. Razlike v vsebnostih derivatov ligstrozida v vzorcu 'Istrske belice' so bile manjše; v olju je bilo največ L-Agl-dA, sledila pa sta DML-Agl-dA in L-Agl. V vzorcu 'Leccina' pa je bilo izmed derivatov oleuropeina daleč največ DMO-Agl-dA, vseh ostalih derivatov oleuropeina je bilo pod 8 mg/kg.

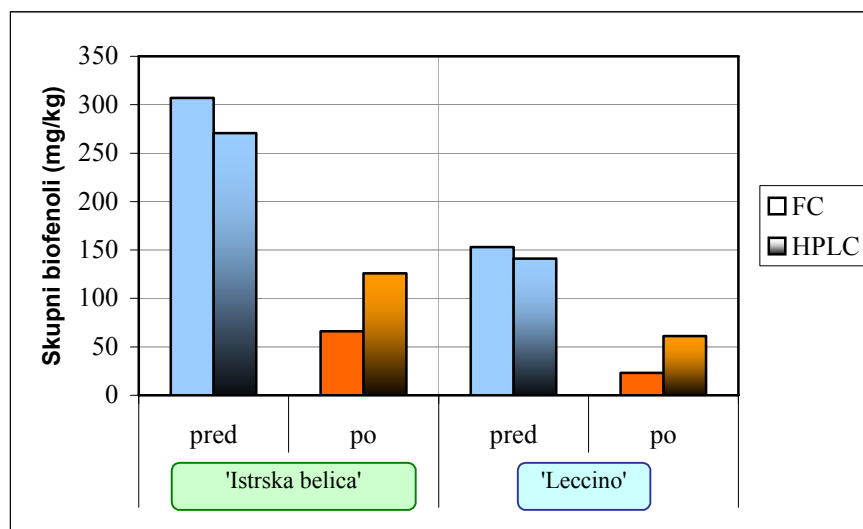
Slika 58 prikazuje primerjavo vsebnosti sekoiridoidnih biofenolov v obeh vzorcih oljčnega olja pred stournim segrevanjem pri 180 °C in po njem. Vsebnosti posameznih biofenolov so se močno zmanjšale, zlasti to velja za derivate oleuropeina, saj so bile vse njihove vsebnosti v vzorcih po segrevanju pod 2 mg/kg. V vzorcu 'Istrske belice' je bilo po segrevanju največ DML-Agl-dA (24,4 mg/kg), v vzorcu 'Leccina' pa je bila poleg te spojine (8,1 mg/kg) tudi le malo manjša vsebnost njene oksidirane oblike (DML-Agl-dA)ox (7,1 mg/kg).



Slika 58: Vsebnost sekoiridoidnih biofenolov (mg/kg) v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 58: Secoiridoid biophenols composition (mg/kg) in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* before and after heating for 100 hours at 180 °C

V obeh vzorcih oljčnega olja sta med segrevanjem nastali dve novi neidentificirani spojini, ki ju v kromatogramu vidimo kot pika z retencijskima časoma okrog 42,5 minut in okrog 43,4 minute.

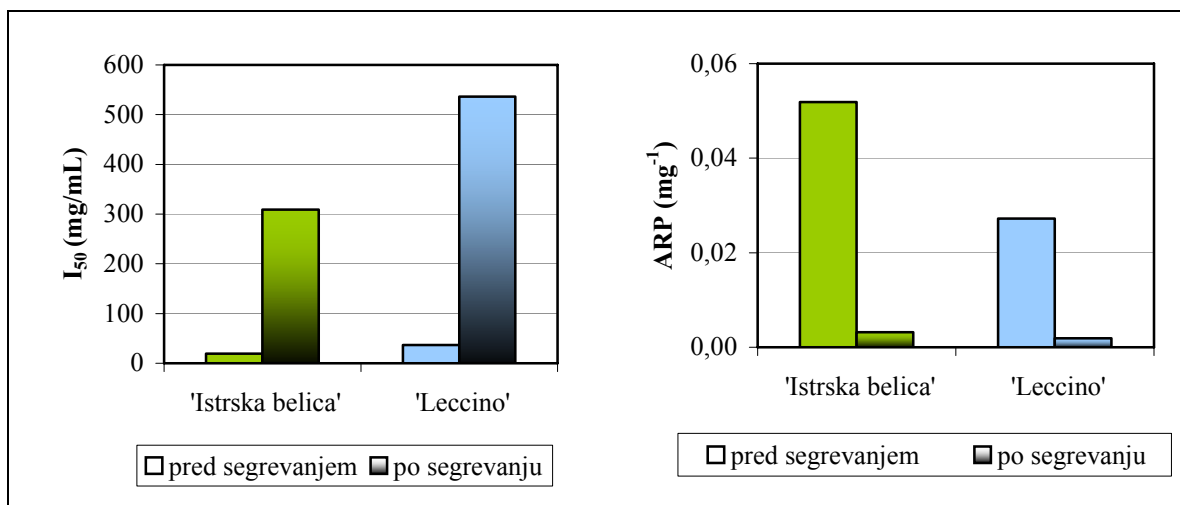


Slika 59: Skupni biofenoli, določeni z metodo FC in z metodo HPLC, v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 59: Total biophenols (determined with FC method and HPLC method) in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* before heating and after heating at 180 °C for 100 hours

Slika 59 prikazuje primerjavo vsebnosti skupnih biofenolov v obeh vzorcih oljčnega olja pred stournim segrevanjem pri 180 °C in po njem. Prikazani so rezultati določitve vsebnosti skupnih biofenolov z metodo FC, pa tudi vsote vseh biofenolov, določenih s HPLC. Vzorec 'Istrske belice' je vseboval več biofenolov kot vzorec 'Leccina', tako pred segrevanjem kot po njem. Vsebnost biofenolov se je v obeh vzorcih med segrevanjem močno zmanjšala. Vsota s HPLC določenih biofenolov je bila v vzorcih pred segrevanjem nekoliko manjša od skupnih biofenolov, določenih z metodo FC; v vzorcih po segrevanju pa smo s HPLC dobili precej višje rezultate kot z metodo FC.

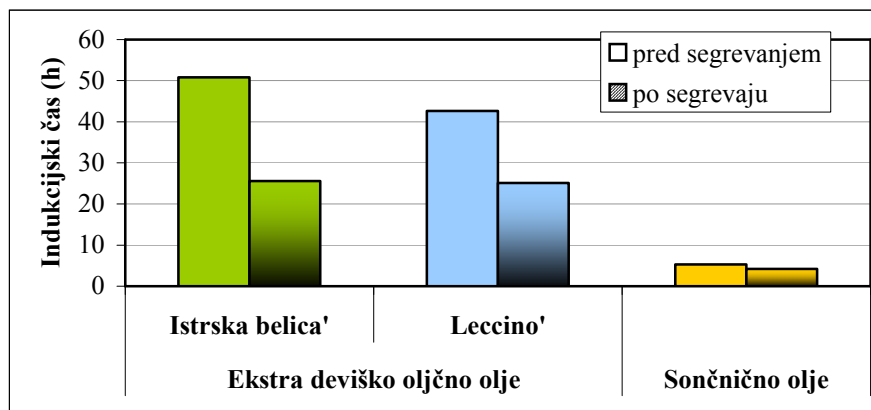
Slika 60 prikazuje antioksidacijsko učinkovitost obeh vzorcev oljčnega olja pred segrevanjem in po njem. Prikazana sta I_{50} in ARP. Na sliki je razvidno, da je imel vzorec 'Istrske belice' pred segrevanjem večjo antioksidacijsko učinkovitost, izraženo kot ARP, kot vzorec 'Leccina', med segrevanjem pa se je antioksidacijska učinkovitost obeh vzorcev močno zmanjšala.



Slika 60: Antioksidacijska učinkovitost v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 60: Antioxidant activity in extra virgin olive oil samples of cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino* before heating and after heating at 180 °C for 100 hours

4.4.4 Rezultati določevanja oksidacijske stabilnosti ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po stournem segrevanju pri 180 °C



Slika 61: Oksidacijska stabilnost v vzorcih ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja pred segrevanjem in po 100 urah segrevanja pri 180 °C

Figure 61: Oxidation stability in samples of extra virgin olive oil and sunflower oil before and after heating at 180 °C for 100 hours

Oksidacijska stabilnost vzorcev pred stournim segrevanjem pri 180 °C in po njem je prikazana na sliki 61. V vseh vzorcih se je med segrevanjem oksidacijska stabilnost statistično značilno zmanjšala.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V doktorski disertaciji smo proučevali oksidacijsko stabilnost EDOO in v okviru eksperimentalnega dela spremljali spremembe proučevanih parametrov med skladiščenjem in segrevanjem pri različnih pogojih. Razpravo o dobljenih rezultatih, njihovem ujemanju z obstoječimi podatki iz literature in statističnih ugotovitvah smo strnili v dva sklopa: skladiščenje in segrevanje.

5.1 VPLIV SKLADIŠČENJA EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA NA PROUČEVANE PARAMETRE

Namen prvega sklopa raziskave je bil ugotoviti, kako skladiščenje pri nizkih temperaturah ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) vpliva na parametre kakovosti, vsebnost antioksidantov in oksidacijsko stabilnost oljčnega olja. V svetu je bilo doslej narejenih mnogo raziskav o skladiščenju oljčnega olja pri sobni temperaturi ali pri še višjih temperaturah (Gambacorta in sod., 2004; Gallardo-Guerrero in sod., 2005; Cosio in sod., 2007). Cilj teh raziskav je bil ugotoviti, kakšne spremembe potekajo v olju pri pogojih skladiščenja v trgovini ali v gospodinjstvih. Ugotavljali so na primer razlike med skladiščenjem v temi in na svetlobi ali pa vpliv različne vrste embalaže ter poskušali napovedati rok trajanja olja (Kanavouras in Coutelieris, 2006). Namen naše raziskave pa je bil spremljati vpliv skladiščenja v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter ugotoviti optimalne pogoje za shranjevanje referenčnih vzorcev.

Laboratorij za preskušanje oljčnega olja, v katerem je potekala raziskava, je akreditiran laboratorij. Akreditacija obsega metode, ki jih navaja Uredba Komisije (EGS) št. 2568/91 (Uredba Komisije..., 1991), nekatere metode po ISO standardih s področja oljčnega olja in metode, ki jih predpisuje Mednarodni svet za oljkarstvo. Za področje kontrole kakovosti oljčnega olja ni na voljo standardnih referenčnih vzorcev, zato si z namenom zagotavljanja zanesljivih in ponovljivih rezultatov preskusov sami pripravljamo referenčni vzorec, ki ga skladiščimo več mesecev v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sledljivost rezultatov zagotavljamo s pomočjo mednarodnih medlaboratorijskih primerjav. V ta namen istočasno analiziramo vzorec, ki smo ga prejeli za medlaboratorijsko primerjavo, in naš laboratorijski referenčni vzorec. Z določitvijo posameznih parametrov v vzorcu iz medlaboratorijske primerjave zagotavljamo pravilnost rezultatov, določenih v laboratorijskem referenčnem vzorcu. Laboratorijski referenčni vzorec uporabljamo kot standardni vzorec pri vsaki seriji preskusov, ki jo opravljamo za naročnike ali v raziskovalne namene.

Uporaba laboratorijskega referenčnega vzorca je smiselna le, če je zagotovljeno, da se določevani parameter v vzorcu ne spreminja pri pogojih skladiščenja v dovolj dolgem časovnem obdobju. Namen tega sklopa preskusov je bil ugotoviti, ali se parametri, na katerih vrednost vpliva stopnja oksidiranosti olja, in parametri, ki vplivajo na potek oksidacije olja, spremenijo pri skladiščenju v temi pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ in kakšen je obseg teh sprememb v obdobju enega leta.

Ker je sezona pridelovanja olja iz oljk zelo kratka, omejena na meseca november in december, je nemogoče vse pridobljene vzorce analizirati takoj, ko jih dobimo, zato jih zamrzemo in analiziramo kasneje. Pri tem je zelo pomembno, da poznamo vpliv skladiščenja na posamezne sestavine oljčnega olja, da ne bi pri raziskavah dobili nerealnih rezultatov, ki bi bili posledica sprememb vzorca zaradi skladiščenja.

V raziskavi smo ugotavljali vpliv skladiščenja pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ na osnovne kemijske parametre kakovosti oljčnega olja, maščobnokislinsko sestavo, vsebnost antioksidantov in oksidacijsko stabilnost oljčnega olja.

V raziskavo vključeni vzorci EDOO so imeli na začetku raziskave (sveži vzorci) zelo majhno kislost, povprečna kislost (0,14 ut. %) je bila precej manjša od vrednosti 0,80 ut. %, ki jo za EDOO dovoljuje Uredba Komisije (EGS) št. 2568 (Uredba Komisije..., 1991). Med skladiščenjem se je kislost sicer nekoliko povečala (v vzorcih 'Istrske belice' in v vzorcih 'Leccina' za 0,1 ut. % pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in za 0,2 ut. % pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$), vendar so bile razlike statistično značilne le pri vzorcih sorte 'Leccino', skladiščenih v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tudi po končanem poskusu je bila kislost v vseh vzorcih EDOO še vedno precej pod mejno vrednostjo. Gutiérrez in Fernández (2002) sta vzorce grškega sortnega oljčnega olja pol leta skladiščila v temi pri $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. V tem času se kislost vzorcev ni spremenila. Gambacorta in sod. (2004) so poročali, da se tudi pri sobni temperaturi kislost v roku enega leta ni spremenila. Gallardo-Guerrero in sod. (2005) pa so med enoletnim skladiščenjem v temi pri $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ugotovili, da se je kislost v nekaterih vzorcih statistično značilno povečala, v drugih pa ne.

Pri vzorcih EDOO, skladiščenih v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, se je peroksidno število s povprečne vrednosti 2,4 mmol O_2/kg v vzorcih 'Istrske belice' oziroma 2,0 mmol O_2/kg v vzorcih 'Leccina' povečalo za približno trikrat. Peroksidno število se je povečalo tudi v vzorcih, skladiščenih v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, vendar so bile razlike statistično značilne le v vzorcih sorte 'Leccino', v vzorcih sorte 'Istrska belica' pa ne. Gutiérrez in Fernández (2002) navajata, da se je peroksidno število v vzorcih oljčnega olja, skladiščenega v temi pri $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, v prvih 21 dneh podvojilo, nato pa šest mesecev ostalo konstantno.

Glede na rezultate določevanja peroksidnega števila v obravnavanih vzorcih EDOO ugotavljamo, da skladiščenje laboratorijskega referenčnega vzorca pri 8 °C torej ni primerno, vprašljivo je tudi skladiščenje pri -20 °C. Menimo, da bi bilo potrebno spremljati peroksidno število tudi v krajših časovnih intervalih in določiti maksimalni čas hranjenja olja, ki še zagotavlja, da se peroksidno število ne spremeni. V Laboratoriju za preskušanje oljčnega olja uporabimo za referenčni vzorec vedno kakovostno ekstra deviško oljčno olje, ki je v času priprave minimalno oksidirano, ker predvidevamo, da se bo takšno olje počasneje oksidiralo in se bodo vrednosti posameznih parametrov v njem počasneje spreminjale. Poleg tega večkrat letno sodelujemo v medlaboratorijskih primerjavah in sočasno vedno kontroliramo tudi laboratorijski referenčni vzorec ter tako zagotavljamo njegovo primernost za nadaljnjo uporabo.

V Uredbi Komisije... (1991) je za ugotavljanje kakovosti EDOO predpisana tudi spektrofotometrijska preiskava v UV. Povprečni vrednosti K_{232} v svežih vzorcih 'Leccina' (1,622) in 'Istrske belice' (1,669) sta bili praktično enaki. Vrednost K_{232} se med skladiščenjem pri -20 °C ni statistično značilno spremenila, medtem ko se je v vzorcih, skladiščenih pri 8 °C, statistično značilno povišala. V vseh vzorcih je bila tudi po skladiščenju vrednost K_{232} precej nižja od mejne vrednosti za ekstra deviško oljčno olje (2,2), saj je bila najvišja izmerjena vrednost po skladiščenju pri 8 °C 0,205. Tudi povprečni vrednosti K_{270} se v svežih vzorcih 'Leccina' (0,120) in 'Istrske belice' (0,133) nista statistično značilno razlikovali. Vrednost K_{270} se je med skladiščenjem rahlo povečala, a statistično neznačilno. Gutiérrez in Fernández (2002) navajata, da se vrednosti K_{232} in K_{270} med polletnim skladiščenjem v temi pri 2 °C nista bistveno spremenili. Gambacorta in sod. (2004) so ugotavljali vpliv enoletnega skladiščenja oljčnega olja v različni embalaži pri sobni temperaturi. Ugotovili so, da se je vrednost K_{232} med skladiščenjem povečala le v vzorcih v PET (polietilen tereftalat) embalaži, v vzorcih v steklenicah pa ne, vrednost K_{270} pa je narasla tako v vzorcih v stekleni kot v PET embalaži.

Pomemben parameter pri spremljanju vplivov skladiščenja na kakovost EDOO je maščobnokislinska sestava. Primerjava maščobnokislinske sestave v vzorcih 'Istrske belice' in vzorcih 'Leccina' kaže, da so olja iz 'Leccina' vsebovala več večkrat nenasičenih maščobnih kislin in manj enkrat nenasičenih ter nasičenih maščobnih kislin. Ker hitrost oksidacije narašča s številom dvojnih vezi v molekuli maščobne kisline (Guillén in Ruiz, 2006), na rok trajanja referenčnega vzorca vpliva tudi maščobnokislinska sestava, ki je nekoliko ugodnejša v oljih sorte 'Istrska belica' kot v oljih sorte 'Leccino'. Deleži vseh maščobnih kislin so ostali med skladiščenjem nespremenjeni ne glede na temperaturo. Tudi Gutiérrez in Fernández (2002) sta poročala, da se maščobnokislinska sestava vzorcev oljčnega olja ni spremenila, čeprav so vzorce skladiščili šest mesecev na osvetljenih policah pri 30 °C. Opazili so le zmanjšanje deležev linolne in linolenske kisline, ki pa ni bilo statistično značilno.

Pomembna sestavina oljčnega olja je α -tokoferol. Njegova vsebnost je med drugim pogojena tudi s sorto. Rezultati naše raziskave so pokazali, da so olja iz sorte 'Istrska belica' vsebovala manj α -tokoferola (v povprečju 117 mg/kg) kot olja iz 'Leccina' (povprečno 335 mg/kg), kar je v skladu s predhodnimi ugotovitvami (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000). Tudi Paz Aguilera in sod. (2005) so v oljih sorte 'Leccino', pridelanih v Andaluziji, določili vsebnosti α -tokoferola približno 300 mg/kg. V oljih obeh obravnavanih sort se vsebnost α -tokoferola ni statistično značilno spremenila niti med skladiščenjem pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ niti pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tudi Gutiérrez in Fernández (2002) sta poročala, da se vsebnost α -tokoferola med šestmesečnim skladiščenjem pri $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ni spremenila.

Uredba Komisije... (1991) sicer ne predpisuje določevanja biofenolov. Ker pa raziskave zadnjih let kažejo, da so biofenoli antioksidanti, ki bistveno prispevajo k oksidacijski obstojnosti oljčnega olja, smo v raziskavo vključili tudi določevanje vsebnosti biofenolov in biofenolne sestave. Poleg tega je za ekstra deviško oljčno olje Slovenske Istre z zaščiteno označbo porekla (Bučar-Miklavčič in sod., 2003) med drugimi parametri predpisana tudi minimalna vsebnost skupnih biofenolov (100 mg/kg), ta parameter pa je predpisan tudi za večino drugih ekstra deviških oljčnih olj z zaščiteno označbo porekla v svetu.

Podatkov o vplivu skladiščenja oljčnega olja pri nizkih temperaturah na biofenole ni dosti, zato smo se odločili v poskus vključiti tudi te parametre. Rezultati naše raziskave so pokazali, da so sveži vzorci vsebovali relativno precej biofenolov z začetka razgradne poti ligstrozida in oleuropeina ter malo končnih fenolnih produktov razgradnje (8,5 mg/kg hidroksitirosola in 11,7 mg/kg tirosola). Taka biofenolna sestava je značilna za kakovostna sveža olja, ki še niso bila izpostavljena dolgotrajnim in/ali intenzivnim zunanjim vplivom, ki pospešujejo oksidacijo. Med skladiščenjem so kljub nizki temperaturi ter odsotnosti svetlobe in zraka potekale kemijske pretvorbe biofenolov. V skladu s pričakovanji je bila hitrost pretvorb pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ minimalna, nekoliko intenzivneje pa so pretvorbe potekale pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vsebnosti hidroksitirosola in tirosola so ostale majhne in se niso bistveno spreminjale. Vsebnost lignanov je v vzorcih 'Leccina' ostala nespremenjena, v vzorcih 'Istrske belice' pa se je zmanjšala med skladiščenjem pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Enako velja za flavonoida luteolin in apigenin. Vsota vseh s HPLC določenih biofenolov se je v vzorcih 'Istrske belice', skladiščenih v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, zmanjšala, v vseh ostalih vzorcih pa zmanjšanje ni bilo statistično značilno. Za olja, v katerih nameravamo določevati biofenole, vendar določevanja ne moremo opraviti v svežih vzorcih, so primerni pogoji skladiščenja pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vendar pa je priporočljivo analize opraviti čimprej, saj kljub pogojem, ki ne pospešujejo oksidacije olja, poteka počasna razgradnja biofenolov, kar povzroči spremembo razmerja med posameznimi spojinami.

Vsebnost biofenolov, določenih z metodo FC, se je med skladiščenjem v hladilniku pri 8 °C zmanjšala, v vzorcih 'Leccina' pa se je zmanjšala tudi med skladiščenjem v zmrzovalniku pri -20 °C. V posameznem vzorcu je lahko vsota biofenolov, določenih s HPLC, večja ali manjša od vsebnosti skupnih biofenolov, določenih z metodo FC. Razlike so posledica principa posamezne metode. Pri določitvi z metodo FC merimo absorbanco spojin, ki nastanejo pri reakciji med reagentom Folin-Ciocalteu in biofenoli, rezultat pa podajamo v miligramih kavne kisline na kilogram olja. Pri tem pa zanemarjamo dejstvo, da je potek reakcije odvisen od števila hidroksilnih skupin v molekuli biofenola in da imajo nastale spojine različne ekstinkcijske koeficiente, poleg tega pa so različne tudi molske mase biofenolov. Ustrezneje bi bilo torej podajati molarne koncentracije namesto masnih. Pri določevanju biofenolov s HPLC večino sekoiridoidnih biofenolov kvantificiramo z uporabo umeritvene krivulje za tirozol (Cortesi in sod., 2002), poleg tega pa tudi pri tej metodi ne upoštevamo različnih molskih mas teh spojin. Primerjava vsebnosti biofenolov, določenih z dvema različnima metodama, torej ni umestna. Korelacija rezultatov, dobljenih z omenjenima metodama, je bila šibka, korelacijski koeficient je znašal le 0,61.

Za ugotavljanje oksidacijske stabilnosti so uporabne različne metode, za oljčna olja pa se največ uporablja metoda Rancimat, ki omogoča avtomatizirano določevanje oksidacijske stabilnosti, metoda pa je tudi statistično ovrednotena (Gutiérrez-Rosales, 1989). Povprečen indukcijski čas v svežih vzorcih EDOO sorte 'Istrska belica' (114 ur) je bil daljši kot v vzorcih sorte 'Leccino' (78 ur). Menimo, da je to posledica maščobnokislinske sestave in vsebnosti antioksidantov. Indukcijski čas se je med skladiščenjem pri 8 °C v vzorcih 'Istrske belice' statistično značilno skrajšal, v vzorcih 'Leccina' pa skrajšanje ni bilo statistično značilno.

Iskanje zveze med proučevanimi parametri in oksidacijsko stabilnostjo je pokazalo, da peroksidno število in spektrofotometrijski parametri niso korelirali z oksidacijsko stabilnostjo. Korelacijski koeficient med vsebnostjo nasičene stearinske kisline in oksidacijsko stabilnostjo je bil 0,92.

Fenolne spojine verjetno bolje ščitijo oljčno olje pred oksidacijo kot α -tokoferol (Rastrelli in sod., 2002). Baldioli in sod. (1996) so pokazali, da oksidacijska stabilnost deviškega oljčnega olja korelira predvsem z vsebnostjo biofenolov, zlasti sekoiridoidnih biofenolov, ki so derivati hidroksitirosola. Različne komponente oljčnega olja lahko delujejo sinergijsko ali antagonistično (Mateos in sod., 2005). Tudi v našem poskusu smo ugotovili pozitivno korelacijo med vsebnostjo posameznih biofenolov in oksidacijsko stabilnostjo, najmočnejše so z oksidacijsko stabilnostjo korelirale vsebnosti O-Agl-dA, L-Agl-dA, O-Agl in oleuropeina, torej vsebnosti spojin z začetka razgradne poti sekoiridoidnih biofenolov. Zanimiva pa je bila ugotovitev, da je bila korelacija med vsebnostjo α -tokoferola in oksidacijsko stabilnostjo negativna. To opažanje nas lahko zavede k zaključku, da

α -tokoferol negativno vpliva na oksidacijsko stabilnost, vendar pa lahko s podrobnejšim pregledom sestave obravnavanih sort EDOO opažanje pojasnimo tudi drugače. Vzorci 'Istrske belice' vsebujejo v primerjavi z vzorci 'Leccina' manj α -tokoferola, vendar pa več biofenolov, pa tudi manj večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Možno je, da je vpliv biofenolov in maščobnokislinske sestave na oksidacijsko stabilnost močnejši od vpliva α -tokoferola. Oksidacijska stabilnost torej ni odvisna od enega samega parametra, ampak nanjo vplivajo tako sestava substrata za oksidacijo kot tudi sestava antioksidantov in prooksidantov.

5.2 VPLIV SEGREVANJA EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA IN SONČNIČNEGA OLJA NA PROUČEVANE PARAMETRE

Spremembe v maščobah med segrevanjem ali cvrenjem so predmet številnih raziskav. Vse kemijske spremembe pri povišani temperaturi so posledica oksidacije, hidrolize, polimerizacije, izomerizacije in ciklizacije (Quiles in sod., 2002; Valavanidis in sod., 2004). Te reakcije ne vplivajo le na senzorične in prehranske značilnosti, pač pa tudi na varnost uporabe maščobe za prehrano. Vse te reakcije lahko pospešuje prisotnost kisika, vode, sledov kovin in prostih radikalov (Quiles in sod., 2002). Na spremembe v olju vplivajo stik z zrakom, temperatura in čas segrevanja, posoda, v kateri poteka segrevanje, delež nenasičenih maščobnih kislin v maščobi ter prisotnost antioksidantov in prooksidantov (Andrikopoulos in sod., 2002).

Da bi ugotovili, do kakšnih sprememb pride v EDOO med segrevanjem, smo opravili tri poskuse, v katerih smo olja segrevali in spremljali spremembe nekaterih parametrov. Najmanj sprememb, povezanih z oksidacijo, smo zasledili med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C, večje spremembe so bile pri stournem segrevanju pri 180 °C, najizrazitejše pa so bile spremembe pri segrevanju v aparaturi Rancimat pri 100 °C in pretoku zraka 10 L/h. Poleg vzorcev EDOO smo v dva poskusa za primerjavo vključili tudi sončnično olje.

Spremembe merjenih parametrov so bile najizrazitejše v sončničnem olju, med vzorci oljčnega olja pa so bile spremembe večje v vzorcih 'Leccina' kot v vzorcih 'Istrske belice'. Razlike med obema sortama oljčnega olja so bile zlasti očitne pri segrevanju v Rancimatu. Segrevanje v Rancimatu je trajalo 142 ur, dokler ni bil dosežen indukcijski čas treh najstabilnejših vzorcev oljčnega olja. To so bili trije vzorci 'Istrske belice', ki so imeli približno enak indukcijski čas, četrti vzorec 'Istrske belice' je bil segrevan še 19 ur po doseženem indukcijskem času, vzorci 'Leccina' pa kar 26 do 38 ur po doseženem indukcijskem času.

5.2.1 Vpliv segrevanja na kislost ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja

Kislost olja je posledica vsebnosti prostih maščobnih kislin. Pri oksidaciji maščob pa poleg drugih spojin nastajajo tudi karboksilne kisline s krajšimi verigami, ki prav tako povečujejo kislost maščobe. Nastanek teh kislin je tudi osnova za merjenje oksidacijske stabilnosti, saj hlapne kisline, ki nastanejo pri oksidaciji olja v Rancimatu, vodimo v destilirano vodo, v kateri se raztopijo in tako povečajo njeno električno prevodnost, kar je osnova za določitev indukcijskega časa.

V vseh treh sklopih segrevanja smo ugotovili, da je bila kislost pred segrevanjem v vzorcih 'Leccina' (od 0,06 do 0,10 ut. %) statistično značilno nižja kot v vzorcih 'Istrske belice' (od 0,11 do 0,15 ut. %), vendar so bile vrednosti tudi v oljih Istrske belice zelo nizke – mnogo nižje od najvišje dovoljene vrednosti za EDOO (0,8 ut. %). Nekoliko večjo kislost pred segrevanjem pa sta imela oba vzorca sončničnega olja (0,18 ut. %).

Do majhnih, a statistično značilnih sprememb v kislosti je prišlo že v prvih nekaj urah segrevanja pri 100 °C, v sončničnem olju že po dveh urah, v vzorcu 'Leccina' po štirih urah in v vzorcu 'Istrske belice' po osmih urah segrevanja. Med segrevanjem pri 180 °C je v vseh vzorcih do statistično pomembnih razlik prišlo že v prvih dveh urah. Danowska-Oziewicz in Krapieńska-Tymoszczyk (2005) sta poročali, da se je po dveh urah segrevanja pri 180 °C kislost statistično značilno povečala tudi v ogrščičnem in sojinem olju ter v masti za cvrenje, medtem ko Albi in sod. (1997) med dveurnim segrevanjem 20 mL deviškega oljčnega olja pri 180 °C v peči niso opazili sprememb v kislosti vzorcev.

Niti po 100 urah segrevanja pri 180 °C kislost v vzorcu EDOO sorte 'Istrska belica' (0,48 ut. %) ni presegla najvišje dovoljene vrednosti za ekstra deviško oljčno olje (0,8 ut. %), rahlo pa jo je presegla v vzorcu 'Leccina' (0,82). Še bolj se je kislost povečala v sončničnem olju (na 1,32 ut. %). Pri segrevanju v Rancimatu so bile razlike med obema sortama oljčnega olja večje, saj se je povprečna kislost v vzorcih 'Istrske belice' povečala na 0,20 ut. %, v vzorcih 'Leccina' pa na 1,94 ut. % in tako skoraj dosegla najvišjo dovoljeno vrednost za deviška oljčna olja (2,0 ut. %).

5.2.2 Vpliv segrevanja na peroksidno, *p*-anisidinsko in totoks število v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju

Pred segrevanjem so imeli vzorci 'Istrske belice' v vseh treh poskusih nižje peroksidno število kot vzorci 'Leccina'.

p-anisidinsko in totoks število smo določali le v vzorcih, ki smo jih segrevali osem ur pri 100 °C in 180 °C, ter v vzorcih, ki smo jih segrevali 100 ur pri 180 °C. V obeh poskusih je bilo *p*-anisidinsko število pred segrevanjem v vzorcih 'Istrske belice' višje kot v vzorcih 'Leccina', najnižje pa je bilo v sončničnem olju. Tudi totoks število je bilo pred segrevanjem najvišje v vzorcih 'Istrske belice'.

Vzorec 'Istrske belice' je imel pred osemurnim segrevanjem peroksidno število 2,35 mmol O₂/kg. Statistično značilno povečanje peroksidnega števila pri segrevanju pri 100 °C smo določili po štirih urah segrevanja, v vzorcu 'Leccina' (začetna vrednost 2,82 mmol O₂/kg) in v sončničnem olju (začetna vrednost 1,55 mmol O₂/kg) pa že po dveh urah. Naraščanje se je nadaljevalo vseh osem ur, kolikor je trajalo segrevanje. Tudi po končanem segrevanju so bile vrednosti preoksidnega števila v vseh treh vzorcih še vedno dokaj nizke (4,21 mmol O₂/kg v vzorcu 'Istrske belice'; 5,32 mmol O₂/kg v vzorcu 'Leccina' in 4,85 v sončničnem olju), precej nižje od mejne vrednosti za ekstra deviško oljčno olje (10 mmol O₂/kg). Večanje peroksidnega števila je bilo najhitrejše v sončničnem olju, saj se je v njem povečalo več kot trikrat. V vzorcu 'Istrske belice' je peroksidno število naraslo za 79 %, v vzorcu 'Leccina' pa za 87 %.

Podobno kot peroksidno število je bilo tudi *p*-anisidinsko število pred segrevanjem najnižje v sončničnem olju (7,4 meq/kg), v vzorcu 'Leccina' (12,2 meq/kg) pa nižje kot v vzorcu 'Istrske belice' (15,3 meq/kg). Med segrevanjem pri 100 °C se *p*-anisidinsko število v obeh vzorcih EDOO ni bistveno spremenilo, v sončničnem olju pa se je rahlo povečalo (do 8,2 meq/kg). Totoks število se je v vseh vzorcih zmerno povečevalo, v vzorcu 'Istrske belice' se je povečalo za približno 30 %, v vzorcu 'Leccina' za približno 41% in v sončničnem olju za 104%.

Med osemurnim segrevanjem pri 180 °C se je peroksidno število v vseh treh vzorcih zmanjšalo (za 69 % v vzorcu 'Istrske belice'; za 72 % v vzorcu 'Leccina' in za 79 % v sončničnem olju). Sočasno se je povečalo *p*-anisidinsko število (za 86 % v vzorcu 'Istrske belice'; za 67 % v vzorcu 'Leccina' in več kot petkrat v sončničnem olju). Očitno je pri tej temperaturi razpad hidroperoksidov potekal hitreje kot njihov nastanek, medtem ko je pri bilo pri 100 °C nastajanje hitrejšo od razgradnje. Totoks število se je v vzorcu 'Istrske belice' povečevalo prve štiri ure, nato se je ustalilo pri vrednosti okrog 31 meq/kg, v vzorcu

'Leccina' je ostalo ves čas približno konstantno, medtem ko se je v sončničnem olju konstantno povečevalo (povečalo se je skoraj za trikrat na 38,9 meq/kg); povečevanje je bilo hitrejše kot pri 100 °C.

Hidroperoksidi so pri 180 °C zelo nestabilni (van Loon in sod., 2006), zato ni presenetljivo, da se je med stournim segrevanjem pri 180 °C peroksidno število v vseh treh vzorcih zmanjšalo. Tudi Albi in sod. (1997) so med dveurnim segrevanjem različnih vrst olja pri 180 °C opazili zmanjšanje peroksidnega števila. Cheikhousman in sod. (2005) so ugotovili, da se je količina hidroperoksidov v vzorcih EDOO med triurnim segrevanjem pri 170 °C eksponentno zmanjševala v skladu s kinetiko prvega reda.

p-anisidinsko število se je med stournim segrevanjem pri 180 °C v skladu s pričakovanji močno povečalo, in sicer najbolj v sončničnem olju (za 17,6-krat), najmanj pa v vzorcu 'Istrske belice' (za 2,6-krat). V vzorcu 'Leccina' se je povečalo za 4,5-krat. Tudi Labrinea in sod. (2001) so poročali, da se je *p*-anisidinsko število med deseturnim segrevanjem pri 150 °C in 180 °C enakomerno povečevalo. Totoks število se je v vseh vzorcih med segrevanjem povečalo. Po segrevanju se oba vzorca oljčnega olja med sabo nista razlikovala glede na totoks število (približno 40 meq/kg), v vzorcu sončničnega olja pa je bilo totoks število precej večje (101 meq/kg).

Peroksidno število se je močno povečalo tudi med segrevanjem v Rancimatu. V vseh vzorcih 'Leccina' smo po segrevanju določili vrednosti peroksidnega števila preko 300 mmol O₂/kg, medtem ko je bila v vzorcih 'Istrske belice' najvišja izmerjena vrednost 32,4 mmol O₂/kg. Nissiotis in Tasioula-Margari (2002) sta opravila podobno študijo, v kateri sta v peči 100 ur segrevala olje pri 100 °C. Vrednosti peroksidnega števila so se povišale na 71,25 – 105,91 meq/kg (35,63 – 52,96 mmol O₂/kg), kar so podobne vrednosti kot pri naših vzorcih 'Istrske belice'. Vrednosti peroksidnega števila so se v našem poskusu močno povišale, čeprav je bila vsebnost biofenolov še dokaj velika. Antioksidanti v olju reagirajo s prostimi radikali in pričakovali bi, da bi se peroksidno število začelo povečevati šele, ko v olju ne bi bilo več dovolj antioksidantov, ki bi odstranjevali proste radikale. Po drugi strani pa hidroksiperoksidi nastajajo v verižni reakciji, ki poteka dovolj hitro, da poteka sočasno z odstranjevanjem prostih radikalov (van Loon in sod., 2006).

5.2.3 Vpliv segrevanja na vrednost parametrov K_{232} in K_{270} v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju

S parametrom K_{232} ocenimo količino primarnih produktov oksidacije – konjugiranih dienov, s K_{270} pa količino primarnih in sekundarnih produktov oksidacije (Maskan in Bažci, 2003; Koprivnjak, 2006).

Vrednosti obeh spektrofotometrijskih parametrov sta bili v sončničnem olju pred segrevanjem mnogo višji kot v EDOO, kar je značilno za olja iz semen. Če v olju, ki je deklarirano kot EDOO, določimo vrednosti spektrofotometrijskih parametrov, ki presegajo meje, navedene v Uredbi Komisije... (1991), lahko sklepamo, bodisi da je olje oksidirano ali pa mu je primešano rafinirano olje.

V vseh poskusih segrevanja sta se vrednosti K_{232} in K_{270} najhitreje višali v sončničnem olju, iz česar sklepamo, da je v tem olju oksidacija potekala hitreje kot v vzorcih oljčnega olja. Med oljčnimi olji pa so bile v vseh poskusih spremembe v vzorcih 'Leccina' nekoliko izrazitejše kot v vzorcih 'Istrske belice'.

Najvišje dovoljene vrednosti K_{232} in K_{270} za EDOO (2,2 za K_{232} in 0,25 za K_{270}) v obeh oljčnih oljih pri osemurnem segrevanju pri 100 °C niso bile presežene niti po osmih urah, medtem ko so bile vrednosti K_{270} pri segrevanju pri 180 °C v vzorcu 'Istrske belice' presežene že po štirih urah, v vzorcu 'Leccino' celo že po prvih dveh urah segrevanja.

Med osemurnim segrevanjem pri 100 °C sta se vrednosti K_{232} in K_{270} v oljčnih oljih višali približno enako hitro (v vzorcu 'Istrske belice' se je vrednost K_{232} v osmih urah povišala za 8 %, K_{270} pa za 7 %; v vzorcu 'Leccina' pa se je vrednost K_{232} povišala za 20 % in vrednost K_{270} za 18 %). Med osemurnim in stournim segrevanjem pri 180 °C pa se je vrednost K_{232} povišala za bistveno večji faktor kot vrednost K_{270} , saj so se primarni produkti hitreje oksidirali dalje v sekundarne produkte oksidacije kot pri 100 °C. Tudi pri segrevanju v Rancimatu se je vrednost K_{232} povišala precej bolj kot vrednost K_{270} .

Količino primarnih produktov oksidacije smo ocenjevali z dvema metodama: s peroksidnim številom ter z merjenjem vrednosti K_{232} in K_{270} . Tudi oceno sekundarnih produktov oksidacije smo izvajali z dvema metodama: s *p*-anisidinskim številom in z merjenjem vrednosti K_{270} . Rezultatov posameznih metod seveda ne moremo neposredno primerjati, saj nobena metoda ni specifična in absolutna, zanimiva pa je primerjava trendov sprememb posameznih parametrov.

Tako peroksidno število kot vrednost K_{232} nakazujeta, da se je količina primarnih produktov med osemurnim segrevanjem pri 100 °C povečevala. Glede sekundarnih produktov pa bi na podlagi *p*-anisidinskega števila lahko sklepali, da je njihova količina ostala ves čas približno enaka. Vrednost K_{270} pa se je povečevala, saj nanjo vplivajo tako primarni kot sekundarni produkti oksidacije.

Med segrevanjem pri 180 °C se je količina sekundarnih produktov povečevala, kar kažeta tako vrednost K_{270} kot *p*-anisidinsko število. Glede primarnih produktov pa obe metodi ne dajeta tako enotnih rezultatov. Glede na vrednosti peroksidnega števila bi lahko sklepali, da se je količina primarnih produktov oksidacije med segrevanjem pri 180 °C zmanjševala, medtem ko vrednost K_{270} nakazuje, da se je njihova količina povečevala, vendar počasneje kot količina sekundarnih produktov. Vsekakor pa tudi spektrofotometrijski podatki potrjujejo ugotovitev, da pretvorba primarnih produktov v sekundarne produkte poteka pri 180 °C hitreje kot pri 100 °C.

5.2.4 Vpliv segrevanja na maščobnokislinsko sestavo ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja

Maščobnokislinska sestava je poleg vsebnosti antioksidantov in prooksidantov ključna za oksidacijsko stabilnost olja. V naše poskuse smo poleg vzorcev ekstra deviškega oljčnega olja za primerjavo vključili tudi sončnično olje, katerega maščobnokislinska sestava se precej razlikuje od sestave oljčnega olja.

V analiziranih vzorcih EDOO je bilo največ oleinske kisline (njen delež v vzorcih je bil med 72,29 ut. % in 78,02 ut. %), sledile so palmitinska, linolna, stearinska in palmitoleinska kislina. V sončničnem olju pa je bilo največ linolne kisline (64,61 % v vzorcu S2 in 66,94 % v vzorcu S1), sledile pa so oleinska, palmitinska in stearinska kislina. Deleži vseh ostalih kislin so bili manjši od 1 ut. %.

V osmih urah segrevanja pri 100 °C je maščobnokislinska sestava ostala skoraj nespremenjena, pri 180 °C pa se je delež linolne in linolenske kisline v obeh oljčnih oljih malo, a statistično značilno zmanjšal že v prvih dveh urah segrevanja. Večje spremembe smo opazili po 100 urah segrevanja. Statistično značilno so se povečali deleži nasičenih maščobnih kislin, deleži nenasičenih maščobnih kislin (razen eikozenojske kisline C 20:1) pa so se zmanjšali. Najbolj sta se zmanjšala deleža linolne in linolenske kisline. Povečanje deležev nasičenih maščobnih kislin seveda ne pomeni, da so te kisline med segrevanjem nastajale, pač se je njihova vsebnost v vzorcu zmanjševala počasneje kot vsebnost nenasičenih kislin. To je v skladu s trditvijo, da se hitrost oksidacije povečuje s številom

dvojnih vezi v molekuli (Mateos in sod. 2005). Karboksilni kislini s krajšimi verigami (kapronska kislina C 6:0 in kaprilna kislina C 8:0), ki smo ju določili v vzorcih po stotih urah segrevanja pri 180 °C, sta nastali pri oksidaciji maščobnih kislin. Márquez-Ruiz in Dobarganes (1996) sta ugotovila, da sta med segrevanjem palminega oleina, sočničnega olja in sočničnega olja z visoko vsebnostjo oleinske kisline nastali kaprilna in heptanojska kislina C 7:0. Kaprilna kislina nastaja iz 9-hidroperoksidov, ki nastajajo pri oksidaciji oleinske, linolne in linolenske kisline. Heptanojska kislina pa nastane iz 8-hidroperoksida, ki lahko nastane le iz oleinske kisline. Sveže maščobe naravnega izvora ne vsebujejo heptanojske kisline, zato lahko na podlagi njene prisotnosti v maščobi sklepamo, da je maščoba oksidirana. Kaprilna kislina pa je lahko tudi naravna sestavina nekaterih maščob. Kaprilno kislino so v oljčnem olju po cvrtju krompirja določili tudi Andrikopoulos in sod. (2002).

5.2.5 Vpliv segrevanja na vsebnost α -tokoferola v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju

Vsebnost α -tokoferola je v oljih 'Istrske belice' manjša kot v oljih 'Leccina' (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000). V vzorcih 'Istrske belice' smo pred segrevanjem določili od 96 mg/kg do 157 mg/kg α -tokoferola, v vzorcih 'Leccina' pa 183 mg/kg do 425 mg/kg. Veliko več α -tokoferola je vsebovalo sončnično olje, in sicer 503 mg/kg (vzorec S1) oziroma 519 mg/kg (vzorec S2).

Osemurno segrevanje pri 100 °C ni vplivalo na vsebnost α -tokoferola v vzorcu EDOO sorte 'Istrska belica' in v sončničnem olju, v vzorcu EDOO sorte 'Leccino' pa se je vsebnost malo, a statistično značilno zmanjšala.

Med segrevanjem pri 180 °C je do statistično pomembnega zmanjšanja vsebnosti α -tokoferola v vseh vzorcih prišlo že v prvih dveh urah, vendar so olja tudi po 100 urah segrevanja še vedno vsebovala znatne količine tokoferolov. V vzorcu 'Istrske belice' je v sto urah razpadlo 39 % α -tokoferola, v vzorcu 'Leccina' 17 %, v sončničnem olju pa le 13 % α -tokoferola.

Med segrevanjem EDOO v Rancimatu pa je kljub nižji temperaturi (100 °C) razpadel skoraj ves α -tokoferol, saj je bila njegova količina v vseh vzorcih sicer še zaznavna, a pod mejo detekcije (2 mg/kg).

Cheikosman in sod. (2005) so poročali, da se je vsebnost α -tokoferola med triurnim segrevanjem pri 170 °C eksponentno zmanjševala v skladu s kinetiko prvega reda. Menijo,

da je hitrost razgradnje lahko odvisna od začetne koncentracije in hitrosti razgradnje drugih antioksidantov v vzorcu. Rahmani in Csallany (1998) sta trdila, da na razpad α -tokoferola bolj vpliva svetloba kot povišana temperatura. Tudi Pellegrini in sod. (2001) so ugotovili, da je količina preostalega α -tokoferola po segrevanju olja odvisna od količine biofenolov in časa segrevanja, ne pa od temperature (v območju 160-190 °C). Biofenoli učinkovito stabilizirajo α -tokoferol med segrevanjem.

Glede na rezultate naših poskusov pa bi lahko zaključili, da je velik vpliv na razgradnjo α -tokoferola imelo tudi preprihanje z zrakom pri segrevanju v Rancimatu, saj je bila v tem poskusu razgradnja α -tokoferola skoraj popolna.

5.2.6 Vpliv segrevanja na vsebnost pigmentov v ekstra deviškem oljčnem olju

Oba vzorca EDOO sorte 'Istrska belica' sta vsebovala več pigmentov kot vzorca sorte 'Leccino'. Vsi vzorci so vsebovali več klorofilnih pigmentov kot karotenoidov, kar je v skladu s podatki iz literature (Gandul-Rojas in sod., 2000; Roca in sod., 2003). Z metodo po Mínguez–Mosqueri smo določili manjšo vsebnost klorofilnih pigmentov kot z metodo po Pokornju. Korelacija med obema metodama za določevanje klorofilnih pigmentov je bila zelo tesna (0,99).

Karotenoidi in klorofilni pigmenti se razgrajujejo v skladu s kinetiko prvega reda (Gutiérrez in sod., 2002; Pagliarini in sod., 2000). Izračunali smo konstante hitrosti za razgradnjo pigmentov med osemurnim segrevanjem pri 100 °C in 180 °C. V primeru določevanja klorofilnih pigmentov z metodo po Pokornju v vzorcu 'Leccina', ki smo ga segrevali pri 100 °C, je bila linearnost nekoliko slabša ($r^2 = 0,8573$) kot v vseh ostalih primerih (r^2 je bil od 0,9426 do 0,9868). Konstante hitrosti za razpad karotenoidov so bile pri 180 °C mnogo večje od konstant hitrosti za razpad klorofilnih pigmentov. Pri 100 °C smo v vzorcu 'Leccina' določili precej manjšo hitrost razpada za karotenoide kot za klorofilne pigmente, medtem ko je bila v vzorcu 'Istrske belice' razlika med konstantami hitrosti manjša. Gutiérrez in Fernández (2002) sta ugotovila, da pri 30 °C na svetlobi karotenoidi razpadajo počasneje kot klorofilni pigmenti. Pri nižjih temperaturah torej očitno hitreje razpadajo karotenoidi kot klorofilni pigmenti, z višanjem temperature pa hitrost razpadanja klorofilnih pigmentov narašča hitreje kot hitrost razpadanja karotenoidov.

5.2.7 Vpliv segrevanja na vsebnost biofenolov v EDOO

Značilno za EDOO sorte 'Istrska belica' je, da vsebuje več biofenolov kot olje sorte 'Leccino' (Butinar in sod., 1999b; Butinar in sod., 2006), kar smo potrdili tudi z našimi analizami vzorcev pred segrevanjem. V sončničnem olju smo določili zelo malo biofenolov (6 mg/kg), kar je v skladu z ugotovitvami Valavanidisa in sod. (2004), ki so v sončničnem olju določili 3-4 mg/kg biofenolov, izraženih kot galna kislina.

Pri vseh načinih segrevanja EDOO se je vsebnost skupnih biofenolov, določenih z metodo FC, zmanjšala. Zmanjšanje je bilo najbolj intenzivno med stournim segrevanjem pri 180 °C, saj se je vsebnost skupnih biofenolov zmanjšala za 79 % v vzorcih 'Istrske belice' in za 85 % v vzorcih 'Leccina'. Med segrevanjem v Rancimatu se je količina skupnih biofenolov zmanjšala za 60% v vzorcu 'Istrske belice' in za 54 % v vzorcu 'Leccina'. Segrevanje v Rancimatu je trajalo dlje (142 ur), vzorce pa smo preprihovali z zrakom, po drugi strani pa je bila temperatura v tem poskusu nižja (100 °C), kar je bilo očitno vzrok za to, da so se biofenoli razgradili v manjši meri kot pri stournem segrevanju pri 180 °C. Kot smo pričakovali, se je med osemurnim segrevanjem razgradilo manj biofenolov, in sicer se je pri segrevanju pri 100 °C razgradilo 23 % biofenolov v vzorcu 'Istrske belice' in 10 % v vzorcu 'Leccina', pri segrevanju pri 180 °C pa 48 % v vzorcu 'Istrske belice' in 49 % v vzorcu 'Leccina'.

Dodatne informacije o razgrajevanju biofenolov smo dobili z določevanjem vsebnosti posameznih biofenolnih spojin z metodo HPLC. Ugotovili smo, da so se razmerja med vsebnostmi posameznih biofenolov med segrevanjem spremenila. Med segrevanjem poteka razgradnja biofenolov po reakcijski poti, opisani v točki 2.1.5. Ob tem posamezni intermediati ves čas nastajajo iz predhodnih spojin, in se razgrajujejo naprej. Logična posledica je, da začne spojin z začetka reakcijske verige zmanjkovati, medtem ko spojine s konca poti še vedno nastajajo, zato se razmerje med spojinami spremeni v korist spojin s konca razgradne poti.

Druga ugotovitev na prvi pogled ni tako očitna. V vseh vzorcih se je med segrevanjem zmanjšalo razmerje med vsoto vseh biofenolov v razgradni verigi olevropeina in vsoto biofenolov v razgradni verigi ligstrozida. To ugotovitev lahko pojasnimo s pomočjo antioksidacijskih učinkovitosti. Olevropein in njegovi razgradni produkti so ortodifenoli, ligstrozid in njegovi razgradni produkti pa so monofenoli. Ortodifenoli so močnejši antioksidanti kot njihovi monofenolni analogi, zato se hitreje razgrajujejo kot monofenoli. Cheikosman in sod. (2005) so ugotovili, da se je vsebnost tirosoła in hidroksitirosoła med segrevanjem olja pri 170 °C zmanjševala v skladu s kinetiko prvega reda, da pa je hidroksitirosoł razpadal hitreje kot tirosoł. Antioksidacijska učinkovitost se zmanjšuje po

vrsti hidroksitirozol > O-Agl > L-Agl > tirozol (Carrasco-Pancorbo in sod., 2005) oziroma po vrsti hidroksitirozol > oleuropein > tirozol (Valavanidis in sod., 2004; Bouaziz in sod., 2005). Tudi Brenes in sod. (2002) so ugotovili, da so se količine hidroksitirozola in njegovih derivatov med segrevanjem pri 180 °C s časom hitro zmanjševale. Zmanjšanje količin ortodifenolov lahko pripišemo termični razgradnji ali pa oksidaciji, saj prispevajo k stabilnosti olja. Nasprotno pa tirozol in njegovi derivati ne prispevajo k stabilnosti olja, vendar se njihova količina s časom kljub temu zmanjšuje.

Pri segrevanju vzorcev v aparaturi Rancimat smo po segrevanju v vseh vzorcih razen v enem vzorcu 'Leccina' določili mnogo več lignanov kot pred segrevanjem (povprečje pred segrevanjem je bilo 23,2 mg/kg, po segrevanju pa 63,7 mg/kg). Brenes in sod. (2002) trdijo, da so lignani stabilne spojine. Ta trditev pa ne pojasnjuje povečanja količine lignanov v našem poskusu. Možno je, da je med segrevanjem nastala nova spojina, ki se je koeluirala z lignani. Na enak način so povečanje kromatografskega vrha za O-Agl-dA v olju po segrevanju pojasnili s tem, da se je skupaj z O-Agl-dA koeluirala njegova oksidirana oblika (Brenes in sod., 2002; Rovellini in Cortesi, 2002). Primerjava kromatogramov obeh vzorcev oljčnega olja pred stournim segrevanjem in po njem pokaže, da so med segrevanjem nastajale tudi tri nove neidentificirane spojine.

Skupna vsebnost vseh s HPLC določenih biofenolov ni bila enaka vsebnosti skupnih biofenolov, določeni z metodo FC. Razlogi so pojasnjeni v točki 5.1. Korelacije med obema določitvama pa so bile pri poskusih segrevanja boljše (Pearsonov koeficient korelacije je bil 0,99 pri segrevanju v Rancimatu; 0,97 pri stournem segrevanju in 0,83 pri osemurnem segrevanju) kot pri izvedbi eksperimenta skladiščenja EDOO.

5.2.8 Vpliv segrevanja na antioksidacijsko učinkovitost ekstra deviškega oljčnega olja

V skladu s pričakovanji se je antioksidacijska učinkovitost, izražena kot ARP, med segrevanjem zmanjšala, saj je povezana s količino antioksidantov v olju. Pred segrevanjem je bila ARP v vzorcih 'Istrske belice' večja kot v vzorcih 'Leccina'. Pred osemurnim segrevanjem je bila ARP v vzorcu 'Istrske belice' 0,052, v vzorcu 'Leccina' pa 0,027. Po osmih urah segrevanja se je v vzorcu 'Istrske belice' zmanjšala za 35 % pri 100 °C in za 41 % pri 180 °C, v vzorcu 'Leccina' pa za 21 % pri 100 °C in za 22 % pri 180 °C. Med stournim segrevanjem pa se je ARP zmanjšala za več kot 90 % v obeh vzorcih oljčnega olja.

Pri osemurnem segrevanju nismo ugotovili tesnih korelacij med antioksidacijsko učinkovitostjo in drugimi proučevanimi parametri, saj je bil največji določeni koeficient korelacije 0,65 za skupno vsebnost vseh s HPLC določenih biofenolov.

V poskusu, v katerem smo vzorce segrevali 100 ur, pa smo določili tesne pozitivne korelacije z vsebnostmi tako rekoč vseh antioksidantov v olju, edina izjema je bil α -tokoferol, za katerega je bil korelacijski koeficient z ARP samo 0,22. To je na prvi pogled v nasprotju z ugotovitvijo, da je α -tokoferol močan antioksidant, vendar to navidezno nelogičnost lahko pojasnimo. ARP določamo v metanolnem ekstraktu olja, ki vsebuje hidrofilne antioksidante, to je biofenole, ne pa tudi lipofilnih antioksidantov. Ker je α -tokoferol lipofilen, ga metanolni ekstrakt ni vseboval in torej α -tokoferol ni vplival na izmerjeno ARP.

V tem poskusu je ARP najtesneje korelirala z vsebnostjo hidroksitirosola (korelacijski koeficient je bil 0,9978), sledili pa so skupna vsebnost vseh s HPLC določenih biofenolov, ki so intermediati razgradne poti oleuropeina (0,996), vsebnost klorofilnih pigmentov z metodo po Pokornju (0,993) in skupna vsebnost s HPLC določenih sekoiridoidnih biofenolov (0,991). Tudi korelacijski koeficienti za vsebnosti drugih biofenolov so bili veliki (nad 0,81). Manjše korelacijske koeficiente sta imela le DMO-Agl-dA (0,73) in DML-Agl-dA (0,57).

V sončničnem olju nismo določevali antioksidacijske aktivnosti, saj je bila vsebnost biofenolov v njem zelo majhna (le 6 mg/kg v svežem olju). Espín in sod. (2000) so poročali, da ima metanolni ekstrakt sončničnega olja zanemarljivo majhno protiradikalno aktivnost, Valavanidis in sod. (2004) pa so v sončničnem olju določili 3,2-krat manjšo antioksidacijsko aktivnost kot v EDOO.

5.2.9 Vpliv segrevanja na oksidacijsko stabilnost ekstra deviškega oljčnega olja in sončničnega olja

V vzorcih EDOO sorte 'Istrska belica' smo določili večjo oksidacijsko stabilnost kot v vzorcih 'Leccina', v sončničnem olju pa je bila oksidacijska stabilnost bistveno manjša. To je lahko posledica maščobnokislinske sestave in vsebnosti antioksidantov.

V svežih vzorcih EDOO pred segrevanjem v Rancimatu je bil povprečen indukcijski čas v vzorcih 'Istrske belice' 114 ur, v vzorcih 'Leccina' pa 78 ur. V tem poskusu smo ugotovili tesno negativno korelacijo med oksidacijsko stabilnostjo in deležem večkrat nenasičenih maščobnih kislin (korelacijski koeficient je bil -0,91), nekoliko manj tesna pa je bila

pozitivna korelacija med oksidacijsko stabilnostjo in enkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (0,84).

V svežih vzorcih pred stournim segrevanjem smo v vzorcu EDOO sorte 'Istrska belica' določili indukcijski čas 50,8 ur, v vzorcu sorte 'Leccino' 42,6 ur in v sončničnem olju 5,3 ure. Indukcijski časi v vzorcih oljčnega olja so v tem poskusu mnogo krajši kot v poskusu segrevanja z Rancimatom, saj smo jih določevali pri višji temperaturi (110 °C). Indukcijski čas se približno razpolovi, če temperaturo pri določevanju oksidacijske stabilnosti povečamo za 10 °C (Anwar in sod., 2003). Med segrevanjem se je oksidacijska stabilnost vseh treh vzorcev zmanjšala. V vzorcu 'Istrske belice' se je zmanjšala za 50 %, v vzorcu 'Leccina' za 41 % in v sončničnem olju za 21 %. Kljub temu, da je oksidacijska stabilnost najbolj zmanjšala v vzorcu 'Istrske belice', je bila po končanem segrevanju v tem vzorcu še vedno nekoliko večja kot v vzorcu 'Leccina', vendar razlika med obema vzorcema oljčnega olja po segrevanju ni bila statistično značilna.

Tudi pri vzorcih EDOO in sončničnega olja v poskusu stournega segrevanja pri 180 °C smo ugotovili pozitivno korelacijo oksidacijske stabilnosti z vsebnostjo enkrat nenasičenih (korelacijski koeficient 0,85) in nasičenih maščobnih kislin (0,77) ter negativno korelacijo oksidacijske stabilnosti z vsebnostjo večkrat nenasičenih maščobnih kislin (-0,84).

Medtem ko v vzorcih pred segrevanjem v Rancimatu oksidacijska stabilnost ni korelirala s spektrofotometrijskimi parametri, smo ugotovili tesne negativne korelacije (-0,96 za ΔK , -0,87 za K_{272} in -0,82 za K_{232}) v vzorcih v poskusu s stournim segrevanjem. To si lahko razložimo tako, da smo v prvem setu meritev (pred segrevanjem v Rancimatu) oksidacijsko stabilnost določevali le v svežih neoksidiranih vzorcih, ki so vsi imeli dokaj veliko oksidacijsko stabilnost in nizke vrednosti spektrofotometrijskih parametrov. V teh vzorcih je bila oksidacijska stabilnost odvisna od drugih parametrov, predvsem od maščobnokislinske sestave in vsebnosti antioksidantov. V drugem setu meritev pa smo določali tudi oksidacijsko stabilnost že močno oksidiranih olj, ki so imela visoke vrednosti spektrofotometrijskih parametrov in krajše indukcijske čase. Poleg tega je bilo v drugi set vključeno tudi sončnično olje, ki je imelo bistveno krajši indukcijski čas in bistveno višje vrednosti spektrofotometrijskih parametrov kot oljčni olji.

Baldioli in sod. (1996) so ugotovili, da je oksidacijska stabilnost deviškega oljčnega olja v zvezi predvsem z vsebnostjo biofenolov, zlasti tistih, katerih sestavni del je hidrositiosol. Tudi v naših poskusih smo ugotovili tesne zveze med oksidacijsko stabilnostjo in vsebnostjo posameznih biofenolov. Korelacijski koeficienti so bili za spojine iz razgradne poti olevopeina višji kot za njihove analoge iz razgradne poti ligstrozida, kar ponovno potrjuje dejstvo, da so ortodifenoli učinkovitejši antioksidanti kot monofenoli.

V poskusu stournega segrevanja smo ugotovili tesno pozitivno korelacijo med oksidacijsko stabilnostjo in vsebnostjo pigmentov. Korelacijski koeficient za klorofilne pigmente je bil 0,98, za karotenoide pa 0,93. Tudi Gutiérrez in sod. (2001) so poročali o tesni pozitivni korelaciji med oksidacijsko stabilnostjo in vsebnostjo klorofilnih pigmentov ter vsebnostjo karotenoidov. Med vsemi določevanimi parametri so največjo korelacijo določili prav za vsebnost klorofilnih pigmentov in karotenoidov (0,95). Aparicio in sod. (1999) pa trdijo, da imajo klorofilni pigmenti šibkejši vpliv na oksidacijsko stabilnost kot fenoli, ortodidofenoli in tokoferoli, še manj pa na stabilnost vplivajo karotenoidi.

Podobno kot pri ARP smo tudi za oksidacijsko stabilnost ugotovili negativno korelacijo z vsebnostjo α -tokoferola. Korelacijski koeficient v vzorcih pred segrevanjem v Rancimatu je bil -0,71, v vzorcih iz poskusa s stournim segrevanjem olja pa -0,78. Ti rezultati bi nas spet lahko vodili do napačnega zaključka, da α -tokoferol negativno vpliva na oksidacijsko stabilnost oljčnega olja. Če pa vzamemo pod drobnogled celotno sestavo vseh vzorcev, se nam ponuja drugačna razlaga teh rezultatov. Vsebnost α -tokoferola je bila največja v sončničnem olju, ki je imelo najkrajši oksidacijski čas. Med vzorci oljčnega olja pa je bila vsebnost α -tokoferola večja v vzorcih 'Leccina' kot v vzorcih 'Istrske belice'. Obenem pa so ravno vzorci z najmanjšo vsebnostjo tokoferolov imeli najugodnejšo maščobnokislinsko sestavo in so vsebovali največ biofenolov. Učinek biofenolov in maščobnokislinske sestave na oksidacijsko stabilnost je bil očitno močnejši od učinka α -tokoferola. To je v skladu z ugotovitvijo Rastrellija in sod., (2002), ki so trdili, da so biofenoli verjetno bolj učinkoviti antioksidanti kot α -tokoferol. Poleg tega pa so Blekas in sod. (1995) ugotovili, da lahko α -tokoferol v zgodnji fazi oksidacije deluje tudi kot prooksidant.

Na podlagi vsega zapisanega lahko torej sklepamo, da oksidacijska stabilnost ni odvisna od posamezne spojine ali skupine spojin v olju, temveč nanjo vpliva kompleksna sestava oksidacijskega substrata, antioksidantov in prooksidantov. Posamezne snovi v oljčnem olju imajo lahko sinergijski ali antagonističen učinek na oksidacijo olja (Mateos in sod., 2005). Pagliarini in sod. (2000) so z multivariatno statistiko določili parametre, ki so pomembni za stabilnost olja: vsebnost hidrositrosola, vsebnost tirosola, absorbanca karotenoidov pri 475 in 488 nm, vsebnost α -tokoferola, indukcijski čas in vrednost K_{232} .

5.3 PRIMERJAVA EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA SORTE 'LECCINO', EKSTRA DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA SORTE 'ISTRSKA BELICA' IN SONČNIČNEGA OLJA

EDOO ima ne glede na sorto ('Istrska belica' ali 'Leccino') v primerjavi s sončničnim oljem večjo oksidacijsko stabilnost, ugodnejšo maščobnokislinsko sestavo, večjo vsebnost biofenolov in manjšo vsebnost α -tokoferola. Zaradi ugodnejše maščobnokislinske sestave in večje vsebnosti biofenolov so spremembe v EDOO med segrevanjem manj izrazite kot v sončničnem olju.

Proučevani sorti EDOO ('Istrska belica' ali 'Leccino') se nekoliko razlikujeta v maščobnokislinski sestavi in vsebnosti antioksidantov, kar vse vpliva na antioksidacijsko učinkovitost in oksidacijsko stabilnost. EDOO sorte 'Istrska belica' ima v primerjavi z oljem sorte 'Leccino' nekoliko ugodnejšo maščobnokislinsko sestavo, vsebuje več biofenolov, klorofilnih pigmentov in karotenoidov ter manj α -tokoferola, ter ima večjo antioksidacijsko učinkovitost in oksidacijsko stabilnost.

5.4 SKLEPI

Na osnovi rezultatov opravljenih poskusov smo prišli do naslednjih sklepov.

Sveža sončnična olja imajo v primerjavi z EDOO manj ugodno maščobnokislinsko sestavo (več večkrat nenasičenih maščobnih kislin), ne vsebujejo biofenolov, pač pa je vsebnost α -tokoferola večja v sončničnem olju kot v EDOO. Primerjava EDOO pokaže, da imajo EDOO sorte 'Istrska belica' v primerjavi z olji sorte 'Leccino' nekoliko ugodnejšo maščobnokislinsko sestavo in vsebujejo več antioksidantov (biofenolov, klorofilnih pigmentov in karotenoidov) z izjemo α -tokoferola, ki ga je več v oljih sorte 'Leccino'. Antioksidacijska učinkovitost je v tesni zvezi z vsebnostjo biofenolov v olju. Korelacije so bile tesnejše za ortodifenole kot za njihove monofenolne analoge. Oksidacijska stabilnost pozitivno korelira z vsebnostjo nasičenih in enkrat nenasičenih maščobnih kislin, negativno pa z vsebnostjo večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Podobno kot za antioksidacijsko aktivnost tudi za oksidacijsko stabilnost velja, da tesneje korelira z biofenoli iz razgradne poti olevropeina kot z njihovimi ligstrozidnimi analogi. Zelo tesne pozitivne korelacije smo ugotovili tudi med oksidacijsko stabilnostjo in karotenoidi ter klorofilnimi pigmenti. Ugotovili smo negativno korelacijo med α -tokoferolom in oksidacijsko stabilnostjo. Vpliv maščobnokislinske sestave in biofenolov na oksidacijsko stabilnost je očitno prevladal nad vplivom količine α -tokoferola.

Skladiščenje referenčnih vzorcev oljčnega olja v hladilniku pri 8 °C za daljše časovno obdobje ni primerno, saj se je večina proučevanih parametrov (razen maščobnokislinske sestave, vrednosti K_{270} in vsebnosti α -tokoferola) v obdobju enega leta spremenila. Primernejše je skladiščenje v zmrzovalniku pri -20 °C, vendar se tudi pri teh pogojih nekateri parametri, kot so peroksidno število in vsebnost ter sestava biofenolov, v obdobju enega leta lahko spremenijo. Za skladiščenje vzorcev za določevanje teh parametrov bi bilo potrebno določiti krajši rok skladiščenja. V primeru skladiščenja referenčnega vzorca pa je potrebno vrednosti parametrov spremljati in s pomočjo kontrolne karte dokazati, da je vzorec še primeren za uporabo. Za referenčni vzorec moramo izbrati kakovostno sveže olje, ki vsebuje čim manj večkrat nenasičenih maščobnih kislin in čim več antioksidantov, zlasti biofenolov, saj pričakujemo, da se bo tako olje počasneje oksidiralo in bo v njem kasneje prišlo do statistično pomembnih sprememb vrednosti posameznih parametrov. Izkazalo se je, da je olje sorte 'Istrska belica' zaradi ugodnejše maščobnokislinske sestave in večje vsebnosti biofenolov bolj odporno proti oksidaciji kot olje sorte 'Leccino'.

Med segrevanjem EDOO in sončničnega olja so se povečale vrednosti vseh parametrov, ki so pokazatelji stopnje oksidiranosti olja (kislost, peroksidno število, *p*-anisidinsko število, totoks število, vrednosti K_{232} in K_{270}). Izjema je peroksidno število, ki se je med

segrevanjem pri 180 °C zmanjšalo, kar pa je posledica neobstoynosti hidroperoksidov pri visokih temperaturah. Med segrevanjem vzorcev EDOO in sončničnega olja se je spremenila maščobnokislinska sestava. Zmanjšali so se deleži večkrat nenasičenih maščobnih kislin, povečali pa so se deleži nasičenih maščobnih kislin. Vsebnost antioksidantov se je med segrevanjem zmanjševala. Vsebnost α -tokoferola se je najbolj zmanjšala med segrevanjem v Rancimatu, kar smo pripisali vplivu preprihovanja z zrakom. Vsebnost klorofilnih pigmentov in karotenoidov se je zmanjševala v skladu s kinetiko prvega reda. Pri 100 °C so hitreje razpadali klorofilni pigmenti, pri 180 °C pa karotenoidi. Tako karotenoidi kot klorofilni pigmenti so hitreje razpadali pri 180 °C kot pri 100 °C. Med segrevanjem se je vsebnost skupnih biofenolov zmanjševala, spreminjalo pa se je tudi razmerje med posameznimi biofenolnimi spojinami. Vsebnost izhodnih spojin in njihovih zgodnjih razpadnih produktov se je zmanjševala hitreje kot vsebnost spojin s konca razgradne verige. Vsebnosti posameznih spojin se lahko celo povečajo, če je njihovo nastajanje iz prekursorjev hitrejše od njihovega nadaljnega razgrajevanja. Ker so ortodifenoli močnejši antioksidanti kot monofenoli, so se olevropein in njegovi derivati razgrajevali hitreje kot derivati ligstrozida. Vsebnost biofenolov se je hitreje zmanjševala pri 180 °C kot pri 100 °C. Vsebnost skupnih biofenolov, določenih z metodo FC, ni enaka vsebnosti skupnih biofenolov, določeni s HPLC. Antioksidacijska učinkovitost metanolnega ekstrakta se je s segrevanjem zmanjševala zaradi zmanjševanja vsebnosti skupnih biofenolov in spreminjanja deležev posameznih biofenolov.

Na koncu lahko povzamemo, da je EDOO zaradi svoje kemijske sestave oksidacijsko bolj stabilno kot sončnično olje. Primerjava obravnavanih sort EDOO pa je pokazala, da ima EDOO sorte 'Istrska belica' ugodnejšo kemijsko sestavo in posledično večjo antioksidacijsko učinkovitost ter oksidacijsko stabilnost kot EDOO sorte 'Leccino'.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Oljčno olje ima zaradi ugodne maščobnokislinske sestave in vsebnosti antioksidantov pozitiven vpliv na zdravje. Za razliko od drugih rastlinskih olj vsebuje več enkrat nenasičene oleinske kisline in manj večkrat nenasičenih maščobnih kislin, zaradi česar je bolj odporno proti oksidaciji. K oksidacijski stabilnosti oljčnega olja prispeva tudi vsebnost antioksidantov, zlasti α -tokoferola in biofenolov. Podatki o sestavi in značilnostih oljčnega olja Slovenske Istre se zbirajo od leta 1992, naša raziskava pa je prva, ki proučuje vpliv kemijske sestave in različnih pogojev skladiščenja ter segrevanja na potek oksidacije in oksidacijsko stabilnost EDOO.

Raziskava je obsegala dva sklopa, in sicer smo proučevali vplive skladiščenja in segrevanja pri različnih pogojih na vrednosti določenih parametrov v EDOO Slovenske Istre. V raziskavo smo vključili le kakovostna EDOO Slovenske Istre. Vsi vzorci razen enega so bili sortni, pridobljeni iz oljk sorte 'Istrska belica' in 'Leccino', ki sta v Slovenski Istri najbolj razširjeni. Vzorce smo dobili neposredno po stiskanju od izbranih pridelovalcev, s katerimi že več let uspešno sodelujemo, s čimer smo zagotovili pristnost oljčnega olja tako glede geografskega izvora kot glede sorte.

V sklopu proučevanja vplivov skladiščenja EDOO na proučevane parametre smo skladiščili 14 vzorcev EDOO eno leto v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred začetkom skladiščenja in po enem letu skladiščenja smo v vzorcih določili parametre kakovosti (kislost, peroksidno število, vrednosti K_{232} , K_{270} in ΔK), maščobnokislinsko sestavo, vsebnost antioksidantov (tokoferolov in biofenolov) ter oksidacijsko stabilnost. Ugotovili smo, da skladiščenje referenčnih vzorcev oljčnega olja v hladilniku pri $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ za daljše časovno obdobje ni primerno, saj se je večina proučevanih parametrov v obdobju enega leta spremenila. Primernejše je skladiščenje v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, vendar se tudi pri teh pogojih nekateri parametri, kot so peroksidno število in vsebnost ter sestava biofenolov, v obdobju enega leta lahko nekoliko spremenijo. Spremembe so bile manj izrazite v EDOO sorte 'Istrska belica'.

Vpliv segrevanja smo proučevali s tremi poskusi. Osem vzorcev EDOO Slovenske Istre smo segrevali 142 ur v Rancimatu pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ in v vzorcih pred segrevanjem ter po njem določili iste parametre kot v vzorcih v sklopu skladiščenja. V drugi in tretji poskus segrevanja smo poleg EDOO sorte 'Istrska belica' in 'Leccino' za primerjavo vključili tudi sončnično olje. Vzorce olja smo v drugem poskusu segrevali 8 ur pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter vzorčili vsaki dve uri; v tretjem poskusu pa smo vzorce segrevali 100 ur pri $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ in

vzorčili le pred začetkom ter po koncu segrevanja. V vzorcih iz drugega in tretjega poskusa smo določevali parametre, ki so pokazatelji stopnje oksidiranosti olja (kislost, peroksidno število, *p*-anisidinsko število, totoks število ter vrednosti K_{232} in K_{270}), maščobnokislinsko sestavo, vsebnost antioksidantov (tokoferolov, karotenoidov, klorofilnih pigmentov in biofenolov), antioksidacijsko učinkovitost in oksidacijsko stabilnost. Ugotovili smo, da so se med segrevanjem povečale vrednosti parametrov, ki so pokazatelji stopnje oksidiranosti olja. Le pri segrevanju pri 180 °C se je zaradi termične neobstoynosti hidroperoksidov peroksidno število v vzorcih zmanjšalo. Med segrevanjem so se vsebnosti antioksidantov zmanjšale, in sicer je bilo zmanjšanje bolj izrazito pri 180 °C kot pri 100 °C. Edina izjema so bili tokoferoli, katerih vsebnost se je med segrevanjem pri 100 °C v Rancimatu zmanjšala na vrednosti pod LOD. Spremenila se je tudi maščobnokislinska sestava vzorcev, in sicer so se zmanjšali deleži večkrat nenasičenih maščobnih kislin, povečali pa deleži nasičenih kislin in enkrat nenasičenih kislin. Zaradi zmanjšanja vsebnosti antioksidantov se je zmanjšala antioksidacijska učinkovitost vzorcev, prav tako pa tudi oksidacijska stabilnost. Spremembe so bile v sončničnem olju v primerjavi z EDOO bistveno bolj izrazite. Primerjava med proučevanima sortama EDOO pa je pokazala, da je segrevanje povzročilo v EDOO sorte 'Leccino' večje spremembe kot v EDOO sorte 'Istrska belica'.

Na oksidacijsko stabilnost olja vpliva več dejavnikov. Ugotovili smo, da so na oksidacijsko stabilnost bolj kot vsebnost α -tokoferola vplivale vsebnosti ostalih antioksidantov (pigmentov in biofenolov) in maščobnokislinska sestava.

6.2 SUMMARY

Olive oil has a beneficial health effect due to its favourable fatty acid composition and antioxidant content. What makes olive oil distinct from other plant oils, is the higher content of monounsaturated oleic acid, as a result of which olive oil is more resistant to oxidation. Oxidative stability of olive oil is also improved by content of antioxidants, in particular the content of α -tocopherol and biophenols. The data on composition and characteristics of olive oil from Slovenian Istra has been collected since 1992, but our research is the first investigation of the influence of chemical composition and different storing conditions and heating conditions on the course of oxidation and oxidation stability of EVOO.

Two aspects were investigated: we were investigating the influence of storing and heating in different conditions on values of studied parameters in EVOO from Slovenian Istra. Only good quality EVOO from Slovenian Istra were included in the investigation. All samples except one were monovarietal. They were obtained from the two prevalent cultivars in Slovenian Istra, namely from cv. *Istrska belica* and cv. *Leccino*. The samples were obtained directly from the producers who have been our partners for several years and thus the geographical and varietal authenticity of the olive oil was insured.

We were storing 14 EVOO samples for one year in freezer at -20 °C and in refrigerator at 8 °C in order to study the influence of storing of EVOO on the investigated parameters. Several parameters were determined in samples before storing and after one year of storing: quality parameters (acidity, peroxide value, K_{232} , K_{270} and ΔK values), fatty acid composition, antioxidant content (content of biophenols and tocopherols), and oxidative stability. Most of the investigated parameters changed during one year of storing in refrigerator at 8 °C, therefore the storing of reference samples in refrigerator for a longer period of time is not appropriate. It is better to store samples in freezer at -20 °C, although also in these conditions, some parameters, such as peroxide value and biophenol composition, can slightly change during the period of one year. The changes were less pronounced in EVOO from cv. *Istrska belica*.

Three experiments were performed in order to investigate the influence of heating. Eight samples of EVOO from Slovenian Istra were heated for 142 hours in Rancimat at 100 °C. The same parameters were determined in the samples before and after heating as in the storing experiment. Sunflower oil was included in the second and the third experiment for comparison with EVOO. In the second experiment, the oil samples were heated for 8 hours at 100 °C and at 180 °C. The sampling interval was 2 hours. In the third experiment, the oil samples were heated for 100 hours at 180 °C. The samples were only taken before and after heating. Several parameters were determined in the samples from the second and the third experiment: parameters related to the oxidation status of the oil (acidity, peroxide value, *p*-anisidine value, totox value, K_{232} and K_{270}), fatty acid composition, antioxidant contents (tocopherols, carotenoids, chlorophyllic pigments and biophenols), antioxidative activity and oxidative stability. We found out, that the values of parameters, related to the oxidation status of the oil, increased, with the exception of peroxide value, which decreased during heating at 180 °C because of thermal instability of hydroperoxides. The content of antioxidants decreased during heating. The decrease was greater at 180 °C than at 100 °C. The only exception were tocopherols, which were completely depleted during heating at 100 °C in Rancimat. Fatty acid composition was also changed. The percentages of polyunsaturated fatty acids decreased while the percentages of saturated and monounsaturated fatty acids increased during heating. Antioxidant activity and oxidative stability decreased due to the decrease of antioxidant content. The changes were much

greater in sunflower oil than in EVOO. The comparison of the two investigated EVOO cultivars shows that heating caused greater changes in EVOO from cv. *Leccino* than in EVOO from cv. *Istrska Belica*.

Several factors influence oxidative stability of oil. We found out, that the α -tocopherol has weaker influence than other antioxidants (pigments and biophenols) and fatty acid composition.

7 VIRI

- Akasbi M., Shoeman D.W., Saari Csallany A. 1993. High-performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 4: 367
- Albi T., Lanzón A., Guinda A., León M., Pérez-Camino M.C. 1997. Microwave and conventional heating effects on thermoxidative degradation of edible fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3795-3798
- Allen J.C., Hamilton R.J. (eds.). 1994. *Rancidity in foods*. 3rd ed. London, Blackie Academic & Professional: 290 str.
- Andrikopoulus N.K., Kalogeropoulos N., Falirea A., Barbagianni M.N. 2002. Performance of virgin olive oil and vegetable shortening during domestic deep-frying and pan-frying of potatoes. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 2: 177-190
- Anwar F., Bhangar M.I., Kazi T.G. 2003. Relationship between Rancimat and Active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80: 151-15
- Aparicio R., Roda L., Albi M.A., Gutiérrez F. 1999. effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4150-4155
- Baldioli M., Servili M., Peretti G., Montedoro G.F. 1996. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73: 1589-1593
- Bandelj Mavsar, D., Bešter, E., Bučar-Miklavčič, M., Butinar, B., Čalija, D., Kanjir, Ž., Levanič, T., Valenčič, V., & Mazi, Ž. (2005). 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: 16 str.
- Baraldi P.G., Simoni D., Manfredini S., Menziani E. 1983. Preparation of 3,4-dihydroxy-1-benzeneethanol: A reinvestigation. *Liebigs Annalen der Chemie*, 4: 684-686
- Blekas G., Tsimidou M., Boskou D. 1995. Contribution of α -tocopherol to olive oil stability. *Food Chemistry*, 52: 289-294
- Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH \cdot free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology*, 30: 609-615
- Boscou D. Olive oil composition. 1996. V: *Olive oil – Chemistry and technology*. Boskou D. (ed.). Champaign, Illinois, AOCS Press: 52-83
- Boscou G., Salta F.N., Chrysostomou S., Mylona A., Chiou A., Andrikopoulus N.K. 2006. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from Greek market. *Food Chemistry*, 94: 558-564

- Bouaziz M., Grayer R.J., Simmonds M.S., Damak M., Sayadi S. 2005. Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar chemlali growing in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2: 236-241
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30
- Brenes M., García A., Dobarganes M.C., Velasco J., Romero C. 2002. Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5962-5967
- Brenes M., Garcia A., Garcia P., Rios J.J., Garrido A. 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3535-3540
- Brenes M., Hidalgo F.J., Garcia A., Rios J.J., Garcia 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: 715-720
- Briante R., Febbraio F., Nucci R. 2003. Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the mediterranean diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 24: 6975-6981
- Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Čalijski D. 2006. ABC o oljčnem olju. Koper; Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Labs: 16 str.
- Bučar-Miklavčič M., Dujc V., Hlaj A. 2003. Elaborat za postopek priznanja označbe geografskega porekla »Ekstra deviško oljčno olje Slovenske Istre«. Koper; Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Labs: 64 str.
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M. 2000. Tokoferoli in polifenoli v oljčnih oljih Slovenske Istre. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77-91
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M., Čalijski D., Bešter E. 2004. Spremljanje maščobno kislinske sestave oljčnih olj Slovenske Istre v letih 1992-2002. V: Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 24.-26. marec 2004. Hudina M. (ur.). Ljubljana, Strokovno sadjarsko društvo Slovenije in Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za sadjarstvo: 711-716
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M., Čalijski D. 1999a. Polifenoli v oljčnih oljih Slovenske Istre letnika 94. *Annales Seria Historia Naturalis*, 9: Supplement: 17-26
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M., Čalijski D. 1999b. Skupni polifenoli, hidroksitirozol in tirozol v oljčnih oljih Slovenske Istre v dveh zaporednih letnikih (1996, 1997). *Annales Seria Historia Naturalis*, 9: Supplement: 27-36
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M., Lipnik-Štangelj M. 2006. Antioxidants in virgin olive oils produced from two olive cultivars of Slovene Istra. 2006. *Annales Seria Historia Naturalis*, 16: 201-208

- Calligaris S., Sovano S., Manzoco L., Nicoli M.C., 2006. Influence of cristalization on the oxidative stability of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 529-535
- Caponio F., Bilancia M.T., Pasqualone A., Sikorska E., Gomes T. 2005. Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research and Technology*, 221: 92-98
- Caponio F., Pasqualone A., Gomes T. 2002. Effects of conventional and microwave heating on the degradation of olive oil. *European Food Research and Technology*, 215: 114-117
- Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Caretero A., Del Carlo M., Gallina-Toschi T., Lercker G., Compagnone D., Fernández-Gutiérrez A. 2005. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 23: 8918-8925
- Ceballos C., Moyano M.H., Vicario I.M., Alba J., Heredia F.J., 2003. Chromatic evaluation of virgin olive oils submitted to an accelerated oxidation test. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80: 257-262
- Cheikhousman R., Zude M., Bouveresse D.J.-R., Léger C.L., Rutledge D.N., Birlouez-Aragon I. 2005. Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382: 1438 – 1443
- Choe E., Min D.B. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 4: 169-186
- Christophoridou S., Dias P., Tseng L.H., Spraul M. 2005. Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4667-4679
- Cichelli A., Pertesana G.P. 2004. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*, 1046, 1-2: 141-146
- COI. 2006. COI/T.15/NC no. 3, Rev. 2, 24 November 2006. - Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. Madrid, International Olive Council: 16 str.
<http://www.internationaloliveoil.org/downloads/NORMAEN1.pdf> (november 2007)
- COI. 2001. COI/T.20/Doc. No. 19, Rev 1. 2001. - Spectrophotometric investigation in the ultraviolet. Madrid, International Olive Council: 8 str.
<http://www.internationaloliveoil.org/downloads/testing6.pdf> (november 2007)
- Cortesi N., Rovellini P., Fusari P. 2002. Dosaggio dei biofenoli degli oli vergini di oliva: idrossitirosole e tirosole, agliconi secoiridoidi, acidi secoiridoidi, lignani e flavonoidi. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79: 145-150
- Cosio M.S., Ballabio D., Benedetti S., Gigliotti C. 2007. Evaluation of different storage conditions of extra virgin olive oils with an innovative recognition tool built by means of electronic nose and electronic tongue. *Food Chemistry*, 10, 2: 485-491

- Coutelieris F.A., Kanavouras A. 2006. Experimental and theoretical investigation of packaged olive oil: development of quality indicator based on mathematical predictions. *Journal of Food Engineering*, 73: 85-92
- Covas M.I., Nyyssonen K., Poulsen H.E., Kaikkonen J., Zunft H.J.F., Kiesewetter H., Gaddi A., de la Torre R., Mursu J., Baumler H., Nascetti S., Salonen J.T., Fito M., Virtanen J., Marrugat J. 2006. The effect of polyphenols on heart disease risk factors – A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145, 5: 333-341
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). V: *Biochemistry & molecular biology of plants*. Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.). Rockville, American Society of Plant Physiologists: 1250-1319
- Dais P., Spyros A., Christophoridou S., Hatzakis E., Fragaki G., Agiomyrgianaki A., Salivaras E., Siragakis G., Daskalaki D., Tasioula-Margari M., Brenes M. 2007. Comparison of analytical methodologies based on ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy with conventional methods of analysis for the determination of some olive oil constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3: 577-584
- Danowska-Oziewicz M., Karpinska-Tymoszczyk M. 2005. Quality changes in selected frying fats during heating in a model system. *Journal of Food Lipids*, 12: 159-168
- Deiana M., Rosa A., Falqui Cao S., Pirisi F.M., Bandino G., Dessi M.A. 2002. Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: Importance of α -tocopherol concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4342-4346
- de la Torre-Carbot K., Chavez-Servin J.L., Jauregui O., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., Fitó M., Covas M.I., Muñoz-Aguayo D., López-Sabater M.C. 2007. Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low-density lipoprotein fraction: Determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 583, 2: 402-410
- Del Carlo M., Sacchetti G., Di Mattia C., Compagnone D., Mastocola D., Liberatore L., Cichelli A. 2004. Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4072-4079
- D'Imperio M., Dugo G., Alfa M., Mannina L., Segre A.L. 2007. Statistical analysis on Sicilian olive oils. *Food Chemistry*, 102, 3: 956-965
- Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G. 1997. The carotenoids as antioxidants – a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 41, 3: 189-200
- El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J., Mortensen A., Phillip D.M., Truscott T.G., Young A.J. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430, 1: 37-48
- Evangelisti F., Zunin P., Tiscornia E., Petacchi R., Drava G., Lanteri A. 1997. Stability to oxidation of virgin olive oils as related to olive conditions: Study of polar compounds by chemometric methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 8: 1017-102

- Fakourelis N., Lee E.C., Min D.B. 1987. Effects of chlorophyll and β -carotene on oxidation stability of olive oil. *Journal of Food Science*, 52: 234-235
- Fogliano V., Ritieni A., Moti S.M., Gallo M., Medaglia D.D., Ambrosino M.L., Sacchi R. 1999. Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1803-1808
- Gallardo-Gurerrero L., Gandul-Rojas B., Roca M., Mínguez-Mosquera M.I. 2005. Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82, 1: 33-39
- Gambacorta G., Del Nobile M.A., Tamagnone P., Leonardi M., Faccia M., La Notte E. 2004. Shelf-life of extra virgin olive oil stored in packages with different oxygen barrier properties. *Italian Journal of Food Science*, 16, 4: 417-428
- Gandul-Rojas B., Roca-L Cepero M., Mínguez-Mosquera I. 2000. Use of chlorophyll and carotenoid composition to determine authenticity of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 8: 853-858
- Gimeno E., Calero E., Castellote A., Lamuela-Raventós R.M., de la Torre M.C., López-Sabater M.C. 2000. Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 881, 1-2: 155-259
- Giuffrida D., Salvo F., Salvo A., La Pera L., Dugo G. 2006. Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, 101, 1: 833-837
- Gordon M.H., Paiva-Martins F., Almeida M. 2001. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2480-2485
- Guillén M.D., Ruiz A. 2006. Study by means of ^1H nuclear magnetic resonance of the oxidation process undergone by edible oils of different natures submitted to microwave action. *Food Chemistry*, 96: 665-674
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 11: 966-968
- Gutiérrez F., Arnaud T., Garrido A. 2001. Contribution of polyphenols to the oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 1463-1470
- Gutiérrez F., Fernández J.L. 2002. Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of "extra" quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 571-577
- Gutiérrez F., Jimenez B., Ruiz A., Albi M.A. 1999. Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1: 121-127

- Gutiérrez F., Villafranca M.J., Castellano J.M. 2002. Changes in the main components and quality indexes of virgin olive oil during oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79: 669-676
- Gutiérrez Rosales F. 1989. Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes: Comparación entre el método del Oxígeno Activo (A.O.M.) y el método Rancimat. *Grasas y Aceites*, 40: 1-5
- Hrnčirik K., Fritsche S. 2005. Relation between the endogenous antioxidant system and the quality of extra virgin olive oil under accelerated storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6: 2103-2110
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6: 1841-1856
- IUPAC 2.504. Determination of the *p*-anisidine value (*p*-A.V.) 1987. V: Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 7th ed. Paquot C, Hautfenne A. (eds.). Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne, Blackwell Scientific Publications: 210-211
- Jiménez M.S., Velarte R., Castillo J.R. 2007. Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. *Food Chemistry*, 100, 1: 8-14
- Kalogeropoulos N., Chiou A., Mylona A., Ioannou M.S., Andrikopoulos N.K. 2007a. Recovery and distribution of natural antioxidants (α -tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after pan-frying of Mediterranean finfish in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 100, 2: 509-517
- Kalogeropoulos N., Mylona A., Chiou A., Ioannou M.S., Andrikopoulos N.K. 2007b. Retention and distribution of natural antioxidants (α -tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie - Food Science and Technology*, 40, 6: 1008-1017
- Kalua C.M., Allen M.S., Bedgood Jr, D.R., Bishop A.G., Prenzler P.D., Robards K. 2007. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*. 100, 1: 273-286
- Kanavouras A., Cert A., Hernandez R.J. 2005. Oxidation of olive oil under still air. *Food Science and Technology International*, 11, 3: 183-189
- Kanavouras A., Coutelieris F.A. 2006. Shelf-life predictions for packaged olive oil based on simulations. *Food Chemistry*, 96: 48-55
- Kanavouras A., Hernandez-Munoz P., Coutelieris F. A. 2004. Shelf life predictions for packaged olive oil using flavor compounds as markers. *European Food Research and Technology*, 219: 190 – 198
- Kiritsakis A.P., Lenart E.B., Willet W.C., Hernandez R.J. 1998. Olive oil: From the tree to table. 2nd ed. Trumbull, Connecticut, Food & Nutrition Press, Inc: 113-141
- Koprivnjak O. 2006. Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola. Poreč: MIH: 156 str.

- Labrinea E.P., Thomaidis N.S., Georgiou C.A. 2001. Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta*, 448, 1-2: 201-206
- Läubli W., Bruttel P.A. 1986. Determination of the oxidative stability of fats and oils by the rancimat method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63: 792-794
- Lavelli V., Bondesan L. 2005. Secoiridoids, tocopherols, and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils extracted from destoned fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53,4 : 1102-1107
- Lavelli V., Fregapane G., Salvador M.D. 2006. Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgine olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3002-3007
- Luaces P., Perez A.G., Garcia J.M., Sanz C. 2005. Effects of heat-treatments of olive fruit on pigment composition of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 90, 1-2: 169-174
- Mannino S., Cosio M. S., Bertuccioli M. 1993. High performance liquid chromatography of phenolic compounds in virgin olive oils using amperometric detection. *Italian Journal of Food Science*, 4: 363-370
- Marquez-Ruiz G., Dobarganes C. 1996. Short-chain fatty acid formation during thermoxidation and frying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 1: 120-126
- Maskan M., Bağcı H.İ. 2003. The recovery of used sunflower seed oil utilized in repeated deep-fat frying process. *European Food Research and Technology*, 218, 1: 26-31
- Mateos R., Dominguez M.M., Espartero J.L., Cert A. 2003. Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 24: 7170-7175
- Mateos R., Trujillo M., Perez-Camino M.C., Moreda W., Cert A. 2005. Relationships between oxidative stability, triacylglycerol composition, and antioxidant content in olive oil matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5766-5771
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237
- Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384, 3: 240-242
- Mínguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas B. 1994. Mechanism and kinetics of carotenoid degradation during the processing of green table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1551-1554
- Mínguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas B., Garrido-Fernández J., Gallardo-Guerrero L. 1990. Pigments present in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67: 192-196
- Mínguez-Mosquera M.I., Rejano-Navarro L., Gándul-Rojas B., Sánchez-Gómez A.H., Garrido-Fernández J. 1991. Color pigment correlation in virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68: 332-336

- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219
- Mulinacci N., Giaccherini C., Ieri F., Innocenti M., Romani A., Vincieri F.F. 2006. Evaluation of lignans and free and linked hydroxy-tyrosol and tyrosol in extra virgin olive oil after hydrolysis processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 5: 757-764
- Murković Steinberg I., Milardović S. 2007. Chromogenic radical based optical sensor membrane for screening of antioxidant activity. *Talanta*, 71, 4: 1782-1787
- Naz S., Sheikh H., Sidiqqi R., Sayeed S.A. 2004. Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. *Food Chemistry*, 88, 2: 253-259
- Nissiotis M., Tasioula-Margari M. 2002. Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chemistry*, 77: 371-376
- OSIST prEN ISO 9936. Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography. 2004: 17 str.
- Ottaviani F., Spalluci M., Cangiotti M., Bacchiocca M., Ninfali P. 2001. Electron paramagnetic resonance investigations of free radicals in extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3691-3696
- 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
- Pagliarini E., Zanoni B., Giovanelli G. 2000. Predictive study on Tuscan extra virgin olive oil stability under several commercial conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4: 1345-1351
- Paz Aguilera M., Beltrán G., Ortega D., Fernández A., Jiménez A., Uceda M. 2005. Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89, 3: 387-391
- Pellegrini N., Visioli F., Buratti S., Brighenti F. 2001. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5: 2532-2538
- Pérez-Bonilla M., Salido S., van Beek T.A., Linares-Palomino P.J., Altarejos J., Nogueras M., Sánchez A. 2006. Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *Journal of Chromatography A*, 1112: 311-318
- Pokorny J., Kalinova L., Dysseler P. 1995. Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils. *Pure and Applied Chemistry*, 67: 1781-1787
- Priego-Capote F., Ruiz-Jiménez J., Luque de Castro M.D. 2004. Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis-diode array detection. Application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1045: 239-246

- Psomiadou E., Tsimidou M. 1998. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5132-5138
- Psomiadou E., Tsimidou M. 1999. On the role of squalene in olive oil stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 10: 4025-4032
- Psomiadou E., Tsimidou M. 2001. Pigments in Greek olive oils: Occurance and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 640-647
- Psomiadou E., Tsimidou M. 2002a. Stability of virgin olive oil. 1. Autooxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4: 716-721
- Psomiadou E., Tsimidou M. 2002b. Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4: 722-727
- Quiles J.L., Ramírez-Tortosa M.C., Gómez J.A., Huertas J.R., Mataix J. 2002. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry*, 76: 461-468
- Rahmani M., Csallany A.S. 1998. Role of minor constituents in the photo-oxidation of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75: 837-843
- Ranalli A., Pollastri L., Contento S., Iannuci G.E., Lucera L., Russi F. 2002. Sterol and alcohol components of seed, pulp and whole olive fruit oils. Their use to characterise olive fruit variety by multivariate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 8: 854-859
- Rastrelli L., Passi S., Ippolito F., Vacca G., De Simone F. 2002. Rate of degradation of α -tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5566-5570
- Roca M., Gandul-Rojas B., Gallardo -Guerrero L., Minguez-Mosquera M.I. 2003. Pigment parameters determining Spanish virgin olive oil authenticity: Stability during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 12: 1237-1240
- Roche M., Dufour C., Mora N., Dangles O. 2005. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3, 3: 423-430
- Romero A., Cuesta C., Sanchez-Muniz F.J. 1999. Does frequent replenishment with fresh monoenoic oils permit the frying of potatoes indefinitely?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3: 1168-1173
- Rotondi A., Bendini A., Cerretani L., Mari M., Lercker G., Toschi T.G. 2004. Effect of olive ripening on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3649-3654
- Rovellini P., Cortesi N. 2002. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycones in virgin olive oil: aldehdydic, dialdehdydic forms and their oxidized products. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79, 1-2: 1-14

- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176
- Salvador M.D., Aranda F., Gómez-Alonso S., Fregapane G. 2001. Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry*, 74: 267-274
- SAS/STAT Software. Version 08.01.1999. Cary, SAS Institute Inc.: Software
- Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth-Kesraoui F., Boujef K., Balansard G. 2001. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 618-621
- Schroeder M.T., Becker E.M., Skibsted L.H. 2006. Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9: 3445-3453
- Scotter M.J., Castle L. 2004. Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food Additives And Contaminants*, 21, 2: 93-124
- Silva F.A.M., Borges F., Ferreira M.A. 2001. Effects of phenolic propyl esters on the oxidative stability of refined sunflower oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 8: 3936-3941
- SIST EN ISO 3960. Živalske in rastlinske masti in olja – Ugotavljanje peroksidnega števila. 2005: 9 str.
- SIST EN ISO 5508. Živalske in rastlinske masti in olja – Ugotavljanje sestave maščobnih kislin z metodo plinske kromatografije. 1996: 14 str.
- SIST EN ISO 660. Živalske in rastlinske masti in olja - Določevanje kislinskega števila in kislosti. 2000: 11 str.
- SIST EN ISO 660/A1. Rastlinske in živalske maščobe in olja – Določevanje kislinskega števila in kislosti – Dopolnilo 1: Natančnejši podatki za deviško oljčno olje. 2005: 7 str.
- Stenson D.F., Min D.B. 2000. Effects of β -carotene and lycopene thermal degradation products on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 11: 1153-1160
- Su Q., Rowley K.G., Balasz N.D.H. 2002. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, 781: 393-418
- Subagio A., Morita N. 2001. Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. *Food Research International*, 34, 2-3: 183
- Subagio A., Morita N. 2003. Prooxidant activity of lutein and dimyristate esters in corn triacylglyceride. *Food Chemistry*, 81, 1: 97-102
- Tsimidou M.Z., Georgiou A., Koidis A., Boskou D. 2005. Loss of stability of "veiled" (cloudy) virgin olive oil in storage. *Food Chemistry*, 93, 3: 377-383

Bešter E. Oksidacijska stabilnost ekstra deviških oljčnih olj Slovenske Istre.

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2007

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. Uradni list Evropske unije, L 248/1, 386-452

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/sl/dd/03/11/31991R2568SL.pdf> (november 2007)

Valavanidis A., Nisiotou C., Papageorghiou Y., Kremli I., Satravelas N., Zinieris N., Zygalaki H. 2004. Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2358-2365

van Loon W.A.M., Linsen J.P.H., Legger A., Voragen A.G.J. 2006. Anti-radical power gives insight into early lipid oxidation events during frying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 10: 1446-1451

Velasco J., Andersen M.L., Skibsted L.H. 2003. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 85, 4: 623-632

Vidrih-Perko V. 2002. Oljka in oljčno olje v antiki. V: *Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu in sredozemskem kmetijstvu*. Levanič T. (ur.). Koper, Znanstveno raziskovalno središče Republike Slovenije Koper: 46-47

Viola P. 1997. *Olive oil and health*. Madrid, International Olive Oil Council: 64 str.

Zhou K., Yin Y-Y., Yu L.(L.). 2006. ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. *Food Chemistry*, 95: 446-157

Zunin P., Boggia R., Rossi N., Evangelisti F., Tiscornia E. 2001. Progetto regione Liguria per il "Miglioramento qualitativo dell'olio d'oliva ligure". Risultati di due anni di sperimentazione (1997-89 e 1998-99). *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 78, 1: 17-23

Zuta P.C., Simposon B.K., Zhao X., Leclec L. 2007. The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chemistry*, 100, 2: 800-807

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tereziji Golob za pomoč in izkazano potrpljenje pri nastajajnu doktorske naloge, koristne napotke in strokovne popravke naloge. Za kritičen pregled naloge se zahvaljujem tudi predsedniku komisije doc. dr. Rajku Vidrihu in članici komisije prof. dr. Oliveri Koprivnjak.

Brez njih bi to delo nikoli ne nastalo, zato iskrena hvala osebju Laboratorija za preskušanje oljčnega olja in strokovnjakom podjetja LABS d.o.o.: Mileni Bučar-Miklavčič, Bojanu Butinarju, Darinki Čalija, Vasiliju Valenčiču, Žigi Maziju, Saši Volk in Željki Kanjir. Njihova pomoč pri delu v laboratoriju in pri interpretaciji rezultatov je neprecenljiva. Bili so tudi prvi bralci in kritiki nastajajočega doktorskega dela.

Za pomoč pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem doc. dr. Lei Gašperlin z Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani, za meritve oksidacijske stabilnosti pa mag. Mateji Vendramin Pintar in mag. Sergeji Vidakovič iz Emone, Razvojnega centra za prehrano v Ljubljani.

In nenazadnje hvala vsem domačim, zlasti Igorju in Petru, za potrpežljivost in pomoč, ki sem je bila deležna v zadnjih petih letih.

PRILOGA A: Ugotavljanje vpliva skladiščenja na kemijske parametre v ekstra deviškem oljčnem olju. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva.

ANNEX A: Influence of storing on chemical parameters in extra virgin olive oil. Sources of variability and statistical characteristics of their influence.

Parameter	P _S	P _T	P _{S*T}
kislost (ut. %)	< 0,0001	0,1983	0,998
peroksidno število (mmol O ₂ /kg)	0,2914	< 0,0001	0,3026
K ₂₃₂	0,5649	0,0133	0,6665
K ₂₇₀	0,009	0,0336	0,4648
Δ K	0,2846	0,0152	0,1561
C 14:0 (ut. %)	0,8521	0,3467	0,3915
C 16:0 (ut. %)	< 0,0001	0,9393	0,8881
C 16:1 (ut. %)	< 0,0001	0,9717	0,9863
C 17:0 (ut. %)	< 0,0001	0,1325	0,465
C 17:1 (ut. %)	0,385	0,6937	0,9089
C 18:0 (ut. %)	< 0,0001	0,9403	0,9937
C 18:1 (ut. %)	< 0,0001	0,9907	0,9958
C 18:2 (ut. %)	< 0,0001	0,9934	0,8914
C 18:3 (ut. %)	< 0,0001	0,979	0,9009
C 20:0 (ut. %)	< 0,0001	0,5749	0,5255
C 20:1 (ut. %)	0,0185	0,8029	0,8491
C 22:0 (ut. %)	< 0,0001	0,6747	0,5182
C 24:0 (ut. %)	< 0,0001	0,1027	0,3521
α – tokoferol (mg/kg)	< 0,0001	0,4055	0,9665
vsebnost skupnih biofenolov po metodi FC	< 0,0001	0,138	0,9852
vanilinska kislina (mg/kg)	0,0372	0,5315	0,9519
lignani (mg/kg)	< 0,0001	0,1135	0,3108
luteolin (mg/kg)	0,0018	0,3396	0,701
apigenin (mg/kg)	< 0,0001	0,4548	0,727
oleuropein (mg/kg)	< 0,0001	0,025	0,567
O-Agl (mg/kg)	< 0,0001	0,0311	0,2192
O-Agl-dA (mg/kg)	< 0,0001	0,0087	0,044
DMO-Agl-dA (mg/kg)	< 0,0001	0,1387	0,717
(DMO-Agl-dA)ox (mg/kg)	0,0018	0,0468	0,8489
TyrOH (mg/kg)	< 0,0001	0,1722	0,7171
L-Agl (mg/kg)	< 0,0001	0,0023	0,0135
L-Agl-dA (mg/kg)	< 0,0001	0,0364	0,0445
DML-Agl-dA (mg/kg)	0,0072	0,0609	0,514
(DML-Agl-dA)ox (mg/kg)	0,2092	0,1718	0,4431
Tyr (mg/kg)	< 0,0001	0,5079	0,701
Skupni biofenoli, določeni s HPLC	0,0001	0,0109	0,1874

P ≤ 0,001: statistično zelo visoko značilen P ≤ 0,05: statistično značilen vpliv

vpliv

P > 0,05: statistično neznačilen vpliv

P ≤ 0,01: statistično visoko značilen vpliv

S: vpliv sorte: 'Istrska belica', 'Leccino' in mešane sorte

T: vpliv skladiščenja: sveži vzorci; vzorci skladiščeni v zmrzovalniku pri –20 °C; vzorci skladiščeni v hladilniku pri 8 °C

S*T: interakcija sorte in skladiščenja

PRILOGA B: Proučevanje sprememb kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju med segrevanjem Rancimatu. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva.

ANNEX B: Investigation of changes in chemical parameters in extra virgin olive oil during heating in Rancimat. Sources of variability and statistical characteristics of their influence.

Parameter	P _S	P _T	P _{S*T}
kislost (ut. %)	0,0045	0,0016	0,0029
peroksidno število (mmol O ₂ /kg)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
K ₂₃₂	0,0005	< 0,0001	0,0003
K ₂₇₀	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Δ K	0,049	< 0,0001	0,0409
oksidacijska stabilnost (h)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
C 14:0 (ut. %)	0,0829	0,0829	0,0829
C 16:0 (ut. %)	< 0,0001	0,0052	0,0058
C 16:1 (ut. %)	< 0,0001	0,2001	0,6507
C 17:0 (ut. %)	0,0049	< 0,0001	< 0,0001
C 17:1 (ut. %)	1	1	1
C 18:0 (ut. %)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
C 18:1 (ut. %)	0,0003	0,1304	0,4211
C 18:2 (ut. %)	0,1218	< 0,0001	< 0,0001
C 18:3 (ut. %)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
C 20:0 (ut. %)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
C 20:1 (ut. %)	< 0,0001	0,1027	0,2504
C 22:0 (ut. %)	0,0037	0,0019	0,0024
C 24:0 (ut. %)	0,6564	0,0242	0,0724
α – tokoferol (mg/kg)	0,0014	< 0,0001	0,0014
skupni biofenoli (mg/kg)	< 0,0001	< 0,0001	0,0114
luteolin (mg/kg)	< 0,0001	< 0,0001	0,1816
apigenin (mg/kg)	< 0,0001	0,1074	0,7396
lignans (mg/kg)	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
Ole (mg/kg)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
O-Agl (mg/kg)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
L-Agl (mg/kg)	< 0,0001	< 0,0001	0,0004
O-Agl-dA (mg/kg)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
L-Agl-dA (mg/kg)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DMO-dA (mg/kg)	0,3747	< 0,0001	0,3912
DML-dA (mg/kg)	0,0019	< 0,0001	0,0596
TyrOH (mg/kg)	0,0047	0,0209	0,3615
Tyr (mg/kg)	0,0116	0,001	0,3755

P ≤ 0,001: statistično zelo visoko značilen vpliv

P ≤ 0,01: statistično visoko značilen vpliv

P ≤ 0,05: statistično značilen vpliv

P > 0,05: statistično neznačilen vpliv

S: vpliv sorte: 'Istrska belica', 'Leccino' in mešane sorte

P: vpliv segrevanja: pred segrevanjem in po njem

S*P: interakcija sorte in segrevanja

PRILOGA C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

ANNEX C1: Values of chemical parameters in extra virgin olive oil and in sunflower oil as a function of heating time and temperature.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje	
			'Istrska belica'	'Leccino'		
kislost (ut, %)	/	0	0,15 ± 0,01 ^{Bbi}	0,10 ± 0,01 ^{Cbj}	0,18 ± 0,01 ^{Aej}	
	100	2	0,15 ± 0,01 ^{Bbl}	0,10 ± 0,004 ^{Cbk}	0,22 ± 0,01 ^{Adl}	
		4	0,15 ± 0,01 ^{Babl}	0,11 ± 0,01 ^{Cal}	0,29 ± 0,01 ^{ACL}	
		6	0,15 ± 0,004 ^{Babl}	0,11 ± 0,01 ^{Cal}	0,36 ± 0,01 ^{AbL}	
		8	0,16 ± 0,01 ^{Bal}	0,12 ± 0,01 ^{Cal}	0,42 ± 0,01 ^{Aal}	
	180	2	0,16 ± 0,01 ^{Bhk}	0,11 ± 0,01 ^{Cik}	0,25 ± 0,01 ^{Aik}	
		4	0,17 ± 0,01 ^{Bgk}	0,13 ± 0,01 ^{Chk}	0,34 ± 0,01 ^{Ahk}	
		6	0,18 ± 0,01 ^{Bfk}	0,14 ± 0,01 ^{Cgk}	0,43 ± 0,02 ^{Agk}	
		8	0,18 ± 0,01 ^{Bfk}	0,16 ± 0,01 ^{Cfk}	0,51 ± 0,01 ^{Afk}	
	peroksidno število (mmol O ₂ /kg)	/	0	2,35 ± 0,07 ^{Bdf}	2,82 ± 0,05 ^{Aef}	1,55 ± 0,07 ^{Cef}
		100	2	2,40 ± 0,12 ^{Cdk}	3,95 ± 0,15 ^{Adk}	3,12 ± 0,13 ^{Bdk}
			4	2,75 ± 0,15 ^{Bck}	4,12 ± 0,15 ^{Ack}	4,01 ± 0,26 ^{Ack}
6			3,39 ± 0,18 ^{Cbk}	4,33 ± 0,13 ^{Bbk}	4,64 ± 0,23 ^{Abk}	
8			4,21 ± 0,16 ^{Cak}	5,32 ± 0,18 ^{Aak}	4,85 ± 0,18 ^{Bak}	
180		2	1,04 ± 0,09 ^{Bgl}	1,15 ± 0,08 ^{AgL}	0,44 ± 0,05 ^{Cgl}	
		4	0,76 ± 0,04 ^{Bhl}	0,99 ± 0,12 ^{Ahl}	0,38 ± 0,03 ^{Chl}	
		6	0,76 ± 0,04 ^{Ahl}	0,80 ± 0,03 ^{Ail}	0,40 ± 0,02 ^{Bghl}	
		8	0,73 ± 0,03 ^{Bhl}	0,79 ± 0,03 ^{Ail}	0,32 ± 0,03 ^{Cil}	
<i>p</i> -anisidinsko število (meq/kg)		/	0	15,3 ± 0,3 ^{Aai}	12,2 ± 0,4 ^{Babh}	7,4 ± 0,2 ^{Cbj}
		100	2	15,3 ± 0,2 ^{Aal}	12,6 ± 0,2 ^{Bal}	7,5 ± 0,3 ^{Cbl}
			4	14,9 ± 0,3 ^{AbL}	12,1 ± 0,4 ^{Bbl}	7,6 ± 0,3 ^{Cbl}
	6		15,1 ± 0,2 ^{Aabl}	11,7 ± 0,4 ^{Bbl}	7,9 ± 0,3 ^{Cal}	
	8		15,0 ± 0,3 ^{Aabl}	11,8 ± 0,5 ^{Bbl}	8,2 ± 0,5 ^{Cal}	
	180	2	24,6 ± 0,3 ^{Ahk}	17,9 ± 0,6 ^{Bgk}	17,0 ± 1,1 ^{Cik}	
		4	27,8 ± 0,4 ^{Agk}	20,0 ± 1,1 ^{Cfk}	22,0 ± 1,5 ^{Bhk}	
		6	27,4 ± 0,7 ^{Bgk}	20,1 ± 1,1 ^{Cfk}	29,5 ± 1,8 ^{Agk}	
		8	28,4 ± 0,8 ^{Bfk}	20,4 ± 0,9 ^{Cfk}	37,6 ± 0,9 ^{Afk}	
	totoks število (meq/kg)	/	0	24,7 ± 0,3 ^{Ad}	23,5 ± 0,5 ^{Bcf}	13,6 ± 0,3 ^{Cej}
		100	2	24,9 ± 0,5 ^{Bdl}	28,4 ± 0,7 ^{Abk}	20,0 ± 0,8 ^{Cdk}
			4	25,9 ± 0,7 ^{Bcl}	28,6 ± 0,9 ^{Abk}	23,6 ± 1,3 ^{Cck}
6			28,6 ± 0,7 ^{AbL}	29,0 ± 0,7 ^{Abk}	26,5 ± 1,1 ^{Bbl}	
8			31,8 ± 0,5 ^{Bak}	33,1 ± 0,8 ^{Aak}	27,6 ± 1,0 ^{Cal}	
180		2	28,8 ± 0,6 ^{Ahk}	22,5 ± 0,5 ^{Bgl}	18,7 ± 0,9 ^{Cil}	
		4	30,8 ± 0,4 ^{Afgk}	23,9 ± 0,7 ^{Bfl}	23,5 ± 1,5 ^{Bhk}	
		6	30,4 ± 0,7 ^{Agk}	23,3 ± 1,0 ^{Bfl}	31,1 ± 1,8 ^{Agk}	
		8	31,3 ± 0,7 ^{Bfk}	23,6 ± 0,9 ^{Cfl}	38,9 ± 1,0 ^{Afk}	

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje		
			'Istrska belica'	'Leccino'			
K ₂₃₂	/	0	1,592 ± 0,004 ^{Bdj}	1,550 ± 0,007 ^{Cej}	4,020 ± 0,007 ^{Aej}		
		100	2	1,663 ± 0,006 ^{Ccl}	1,709 ± 0,016 ^{Bdk}	4,309 ± 0,019 ^{Adl}	
			4	1,670 ± 0,011 ^{Cbcl}	1,735 ± 0,017 ^{Bcl}	4,473 ± 0,010 ^{AcI}	
			6	1,675 ± 0,009 ^{Cbl}	1,821 ± 0,015 ^{Bbl}	4,589 ± 0,022 ^{AbI}	
			8	1,727 ± 0,010 ^{Cal}	1,864 ± 0,023 ^{Cal}	4,873 ± 0,018 ^{Aal}	
	180	2	1,752 ± 0,008 ^{Bik}	1,678 ± 0,011 ^{Bil}	4,482 ± 0,016 ^{Aik}		
		4	1,918 ± 0,018 ^{Bhk}	1,830 ± 0,025 ^{Chk}	4,925 ± 0,014 ^{Ahk}		
		6	2,037 ± 0,019 ^{Bgk}	1,959 ± 0,029 ^{Cgk}	5,411 ± 0,029 ^{Agk}		
			8	2,186 ± 0,020 ^{Bfk}	2,125 ± 0,025 ^{Bfk}	6,044 ± 0,098 ^{Afk}	
	K ₂₇₀	/	0	0,132 ± 0,004 ^{Bcj}	0,097 ± 0,002 ^{Cej}	2,754 ± 0,004 ^{Aef}	
			100	2	0,134 ± 0,004 ^{Bbcl}	0,102 ± 0,003 ^{Cbl}	2,825 ± 0,007 ^{Adl}
				4	0,137 ± 0,005 ^{Babl}	0,104 ± 0,005 ^{Cbl}	2,832 ± 0,008 ^{AcI}
6				0,138 ± 0,006 ^{Babl}	0,111 ± 0,004 ^{Cal}	2,840 ± 0,016 ^{AbI}	
8				0,141 ± 0,005 ^{Bal}	0,114 ± 0,005 ^{Cal}	2,856 ± 0,015 ^{Aak}	
180		2	0,205 ± 0,012 ^{Bik}	0,230 ± 0,012 ^{Bik}	2,984 ± 0,045 ^{Afk}		
		4	0,280 ± 0,011 ^{Bhk}	0,305 ± 0,018 ^{Bhk}	3,094 ± 0,050 ^{Afk}		
		6	0,340 ± 0,022 ^{Cgk}	0,372 ± 0,022 ^{Bgk}	3,196 ± 0,029 ^{Afk}		
			8	0,415 ± 0,029 ^{Bfk}	0,447 ± 0,020 ^{Bfk}	3,330 ± 0,025 ^{Afk}	
C _{14:0} (ut. %)		/	0	0,02 ± 0,00 ^{Baf}	0,01 ± 0,00 ^{Bcf}	0,07 ± 0,00 ^{Aaf}	
			100	2	0,01 ± 0,01 ^{Bbk}	0,01 ± 0,00 ^{Bak}	0,07 ± 0,00 ^{Aak}
				4	0,01 ± 0,00 ^{Bbk}	0,01 ± 0,00 ^{Bak}	0,07 ± 0,00 ^{Aak}
	6			0,01 ± 0,00 ^{Bbk}	0,01 ± 0,00 ^{Bak}	0,07 ± 0,00 ^{Aak}	
	8			0,01 ± 0,00 ^{Bbk}	0,01 ± 0,00 ^{Bak}	0,07 ± 0,01 ^{Aak}	
	180	2	0,01 ± 0,00 ^{Bgk}	0,01 ± 0,00 ^{Bfk}	0,07 ± 0,00 ^{Afk}		
		4	0,01 ± 0,00 ^{Bgk}	0,01 ± 0,00 ^{Bfk}	0,06 ± 0,01 ^{Afk}		
		6	0,01 ± 0,01 ^{Bgk}	0,01 ± 0,00 ^{Bfk}	0,07 ± 0,00 ^{Afk}		
			8	0,02 ± 0,01 ^{Bfgk}	0,01 ± 0,00 ^{Bfk}	0,07 ± 0,00 ^{Afkbh}	
	C _{16:0} (ut. %)	/	0	11,43 ± 0,01 ^{Bbh}	12,85 ± 0,01 ^{Abi}	6,27 ± 0,01 ^{Cbh}	
			100	2	11,42 ± 0,01 ^{Bhk}	12,86 ± 0,01 ^{Aal}	6,29 ± 0,03 ^{Cak}
				4	11,43 ± 0,01 ^{Babl}	12,86 ± 0,01 ^{Aak}	6,24 ± 0,01 ^{Ccl}
6				11,43 ± 0,01 ^{Babk}	12,87 ± 0,01 ^{Aal}	6,28 ± 0,01 ^{Cakb}	
8				11,44 ± 0,01 ^{Bcl}	12,87 ± 0,01 ^{Aal}	6,27 ± 0,01 ^{Cbl}	
180		2	11,39 ± 0,01 ^{Bil}	12,88 ± 0,02 ^{Ahk}	6,24 ± 0,02 ^{Cil}		
		4	11,53 ± 0,01 ^{Bfk}	12,84 ± 0,03 ^{Ail}	6,32 ± 0,02 ^{Cfk}		
		6	11,44 ± 0,01 ^{Bhk}	12,94 ± 0,03 ^{Afk}	6,29 ± 0,01 ^{Cgk}		
			8	11,47 ± 0,01 ^{Bgk}	12,92 ± 0,01 ^{Agk}	6,32 ± 0,02 ^{Cfk}	

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje
			'Istrska belica'	'Leccino'	
C 16:1 (ut. %)	/	0	0,96 ± 0,01 ^{Baf}	1,30 ± 0,01 ^{Aaf}	0,09 ± 0,004 ^{Caf}
	100	2	0,96 ± 0,01 ^{Bak}	1,29 ± 0,01 ^{Aak}	0,09 ± 0,01 ^{Cak}
		4	0,96 ± 0,01 ^{Bak}	1,29 ± 0,01 ^{Abk}	0,09 ± 0,01 ^{Cak}
		6	0,96 ± 0,01 ^{Bak}	1,29 ± 0,01 ^{Aak}	0,09 ± 0,01 ^{Cak}
		8	0,95 ± 0,01 ^{Bak}	1,29 ± 0,01 ^{Aak}	0,09 ± 0,01 ^{Cak}
	180	2	0,94 ± 0,01 ^{Bgl}	1,28 ± 0,01 ^{Agk}	0,09 ± 0,01 ^{Cfk}
		4	0,95 ± 0,01 ^{Bgl}	1,28 ± 0,01 ^{Agk}	0,10 ± 0,01 ^{Cfk}
		6	0,95 ± 0,01 ^{Bgl}	1,28 ± 0,004 ^{Agk}	0,09 ± 0,004 ^{Cfk}
		8	0,95 ± 0,01 ^{Bfl}	1,30 ± 0,01 ^{Afk}	0,09 ± 0,004 ^{Cfk}
	C 17:0 (ut. %)	/	0	0,06 ± 0,00 ^{Aaf}	0,04 ± 0,00 ^{Ccb}
100		2	0,06 ± 0,01 ^{Aak}	0,05 ± 0,01 ^{Bak}	0,05 ± 0,004 ^{Bak}
		4	0,05 ± 0,004 ^{Abk}	0,05 ± 0,01 ^{Aak}	0,05 ± 0,00 ^{Aal}
		6	0,06 ± 0,01 ^{Aabk}	0,05 ± 0,01 ^{Aak}	0,05 ± 0,01 ^{Bak}
		8	0,06 ± 0,00 ^{Aakk}	0,05 ± 0,00 ^{Bak}	0,05 ± 0,01 ^{Bal}
180		2	0,05 ± 0,01 ^{Ag1}	0,04 ± 0,01 ^{Bgk}	0,05 ± 0,004 ^{Agk}
		4	0,05 ± 0,01 ^{Bgk}	0,04 ± 0,00 ^{Cgl}	0,06 ± 0 ^{Afk}
		6	0,05 ± 0,01 ^{Ag1}	0,04 ± 0,01 ^{Agk}	0,05 ± 0,01 ^{Agk}
		8	0,06 ± 0,01 ^{Afk}	0,05 ± 0,00 ^{Bfk}	0,05 ± 0,004 ^{Bgk}
C 17:1 (ut. %)		/	0	0,09 ± 0,01 ^{Baf}	0,10 ± 0,01 ^{Aaf}
	100	2	0,09 ± 0,01 ^{Bak}	0,10 ± 0,01 ^{Aak}	0,03 ± 0 ^{Cak}
		4	0,09 ± 0,004 ^{bBk}	0,10 ± 0,01 ^{Aak}	0,03 ± 0,004 ^{Cak}
		6	0,09 ± 0,004 ^{Babk}	0,10 ± 0,01 ^{Aak}	0,03 ± 0,01 ^{Cak}
		8	0,09 ± 0 ^{Bak}	0,10 ± 0,01 ^{Aak}	0,03 ± 0,01 ^{Cak}
	180	2	0,10 ± 0,01 ^{Afk}	0,10 ± 0,004 ^{Afk}	0,03 ± 0,01 ^{Bfk}
		4	0,09 ± 0,01 ^{Bfk}	0,10 ± 0,004 ^{Afk}	0,03 ± 0 ^{Cfgk}
		6	0,09 ± 0,01 ^{Afk}	0,10 ± 0,01 ^{Afk}	0,03 ± 0,004 ^{Bgk}
		8	0,09 ± 0,01 ^{Bfk}	0,10 ± 0,004 ^{Afk}	0,03 ± 0 ^{Cfgk}
	C 18:0 (ut. %)	/	0	3,15 ± 0,004 ^{Babg}	1,97 ± 0,01 ^{Cafg}
100		2	3,15 ± 0,01 ^{Bbck}	1,97 ± 0,01 ^{Cak}	4,30 ± 0,02 ^{Aak}
		4	3,14 ± 0,01 ^{Bck}	1,97 ± 0,01 ^{Cak}	4,24 ± 0,02 ^{Adl}
		6	3,14 ± 0,01 ^{Bcl}	1,97 ± 0,01 ^{Cak}	4,28 ± 0,01 ^{Abk}
		8	3,15 ± 0,01 ^{Bak}	1,97 ± 0,01 ^{Cal}	4,28 ± 0,02 ^{Abk}
180		2	3,13 ± 0,01 ^{Bhl}	1,97 ± 0,01 ^{Cfgk}	4,23 ± 0,01 ^{Ail}
		4	3,15 ± 0,01 ^{Bgk}	1,97 ± 0,01 ^{Cgk}	4,31 ± 0,02 ^{Afk}
		6	3,15 ± 0,01 ^{Bgk}	1,97 ± 0,01 ^{Cfgk}	4,28 ± 0,02 ^{Aghk}
		8	3,16 ± 0,01 ^{Bfk}	1,98 ± 0,004 ^{Cfk}	4,30 ± 0,04 ^{Afgk}

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje
			'Istrska belica'	'Leccino'	
C 18:1 (ut. %)	/	0	77,31 ± 0,02 ^{Bci}	77,61 ± 0,01 ^{Abh}	22,30 ± 0,01 ^{Cbi}
	100	2	77,32 ± 0,01 ^{Babl}	77,64 ± 0,01 ^{Aal}	22,27 ± 0,02 ^{Ccl}
		4	77,31 ± 0,01 ^{Bbcl}	77,64 ± 0,03 ^{Aal}	22,34 ± 0,04 ^{Cak}
		6	77,33 ± 0,01 ^{Bal}	77,64 ± 0,02 ^{Aal}	22,34 ± 0,02 ^{Cal}
		8	77,31 ± 0,01 ^{Bbcl}	77,65 ± 0,02 ^{Aal}	22,35 ± 0,04 ^{Cal}
	180	2	77,47 ± 0,02 ^{Bfk}	77,69 ± 0,02 ^{Agk}	22,35 ± 0,03 ^{Chk}
		4	77,36 ± 0,03 ^{Bhk}	77,75 ± 0,02 ^{Afk}	22,33 ± 0,04 ^{Chk}
		6	77,45 ± 0,02 ^{Bgk}	77,67 ± 0,02 ^{Agk}	22,39 ± 0,03 ^{Cgk}
		8	77,36 ± 0,01 ^{Bhk}	77,68 ± 0,02 ^{Agk}	22,42 ± 0,03 ^{Cfk}
	C 18:2 (ut. %)	/	0	5,40 ± 0,01 ^{Babf}	4,74 ± 0,01 ^{Caf}
100		2	5,41 ± 0,01 ^{Bak}	4,71 ± 0,01 ^{Cbk}	64,59 ± 0,05 ^{Abck}
		4	5,40 ± 0,01 ^{Bbk}	4,71 ± 0,01 ^{Cbk}	64,65 ± 0,03 ^{Aak}
		6	5,40 ± 0,01 ^{Back}	4,70 ± 0,01 ^{Cbck}	64,57 ± 0,04 ^{Acdk}
		8	5,39 ± 0,01 ^{Bck}	4,69 ± 0,03 ^{Cck}	64,55 ± 0,04 ^{Adk}
180		2	5,35 ± 0,02 ^{Bgl}	4,67 ± 0,03 ^{Cgl}	64,63 ± 0,03 ^{Afk}
		4	5,30 ± 0,02 ^{Bhl}	4,66 ± 0,01 ^{Cgl}	64,45 ± 0,04 ^{Ail}
		6	5,30 ± 0,01 ^{Bhl}	4,62 ± 0,01 ^{Chl}	64,48 ± 0,04 ^{Aal}
		8	5,30 ± 0,01 ^{Bhl}	4,63 ± 0,01 ^{Chl}	64,39 ± 0,04 ^{Ajl}
C 18:3 (ut. %)		/	0	0,49 ± 0,01 ^{Baf}	0,59 ± 0,01 ^{Aaf}
	100	2	0,49 ± 0,01 ^{Babk}	0,58 ± 0,01 ^{Aak}	0,49 ± 0,01 ^{Bak}
		4	0,49 ± 0,01 ^{Babk}	0,58 ± 0,01 ^{Aak}	0,49 ± 0,004 ^{Bak}
		6	0,49 ± 0,01 ^{Babk}	0,58 ± 0,01 ^{Aak}	0,49 ± 0,01 ^{Bak}
		8	0,49 ± 0,01 ^{Bbk}	0,59 ± 0,01 ^{Aak}	0,48 ± 0,01 ^{Bak}
	180	2	0,47 ± 0,01 ^{Cgl}	0,57 ± 0,01 ^{Agf}	0,49 ± 0,02 ^{Bfk}
		4	0,47 ± 0,01 ^{Bgl}	0,56 ± 0,01 ^{Ahl}	0,48 ± 0,02 ^{Bgk}
		6	0,47 ± 0,01 ^{Cgl}	0,56 ± 0,01 ^{Aghl}	0,48 ± 0,02 ^{Bfgk}
		8	0,47 ± 0,01 ^{Cgl}	0,55 ± 0,01 ^{Ail}	0,48 ± 0,01 ^{Bfgk}
	C 20:0 (ut. %)	/	0	0,53 ± 0,01 ^{Aabf}	0,35 ± 0,01 ^{Baf}
100		2	0,52 ± 0,004 ^{Abk}	0,35 ± 0,01 ^{Bak}	0,29 ± 0,01 ^{Cbk}
		4	0,53 ± 0,01 ^{Aabk}	0,35 ± 0,01 ^{Bak}	0,29 ± 0,01 ^{Cabk}
		6	0,53 ± 0,01 ^{Aak}	0,35 ± 0,004 ^{Bak}	0,28 ± 0,01 ^{Cbk}
		8	0,53 ± 0,01 ^{Aabk}	0,35 ± 0,01 ^{Bak}	0,29 ± 0,01 ^{Cabk}
180		2	0,52 ± 0,01 ^{Afk}	0,35 ± 0,01 ^{Bfk}	0,28 ± 0,01 ^{Cgk}
		4	0,52 ± 0,01 ^{Afk}	0,35 ± 0,01 ^{Bfk}	0,29 ± 0,01 ^{Cfk}
		6	0,52 ± 0,004 ^{Afl}	0,35 ± 0,01 ^{Bfk}	0,29 ± 0,02 ^{Cfgk}
		8	0,53 ± 0,01 ^{Afk}	0,35 ± 0,01 ^{Bfk}	0,29 ± 0,01 ^{Cfgk}

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje
			'Istrska belica'	'Leccino'	
C 20:1 (ut. %)	/	0	0,33 ± 0,01 ^{Aaf}	0,30 ± 0,01 ^{Bag}	0,18 ± 0,01 ^{Caf}
	100	2	0,32 ± 0,01 ^{Aak}	0,30 ± 0,01 ^{Bak}	0,18 ± 0,01 ^{Cak}
		4	0,32 ± 0,004 ^{Aak}	0,29 ± 0,01 ^{Bal}	0,18 ± 0,01 ^{Cak}
		6	0,32 ± 0,004 ^{Aak}	0,30 ± 0,01 ^{Bak}	0,18 ± 0,01 ^{Cak}
		8	0,33 ± 0,01 ^{Aak}	0,30 ± 0,01 ^{Bak}	0,18 ± 0,01 ^{Cak}
	180	2	0,32 ± 0,01 ^{Afk}	0,30 ± 0,01 ^{Bfgk}	0,18 ± 0,01 ^{Cfk}
		4	0,32 ± 0,01 ^{Afk}	0,30 ± 0,01 ^{Bfk}	0,18 ± 0,02 ^{Cfk}
		6	0,33 ± 0,01 ^{Afk}	0,30 ± 0,01 ^{Bfgk}	0,18 ± 0,01 ^{Cfk}
		8	0,33 ± 0,01 ^{Afk}	0,30 ± 0,01 ^{Bfgk}	0,18 ± 0,01 ^{Cfk}
	C 22:0 (ut. %)	/	0	0,17 ± 0,01 ^{Bafg}	0,11 ± 0,004 ^{Caf}
100		2	0,17 ± 0,01 ^{Bak}	0,11 ± 0,01 ^{Cabk}	0,68 ± 0,01 ^{Aak}
		4	0,17 ± 0,01 ^{Bak}	0,10 ± 0,01 ^{Cck}	0,67 ± 0,01 ^{Aal}
		6	0,17 ± 0,01 ^{Bak}	0,10 ± 0,01 ^{Cbck}	0,68 ± 0,01 ^{Aak}
		8	0,16 ± 0,01 ^{Bal}	0,10 ± 0,01 ^{Cbck}	0,68 ± 0,01 ^{Aak}
180		2	0,17 ± 0,01 ^{Bfgk}	0,10 ± 0,01 ^{Cghk}	0,66 ± 0,01 ^{Ahk}
		4	0,16 ± 0,01 ^{Bfgk}	0,10 ± 0,01 ^{Chk}	0,69 ± 0,02 ^{Afk}
		6	0,16 ± 0,004 ^{Bgk}	0,10 ± 0,01 ^{Cghk}	0,68 ± 0,01 ^{Agk}
		8	0,17 ± 0,01 ^{Bfk}	0,11 ± 0,01 ^{Cfgk}	0,68 ± 0,02 ^{Afgk}
C 24:0 (ut. %)		/	0	0,08 ± 0,004 ^{Bbf}	0,04 ± 0,01 ^{Cbh}
	100	2	0,09 ± 0,01 ^{Bak}	0,04 ± 0,01 ^{Cbk}	0,23 ± 0,004 ^{Aak}
		4	0,09 ± 0,01 ^{Bak}	0,05 ± 0,01 ^{Cak}	0,23 ± 0,004 ^{Aak}
		6	0,08 ± 0,01 ^{Bbk}	0,04 ± 0,01 ^{Cbl}	0,23 ± 0,01 ^{Aak}
		8	0,09 ± 0,01 ^{Bak}	0,04 ± 0,01 ^{Cbl}	0,23 ± 0,01 ^{Aak}
	180	2	0,08 ± 0,01 ^{Bfl}	0,04 ± 0,01 ^{Cgl}	0,23 ± 0,004 ^{Afk}
		4	0,08 ± 0,01 ^{Bfl}	0,04 ± 0,01 ^{Cgk}	0,23 ± 0,02 ^{Afk}
		6	0,08 ± 0,01 ^{Bfk}	0,05 ± 0,000 ^{Cfk}	0,23 ± 0,01 ^{Afk}
		8	0,09 ± 0,01 ^{Bfk}	0,04 ± 0,01 ^{Cgk}	0,23 ± 0,01 ^{Afk}
	α-tokoferol (mg/kg)	/	0	96 ± 5 ^{Caf}	266 ± 14 ^{Baf}
100		2	91 ± 6 ^{Cabk}	229 ± 13 ^{Bbk}	505 ± 14 ^{Aak}
		4	88 ± 6 ^{Cbk}	229 ± 15 ^{Bbk}	495 ± 10 ^{Aak}
		6	90 ± 6 ^{Cabk}	221 ± 14 ^{Bbk}	465 ± 15 ^{Abl}
		8	88 ± 6 ^{Cbk}	219 ± 12 ^{Bbk}	466 ± 14 ^{Abl}
180		2	78 ± 4 ^{Cgl}	215 ± 16 ^{Bgk}	484 ± 9 ^{Agl}
		4	79 ± 4 ^{Cgl}	210 ± 10 ^{Bgl}	486 ± 13 ^{Akg}
		6	83 ± 6 ^{Cgk}	206 ± 14 ^{Bgk}	511 ± 14 ^{Afk}
		8	79 ± 5 ^{Cgl}	179 ± 9 ^{Bhl}	487 ± 14 ^{Agk}

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje		
			'Istrska belica'	'Leccino'			
klorofilni pigmenti z metodo po Pokornyju (mg/kg)	/	0	12,9 ± 0,2 ^{Aaf}	9,0 ± 0,1 ^{Baf}			
		100	2	12,7 ± 0,1 ^{Abk}	8,0 ± 0,1 ^{Bbk}		
			4	12,2 ± 0,1 ^{Ack}	7,8 ± 0,1 ^{Bck}		
			6	11,9 ± 0,2 ^{Adk}	7,5 ± 0,1 ^{Bdk}		
			8	11,6 ± 0,2 ^{Aek}	7,4 ± 0,2 ^{Bdk}		
	180	2	10,9 ± 0,2 ^{AgI}	7,3 ± 0,2 ^{Bgl}			
		4	10,0 ± 0,2 ^{Ahl}	6,7 ± 0,2 ^{Bhl}			
		6	9,3 ± 0,2 ^{Ail}	6,2 ± 0,1 ^{Bil}			
	klorofilni pigmenti z metodo po Mínguez –Mosqueri (mg/kg)	/	0	7,9 ± 0,1 ^{Aaf}	5,3 ± 0,1 ^{Baf}		
			100	2	7,3 ± 0,1 ^{Abk}	4,9 ± 0,1 ^{Bbk}	
				4	7,0 ± 0,1 ^{Ack}	4,7 ± 0,1 ^{Bck}	
				6	6,8 ± 0,2 ^{Adk}	4,7 ± 0,2 ^{Bck}	
8				6,6 ± 0,2 ^{Adk}	4,4 ± 0,1 ^{Bdk}		
180		2	6,4 ± 0,1 ^{AgI}	4,3 ± 0,1 ^{Bgl}			
		4	5,7 ± 0,1 ^{Ahl}	3,8 ± 0,1 ^{Bhl}			
		6	5,3 ± 0,1 ^{Ail}	3,6 ± 0,1 ^{Bil}			
karotenoidi (mg/kg)		/	0	5,7 ± 0,1 ^{Aaf}	4,0 ± 0,1 ^{Baf}		
			100	2	5,4 ± 0,1 ^{Abk}	4,0 ± 0,1 ^{Bak}	
				4	5,1 ± 0,1 ^{Ack}	3,8 ± 0,1 ^{Bbk}	
				6	5,0 ± 0,1 ^{Ack}	3,8 ± 0,1 ^{Bbk}	
	8			4,9 ± 0,1 ^{Adk}	3,7 ± 0,1 ^{Bck}		
	180	2	2,0 ± 0,3 ^{AgI}	1,6 ± 0,1 ^{Bgl}			
		4	0,9 ± 0,2 ^{Ahl}	0,8 ± 0,1 ^{Bhl}			
		6	0,6 ± 0,2 ^{Ail}	0,5 ± 0,1 ^{Bil}			
	skupni biofenoli z metodo FC (mg/kg)	/	0	455 ± 8 ^{Aaf}	300 ± 9 ^{Baf}	6 ± 2 ^{Caf}	
			100	2	432 ± 6 ^{Abk}	305 ± 9 ^{Bak}	2 ± 1 ^{Cbl}
				4	413 ± 7 ^{Adk}	298 ± 8 ^{Bak}	4 ± 2 ^{Cabk}
				6	424 ± 8 ^{Ack}	282 ± 11 ^{Bbk}	3 ± 2 ^{Cbk}
8				341 ± 14 ^{Aek}	270 ± 10 ^{Bek}	4 ± 2 ^{Cabl}	
180		2	405 ± 9 ^{AgI}	266 ± 6 ^{Bgl}	7 ± 2 ^{Cfk}		
		4	361 ± 10 ^{Ahl}	280 ± 9 ^{Bhl}	6 ± 3 ^{Cfk}		
		6	342 ± 10 ^{Ail}	233 ± 10 ^{Bil}	6 ± 3 ^{Cfk}		
			8	316 ± 10 ^{Ajl}	242 ± 12 ^{Bil}	8 ± 3 ^{Cfk}	

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje	
			'Istrska belica'	'Leccino'		
skupni biofenoli z metodo HPLC (mg/kg)	/	0	503,0 ± 3,5 ^{Aaf}	443,2 ± 6,8 ^{Baf}		
	100	2	385,7 ± 8,1 ^{Abi}	275,2 ± 7,6 ^{Bcl}		
		4	354,8 ± 3,1 ^{AcI}	288,6 ± 6,5 ^{Bbl}		
		6	372,1 ± 12,0 ^{AdI}	237,7 ± 8,0 ^{Bdl}		
		8	260,3 ± 4,8 ^{Ael}	228,3 ± 8,8 ^{Bcl}		
	180	2	495,4 ± 9,9 ^{Agk}	360,8 ± 6,8 ^{Bhk}		
		4	472,7 ± 10,1 ^{Ahk}	389,0 ± 7,1 ^{Bgk}		
		6	477,2 ± 12,7 ^{Ahk}	353,8 ± 14,7 ^{Bhik}		
		8	412,0 ± 9,7 ^{Aik}	346,2 ± 14,1 ^{Bik}		
	hidroksirozol (mg/kg)	/	0	6,6 ± 0,1 ^{Baf}	7,3 ± 0,1 ^{Aaf}	
		100	2	6,3 ± 0,1 ^{Abk}	5,0 ± 0,2 ^{Bdl}	
			4	6,1 ± 0,1 ^{Ack}	5,1 ± 0,1 ^{Bcdl}	
6			6,3 ± 0,1 ^{AbI}	5,4 ± 0,2 ^{Bbl}		
8			5,2 ± 0,2 ^{AdI}	5,2 ± 0,2 ^{AcI}		
180		2	6,0 ± 0,1 ^{Ahl}	5,8 ± 0,1 ^{Bik}		
		4	6,1 ± 0,2 ^{Bhk}	6,7 ± 0,1 ^{Aghk}		
		6	6,5 ± 0,2 ^{Agk}	6,6 ± 0,3 ^{Ahk}		
		8	5,5 ± 0,2 ^{Bik}	6,8 ± 0,2 ^{Agk}		
tirosol (mg/kg)		/	0	6,2 ± 0,1 ^{Ag}	5,8 ± 0,2 ^{Baf}	
		100	2	5,9 ± 0,1 ^{AbI}	4,4 ± 0,2 ^{Bdk}	
			4	5,8 ± 0,1 ^{AbI}	4,6 ± 0,1 ^{Bck}	
	6		6,1 ± 0,1 ^{Aal}	4,9 ± 0,2 ^{Bbk}		
	8		5,4 ± 0,3 ^{AcI}	4,5 ± 0,2 ^{Bcdk}		
	180	2	6,0 ± 0,1 ^{Ahk}	4,5 ± 0,1 ^{Bhk}		
		4	6,2 ± 0,2 ^{Agk}	4,8 ± 0,1 ^{Bgk}		
		6	6,6 ± 0,2 ^{Afk}	4,5 ± 0,2 ^{Bhk}		
		8	5,7 ± 0,2 ^{Aik}	4,4 ± 0,2 ^{Bhk}		
	vanilinska kislina (mg/kg)	/	0	0,37 ± 0,01 ^{Baf}	0,83 ± 0,02 ^{Aaf}	
		100	2	0,33 ± 0,01 ^{Bck}	0,63 ± 0,01 ^{Adk}	
			4	0,34 ± 0,01 ^{Bbck}	0,68 ± 0,02 ^{Ack}	
6			0,35 ± 0,01 ^{Bbk}	0,75 ± 0,03 ^{Abk}		
8			0,34 ± 0,01 ^{Bbck}	0,73 ± 0,03 ^{Abk}		
180		2	0,30 ± 0,01 ^{Bgl}	0,62 ± 0,02 ^{Agk}		
		4	0,29 ± 0,01 ^{Bhl}	0,62 ± 0,02 ^{AgI}		
		6	0,30 ± 0,01 ^{Bgl}	0,55 ± 0,02 ^{Ahl}		
		8	0,24 ± 0,01 ^{Bil}	0,51 ± 0,02 ^{Ail}		

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje		
			'Istrska belica'	'Leccino'			
DMO-Agl-dA (mg/kg)	/	0	55,8 ± 0,8 ^{Baj}	255,4 ± 7,1 ^{Aaf}			
		100	2	50,2 ± 0,6 ^{Bbl}	158,3 ± 6,0 ^{ACL}		
			4	45,5 ± 0,7 ^{Bcl}	166,4 ± 5,6 ^{AbI}		
			6	50,5 ± 0,9 ^{Bbl}	126,6 ± 5,5 ^{AdI}		
			8	30,9 ± 1,2 ^{Bdl}	116,7 ± 6,0 ^{Ael}		
	180	2	162,1 ± 3,9 ^{Bhk}	214,1 ± 4,9 ^{Ahk}			
		4	189,7 ± 5,0 ^{Bfk}	230,1 ± 5,8 ^{Agk}			
		6	183,1 ± 4,4 ^{Bgk}	204,8 ± 10,5 ^{Aik}			
	(DMO-Agl-dA)ox (mg/kg)	/	0	22,5 ± 0,3 ^{Aaf}	8,2 ± 0,3 ^{Bdh}		
			100	2	10,0 ± 0,2 ^{Ack}	8,1 ± 0,3 ^{Bdk}	
				4	11,4 ± 0,3 ^{Abk}	8,7 ± 0,2 ^{Bcl}	
				6	11,4 ± 0,4 ^{Abk}	10,5 ± 0,6 ^{Bbl}	
8				8,7 ± 0,3 ^{Bdk}	11,4 ± 0,5 ^{Aal}		
180		2	5,3 ± 0,2 ^{Bil}	8,0 ± 0,3 ^{Ahk}			
		4	6,6 ± 0,2 ^{Bhl}	12,4 ± 0,3 ^{Agk}			
		6	7,2 ± 0,2 ^{Bgl}	13,6 ± 0,4 ^{Afk}			
O-Agl-dA (mg/kg)		/	0	26,1 ± 0,9 ^{Aaf}	4,1 ± 0,0 ^{Baf}		
			100	2	22,3 ± 0,3 ^{Abk}	2,0 ± 0,1 ^{Bbk}	
				4	16,1 ± 0,2 ^{Ack}	1,3 ± 0,1 ^{Bck}	
				6	14,3 ± 0,3 ^{Adk}	1,3 ± 0,2 ^{Bck}	
	8			9,7 ± 0,3 ^{Aek}	1,2 ± 0,1 ^{Bck}		
	180	2	1,4 ± 0,0 ^{AgI}	1,3 ± 0,2 ^{Bhl}			
		4	0,7 ± 0,0 ^{Ahl}	1,0 ± 0,1 ^{Bjl}			
		6	0,9 ± 0,0 ^{Bhl}	1,4 ± 0,1 ^{Agk}			
	DML-Agl-dA (mg/kg)	/	0	69,4 ± 1,0 ^{Baj}	82,0 ± 1,9 ^{Aaf}		
			100	2	58,1 ± 1,0 ^{ACL}	43,5 ± 1,1 ^{Bcl}	
				4	51,8 ± 1,1 ^{AdI}	48,2 ± 0,9 ^{Bbl}	
				6	65,0 ± 0,9 ^{AbI}	33,1 ± 1,1 ^{Bel}	
8				35,7 ± 1,5 ^{Ael}	35,2 ± 1,5 ^{Bdl}		
180		2	199,4 ± 6,5 ^{Ahk}	76,1 ± 1,0 ^{Bhk}			
		4	209,6 ± 4,0 ^{Agk}	82,4 ± 1,6 ^{Bfk}			
		6	216,2 ± 8,9 ^{Afk}	74,6 ± 2,5 ^{Bhk}			
			8	190,7 ± 4,8 ^{Aik}	79,6 ± 3,0 ^{Bgk}		

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje	
			'Istrska belica'	'Leccino'		
(DML-Agl-dA)ox (mg/kg)	/	0	17,9 ± 0,3 ^{Baf}	20,7 ± 0,4 ^{Aaf}		
	100	2	14,0 ± 0,5 ^{Adk}	13,2 ± 0,4 ^{Bdl}		
		4	15,4 ± 0,2 ^{Abk}	14,1 ± 0,3 ^{Bbl}		
		6	14,7 ± 0,3 ^{Ack}	13,9 ± 0,6 ^{Bbcl}		
		8	12,6 ± 0,6 ^{Bek}	13,5 ± 0,4 ^{Accl}		
	180	2	0 ± 0 ^{Bgl}	17,2 ± 0,6 ^{Ahk}		
		4	0 ± 0 ^{Bgl}	18,8 ± 0,5 ^{Agk}		
		6	0 ± 0 ^{Bgl}	17,5 ± 0,7 ^{Ahk}		
		8	0 ± 0 ^{Bgl}	17,1 ± 0,7 ^{Ahk}		
	Lignani (mg/kg)	/	0	69,7 ± 0,9 ^{Aaf}	16,3 ± 0,6 ^{Bag}	
		100	2	58,2 ± 0,5 ^{Abk}	12,3 ± 0,3 ^{Bcl}	
			4	57,1 ± 0,7 ^{Abk}	12,7 ± 0,4 ^{Bcl}	
6			57,9 ± 11,9 ^{Abk}	13,9 ± 0,7 ^{Bbl}		
8			43,3 ± 0,4 ^{Ack}	13,5 ± 0,5 ^{Bbl}		
180		2	28,0 ± 0,6 ^{Ajl}	13,2 ± 0,5 ^{Bik}		
		4	29,5 ± 0,9 ^{Ail}	14,9 ± 0,4 ^{Bhk}		
		6	35,2 ± 1,1 ^{Agl}	15,4 ± 0,4 ^{Bhk}		
		8	34,1 ± 0,8 ^{Ahl}	17,5 ± 0,7 ^{Bfk}		
L-Agl-dA (mg/kg)		/	0	70,3 ± 0,9 ^{Aaf}	4,6 ± 0,2 ^{Baf}	
		100	2	57,2 ± 0,9 ^{Abk}	3,1 ± 0,1 ^{Bbk}	
			4	51,5 ± 0,7 ^{Ack}	2,0 ± 0,2 ^{Bbk}	
	6		40,1 ± 0,6 ^{Adk}	1,9 ± 0,1 ^{Bck}		
	8		28,0 ± 1,0 ^{Aek}	1,3 ± 0,2 ^{Bdk}		
	180	2	2,0 ± 0,1 ^{Agl}	1,2 ± 0,1 ^{Bhl}		
		4	0,7 ± 0,1 ^{Bhl}	1,9 ± 0,2 ^{Agl}		
		6	0,9 ± 0,0 ^{Bhl}	1,7 ± 0,2 ^{Agl}		
		8	0,6 ± 0,0 ^{Bhl}	1,7 ± 0,2 ^{Agl}		
	O-Agl (mg/kg)	/	0	94,8 ± 1,2 ^{Aaf}	19,7 ± 0,3 ^{Baf}	
		100	2	56,2 ± 1,2 ^{Ack}	11,3 ± 0,2 ^{Bbk}	
			4	56,9 ± 1,6 ^{Ack}	10,5 ± 0,3 ^{Bck}	
6			64,1 ± 2,1 ^{Abk}	10,8 ± 0,3 ^{Bck}		
8			49,6 ± 1,3 ^{Adk}	10,6 ± 0,5 ^{Bck}		
180		2	36,2 ± 0,8 ^{Agl}	8,3 ± 0,2 ^{Bgl}		
		4	11,5 ± 0,3 ^{Ahl}	5,1 ± 0,4 ^{Bhl}		
		6	7,7 ± 0,6 ^{Ail}	3,9 ± 0,4 ^{Bil}		
		8	4,7 ± 0,3 ^{Ajl}	3,5 ± 0,4 ^{Bil}		

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje
			'Istrska belica'	'Leccino'	
L-Agl (mg/kg)	/	0	54,6 ± 0,9 ^{Aaf}	9,4 ± 0,2 ^{Baf}	
		100	2	39,3 ± 7,2 ^{Abk}	6,7 ± 0,3 ^{Bck}
	4		28,9 ± 0,6 ^{Adk}	7,3 ± 0,3 ^{Bbk}	
	6		33,4 ± 0,7 ^{Ack}	7,2 ± 0,3 ^{Bbk}	
	8		23,4 ± 0,6 ^{Aek}	7,3 ± 0,3 ^{Bbk}	
	180	2	41,5 ± 0,9 ^{AgI}	4,1 ± 0,2 ^{Bgl}	
		4	4,6 ± 0,3 ^{Ahl}	3,6 ± 0,3 ^{Bhl}	
		6	5,0 ± 0,2 ^{Ahl}	2,7 ± 0,2 ^{Bil}	
		8	3,8 ± 0,2 ^{Ail}	2,0 ± 0,2 ^{Bjl}	
	luteolin (mg/kg)	/	0	5,0 ± 0,3 ^{Baf}	6,5 ± 0,3 ^{Aaf}
100			2	4,4 ± 0,3 ^{Bbk}	4,9 ± 0,4 ^{Ack}
		4	4,6 ± 0,4 ^{Babk}	5,1 ± 0,3 ^{Abck}	
		6	4,6 ± 0,4 ^{Babk}	5,4 ± 0,4 ^{Ack}	
		8	4,2 ± 0,3 ^{Bbk}	5,2 ± 0,2 ^{Abck}	
180		2	4,1 ± 0,4 ^{Bgk}	4,6 ± 0,3 ^{Aghk}	
		4	4,1 ± 0,3 ^{Bgl}	4,9 ± 0,3 ^{Agk}	
		6	4,2 ± 0,3 ^{Bgk}	4,5 ± 0,3 ^{Aghl}	
		8	3,5 ± 0,3 ^{Bhl}	4,4 ± 0,4 ^{Ail}	
aApigenin (mg/kg)		/	0	3,7 ± 0,2 ^{Aaf}	2,4 ± 0,1 ^{Baf}
	100		2	3,3 ± 0,1 ^{Abck}	1,8 ± 0,2 ^{Bbk}
		4	3,5 ± 0,2 ^{Abk}	1,9 ± 0,2 ^{Bbk}	
		6	3,5 ± 0,2 ^{Abk}	2,0 ± 0,1 ^{Bbk}	
		8	3,2 ± 0,2 ^{Ack}	2,0 ± 0,2 ^{Bbk}	
	180	2	3,1 ± 0,2 ^{Ahk}	1,8 ± 0,2 ^{Bgk}	
		4	3,2 ± 0,2 ^{Aghk}	1,9 ± 0,2 ^{Bgk}	
		6	3,5 ± 0,2 ^{Agk}	1,9 ± 0,3 ^{Bgk}	
		8	3,0 ± 0,2 ^{Ahk}	1,9 ± 0,4 ^{Bhk}	
	antioksidacijska aktivnost I ₅₀ (mg/mL)	/	0	11,0 ± 0,6 ^{Bdi}	13,2 ± 0,4 ^{Abh}
100			2	12,3 ± 0,6 ^{Bck}	13,1 ± 0,5 ^{Abl}
		4	12,8 ± 0,9 ^{AcI}	13,0 ± 0,7 ^{Abl}	
		6	15,2 ± 1,1 ^{Abk}	12,6 ± 1,0 ^{Bbl}	
		8	16,8 ± 0,8 ^{Aal}	16,7 ± 1,6 ^{Aal}	
180		2	12,8 ± 0,6 ^{Bhk}	14,6 ± 0,5 ^{Agk}	
		4	14,4 ± 1,0 ^{Agk}	14,8 ± 0,6 ^{Agk}	
		6	14,7 ± 1,1 ^{Bgk}	16,5 ± 0,8 ^{Ahk}	
		8	18,5 ± 1,0 ^{Afk}	16,9 ± 0,9 ^{Bhk}	

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C1: Vrednosti kemijskih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončičnem olju v odvisnosti od časa in temperature segrevanja.

Parameter	Temperatura (°C)	Čas (h)	Ekstra deviško oljčno olje		Sončnično olje
			'Istrska belica'	'Leccino'	
antioksidacijska aktivnost ARP (mg ⁻¹)	/	0	0,091 ± 0,005	0,076 ± 0,002	
	100	2	0,082 ± 0,004	0,076 ± 0,003	
		4	0,078 ± 0,006	0,077 ± 0,004	
		6	0,066 ± 0,005	0,080 ± 0,007	
		8	0,059 ± 0,003	0,060 ± 0,006	
	180	2	0,079 ± 0,004	0,069 ± 0,002	
		4	0,070 ± 0,005	0,068 ± 0,003	
		6	0,068 ± 0,005	0,061 ± 0,003	
		8	0,054 ± 0,003	0,059 ± 0,003	

^{A, B, C} Statistično značilne razlike v isti vrstici so podane z različnimi velikimi črkami ($P < 0,05$).

^{a, b, c, d, e} Statistično značilne razlike posameznega parametra pri temperaturi 100 °C v istem stolpcu so podane z različnimi malimi črkami ($P < 0,05$).

^{f, g, h, i, j} Statistično značilne razlike posameznega parametra pri temperaturi 180 °C v istem stolpcu so podane z različnimi malimi črkami ($P < 0,05$).

^{k, l} Statistično značilne razlike posameznega parametra pri določenem času v istem stolpcu so podane z različnimi malimi črkami ($P < 0,05$).

PRILOGA C2: Proučevanje vpliva temperature in časa segrevanja na kemijske parametre v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega.

ANNEX C2: Investiagion of the influence of heating time and temperature on chemical parameters in ekstra virgin olive oil. Sources of variability and statistical characteristics of their influence.

Parameter	P _O	P _T	P _C	P _{O*T*C}
Kislost (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Peroksidno število (mmol O ₂ /kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> -anisidinsko število (meq/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Totoks število (meq/kg)	<0,0001	0,5116	<0,0001	<0,0001
K ₂₃₂	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
K ₂₇₀	<0,0001	<0,0001	0,0171	0,6757
C 14:0 (ut. %)	<0,0001	0,5442	0,0002	0,0005
C 16:0 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 16:1 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001
C 17:0 (ut. %)	<0,0001	0,0021	<0,0001	<0,0001
C 17:1 (ut. %)	<0,0001	0,07	0,4316	0,5493
C 18:0 (ut. %)	<0,0001	0,1769	<0,0001	<0,0001
C 18:1 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 18:2 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 18:3 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 20:0 (ut. %)	<0,0001	0,6006	0,0009	0,7662
C 20:1 (ut. %)	<0,0001	0,2952	0,4374	0,9555
C 22:0 (ut. %)	<0,0001	0,5082	0,0173	<0,0001
C 24:0 (ut. %)	<0,0001	0,8108	0,115	<0,0001
α-tokoferol (mg/kg)	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001
Klorofilni pigmenti z metodo po Pokornyju (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Klorofilni pigmenti z metodo po Mínguez –Mosqueri (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Karotenoidi (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Skupni biofenoli z metodo FC (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Hidroksitirozol (mg/kg)	0,9863	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tirosol (mg/kg)	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001
Vanilinska kislina (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
DMO-Agl-dA (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
(DMO-Agl-dA)ox (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
O-Agl-dA (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
DML-Agl-dA (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
(DML-Agl-dA)ox (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Lignani (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
L-Agl-dA (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
O-Agl (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C2: Proučevanje vpliva temperature in časa segrevanja na kemijske parametre v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega.

Parameter	P _O	P _T	P _C	P _{O*T*C}
L-Agl (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Luteolin (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Apigenin (mg/kg)	<0,0001	0,0641	<0,0001	0,3013
Skupni biofenoli z metodo HPLC (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Antioksidacijska aktivnost I ₅₀ (mg/mL)	0,0011	<0,0001	<0,0001	<0,0001

P ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv

P ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv

P ≤ 0,05 statistično značilen vpliv

P > 0,05 statistično ne značilen vpliv

O: vpliv olja: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica', ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino', sončnično olje

T: vpliv temperature segrevanja: 100 °C in 180 °C

C: vpliv časa segrevanja: 0, 2, 4, 6 in 8 ur

O*C*T interakcija vplivov olja, temperature segrevanja in časa segrevanja

PRILOGA D1: Spremembe proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju po stournem segrevanju pri 180 °C

ANNEX D1: Changes of investigated parameters in extra virgin olive oil and sunflower oil after heating for 100 hours at 180 °C

Parameter	Olje	Olje	
		Pred segrevanjem	Po segrevanju
kislost (ut. %)	IB	0.15 ± 0.01 ^{bB}	0.48 ± 0.07 ^{cA}
	L	0.095 ± 0.005 ^{cB}	0.82 ± 0.04 ^{bA}
	S	0.18 ± 0.01 ^{aB}	1.32 ± 0.11 ^{aA}
peroksidno število (mmol O ₂ /kg)	IB	2.0 ± 0.08 ^{cA}	0.7 ± 0.13 ^{aB}
	L	2.5 ± 0.08 ^{bA}	0.6 ± 0.10 ^{aB}
	S	3.4 ± 0.09 ^{aA}	0.4 ± 0.03 ^{bB}
<i>p</i> -anisidinsko število (meq/kg)	IB	14.3 ± 0.3 ^{aB}	37.4 ± 1.4 ^{bA}
	L	8.1 ± 0.2 ^{bB}	36.8 ± 1.5 ^{bA}
	S	5.1 ± 0.1 ^{cB}	98.9 ± 4.2 ^{aA}
totoks število (meq/kg)	IB	22.3 ± 0.4 ^{aB}	40.2 ± 1.1 ^{bA}
	L	17.9 ± 0.5 ^{cB}	39.3 ± 1.2 ^{bA}
	S	18.8 ± 0.5 ^{bB}	100.5 ± 4.1 ^{aA}
K232	IB	1.594 ± 0.003 ^{bB}	3.166 ± 0.036 ^{cA}
	L	1.417 ± 0.006 ^{cB}	3.469 ± 0.048 ^{bA}
	S	5.361 ± 0.014 ^{aB}	11.538 ± 0.192 ^{aA}
K270	IB	0.124 ± 0.003 ^{bB}	0.820 ± 0.032 ^{cA}
	L	0.092 ± 0.004 ^{cB}	1.055 ± 0.034 ^{bA}
	S	1.258 ± 0.009 ^{aB}	2.692 ± 0.053 ^{aA}
dK	IB	-0.001 ± 0.0002 ^{bA}	0.053 ± 0.004 ^{bA}
	L	0.000 ± 0.000 ^{bA}	0.057 ± 0.003 ^{bA}
	S	0.138 ± 0.001 ^{aA}	0.174 ± 0.002 ^{aA}
C 6:0 (ut. %)	IB	0 ± 0 ^{aB}	0.01 ± 0 ^{bA}
	L	0 ± 0 ^{aB}	0.02 ± 0 ^{aA}
	S	0 ± 0 ^{aB}	0.01 ± 0 ^{cA}
C 8:0 (ut. %)	IB	0 ± 0 ^{aB}	0.04 ± 0.004 ^{bA}
	L	0 ± 0 ^{aB}	0.05 ± 0.005 ^{bA}
	S	0 ± 0 ^{aB}	0.10 ± 0.008 ^{aA}
C 14:0 (ut. %)	IB	0.01 ± 0 ^{bA}	0.01 ± 0 ^{bA}
	L	0.01 ± 0 ^{bA}	0.01 ± 0 ^{bA}
	S	0.07 ± 0 ^{aA}	0.07 ± 0 ^{aA}
C 16:0 (ut. %)	IB	11.20 ± 0.015 ^{bB}	11.58 ± 0.110 ^{bA}
	L	12.17 ± 0.005 ^{aB}	12.65 ± 0.073 ^{aA}
	S	6.23 ± 0.004 ^{cB}	6.59 ± 0.079 ^{cA}

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge D1: Spremembe proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju po stournem segrevanju pri 180 °C

Parameter	Olje	Olje	
		Pred segrevanjem	Po segrevanju
C 16:1 (ut. %)	IB	0.97 ± 0.015 ^{bA}	0.97 ± 0.005 ^{bA}
	L	1.110 ± 0.005 ^{aA}	1.110 ± 0.005 ^{aA}
	S	0.09 ± 0.005 ^{cA}	0.10 ± 0.004 ^{cA}
C 17:0 (ut. %)	IB	0.05 ± 0.004 ^{aA}	0.06 ± 0.005 ^{aA}
	L	0.050 ± 0.004 ^{aA}	0.050 ± 0.005 ^{aA}
	S	0.04 ± 0.005 ^{bA}	0.05 ± 0.006 ^{aA}
C 17:1 (ut. %)	IB	0.10 ± 0.004 ^{aA}	0.10 ± 0.006 ^{aA}
	L	0.100 ± 0.006 ^{aA}	0.100 ± 0.006 ^{aA}
	S	0.03 ± 0 ^{bA}	0.03 ± 0.004 ^{bA}
C 18:0 (ut. %)	IB	2.97 ± 0.010 ^{bB}	3.07 ± 0.012 ^{bA}
	L	2.150 ± 0.006 ^{cB}	2.230 ± 0.028 ^{cA}
	S	3.44 ± 0.005 ^{aB}	3.64 ± 0.020 ^{aA}
C 18:1 (ut. %)	IB	78.02 ± 0.022 ^{aA}	77.87 ± 0.059 ^{aB}
	L	77.800 ± 0.011 ^{bA}	77.760 ± 0.017 ^{bB}
	S	21.05 ± 0.004 ^{cB}	21.96 ± 0.042 ^{cA}
C 18:2 (ut. %)	IB	5.10 ± 0.004 ^{bA}	4.30 ± 0.040 ^{bB}
	L	5.11 ± 0.005 ^{bA}	4.18 ± 0.035 ^{bB}
	S	66.94 ± 0.005 ^{aA}	64.78 ± 0.340 ^{aB}
C 18:3 (ut. %)	IB	0.51 ± 0.005 ^{bA}	0.33 ± 0.030 ^{aB}
	L	0.62 ± 0.005 ^{aA}	0.37 ± 0.046 ^{aB}
	S	0.09 ± 0.004 ^{cA}	0.08 ± 0.005 ^{bB}
C 20:0 (ut. %)	IB	0.51 ± 0.006 ^{aB}	0.53 ± 0.006 ^{aA}
	L	0.38 ± 0.004 ^{bB}	0.40 ± 0.009 ^{bA}
	S	0.23 ± 0.004 ^{cB}	0.25 ± 0.008 ^{cA}
C 20:1 (ut. %)	IB	0.32 ± 0.005 ^{aB}	0.36 ± 0.005 ^{aA}
	L	0.32 ± 0.004 ^{aB}	0.35 ± 0.009 ^{aA}
	S	0.16 ± 0.004 ^{bA}	0.15 ± 0.004 ^{bB}
C 22:0 (ut. %)	IB	0.16 ± 0.004 ^{bB}	0.17 ± 0.005 ^{bA}
	L	0.12 ± 0.000 ^{cA}	0.12 ± 0.004 ^{cA}
	S	0.68 ± 0.004 ^{aB}	0.72 ± 0.023 ^{aA}
C 24:0 (ut. %)	IB	0.08 ± 0.005 ^{bB}	0.09 ± 0.004 ^{bA}
	L	0.06 ± 0.004 ^{cA}	0.06 ± 0.005 ^{cA}
	S	0.25 ± 0.004 ^{aA}	0.13 ± 0.017 ^{aB}
druge maščobne kisline (ut. %)	IB	0 ± 0 ^{bB}	0.52 ± 0.005 ^{bA}
	L	0 ± 0 ^{bB}	0.540 ± 0.007 ^{bA}
	S	0.69 ± 0.005 ^{aB}	1.35 ± 0.186 ^{aA}
klorofilni pigmenti z metodo po Pokornyju (mg/kg)	IB	16.8 ± 0.1 ^{aA}	1.7 ± 0.5 ^{aB}
	L	10.5 ± 0.06 ^{bA}	0.9 ± 0.3 ^{bB}

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge D1: Spremembe proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju po stournem segrevanju pri 180 °C

Parameter	Olje	Olje	
		Pred segrevanjem	Po segrevanju
klorofilni pigmenti z metodo po Minguéz-Mosqueri (mg/kg)	IB	9.8 ± 0.4 ^{aA}	1.2 ± 0.1 ^{aB}
	L	7.1 ± 0.1 ^{bA}	0.8 ± 0.08 ^{bB}
karotenoidi (mg/kg)	IB	5.3 ± 0.1 ^{aA}	1.2 ± 0.2 ^{bB}
	L	5.7 ± 0.2 ^{bA}	1.6 ± 0.1 ^{aB}
α-tokoferol (mg/kg)	IB	98 ± 5.6 ^{cA}	60 ± 6.1 ^{cB}
	L	186 ± 7.7 ^{bA}	118 ± 7.7 ^{bB}
	S	519 ± 13 ^{aA}	451 ± 15 ^{aB}
skupni biofenoli z metodo FC (mg/kg)	IB	307 ± 6 ^{aA}	66 ± 11 ^{aB}
	L	153 ± 6 ^{bA}	23 ± 6 ^{bB}
vanilinska kislina (mg/kg)	IB	0.6 ± 0.01 ^{bA}	0 ± 0 ^{bB}
	L	0.9 ± 0.030 ^{Aa}	0.1 ± 0.02 ^{Ab}
luteolin (mg/kg)	IB	4.6 ± 0.09 ^{Aa}	0.1 ± 0.02 ^{Ab}
	L	4.3 ± 0.2 ^{Ba}	0.04 ± 0.005 ^{Bb}
apigenin (mg/kg)	IB	3.5 ± 0.06 ^{Aa}	1.4 ± 0.2 ^{Ab}
	L	2.1 ± 0.1 ^{Ba}	0.5 ± 0.1 ^{Bb}
lignani (mg/kg)	IB	32.8 ± 0.6 ^{Aa}	20.7 ± 3.0 ^{Ab}
	L	22.8 ± 1.3 ^{Ba}	15.9 ± 3.9 ^{Bb}
Ole (mg/kg)	IB	0 ± 0 ^{Ab}	0.1 ± 0.01 ^{Aa}
	L	0 ± 0 ^{Aa}	0 ± 0 ^{Ba}
O-Agl-A (mg/kg)	IB	52.5 ± 1.0 ^{Aa}	0.6 ± 0.09 ^{Ab}
	L	7.7 ± 0.3 ^{Ba}	0.3 ± 0.06 ^{Bb}
O-Agl-dA (mg/kg)	IB	10.5 ± 0.1 ^{Aa}	1.70 ± 0.2 ^{Ab}
	L	1.8 ± 0.09 ^{Ba}	0.8 ± 0.1 ^{Bb}
DMO-Agl- dA (mg/kg)	IB	31.1 ± 0.51 ^{Ba}	1.2 ± 0.2 ^{Ab}
	L	48.2 ± 1.9 ^{Aa}	0.3 ± 0.06 ^{Bb}
(DMO-Agl- dA)ox (mg/kg)	IB	11.3 ± 0.2 ^{Aa}	0 ± 0 ^{Ab}
	L	4.2 ± 0.2 ^{Ba}	0 ± 0 ^{Ab}
TyrOH (mg/kg)	IB	8.8 ± 0.1 ^{Aa}	0.3 ± 0.04 ^{Ab}
	L	4.1 ± 0.3 ^{Ba}	0.2 ± 0.05 ^{Ab}
L-Agl-A (mg/kg)	IB	19.0 ± 0.4 ^{Aa}	1.3 ± 0.2 ^{Ab}
	L	5.5 ± 0.2 ^{Ba}	0.3 ± 0.08 ^{Bb}
L-Agl-dA (mg/kg)	IB	33.6 ± 0.8 ^{Aa}	4.2 ± 0.7 ^{Ab}
	L	3.8 ± 0.2 ^{Ba}	3.7 ± 0.9 ^{Aa}
DML-Agl-dA (mg/kg)	IB	26.5 ± 0.4 ^{Aa}	24.4 ± 4.0 ^{Aa}
	L	18.7 ± 0.4 ^{Ba}	8.1 ± 1.7 ^{Bb}
(DML-Agl- dA)ox (mg/kg)	IB	13.5 ± 0.2 ^{Aa}	7.3 ± 1.1 ^{Ab}
	L	12.0 ± 0.4 ^{Ba}	7.1 ± 1.7 ^{Ab}

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge D1: Spremembe proučevanih parametrov v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju po stournem segrevanju pri 180 °C

Parameter	Olje	Olje	
		Pred segrevanjem	Po segrevanju
Tyr (mg/kg)	IB	8.4 ± 0.08 ^{Aa}	3.5 ± 0.47 ^{Ab}
	L	5.0 ± 0.2 ^{Ba}	1.7 ± 0.3 ^{Bb}
skupni biofenoli z metodo HPLC (mg/kg)	IB	270.7 ± 4.3 ^{aA}	126.0 ± 20.0 ^{aB}
	L	141.2 ± 5.2 ^{bA}	61.3 ± 17.8 ^{bB}
antioksidacijska učinkovitost I ₅₀ (mg/mL)	IB	19.3 ± 0.7 ^{aB}	309.3 ± 8.5 ^{aA}
	L	36.7 ± 0.6 ^{bB}	536.2 ± 7.2 ^{bA}
indukcijski čas (h)	IB	50.8 ± 3.0 ^{aA}	25.6 ± 1.6 ^{aB}
	L	42.6 ± 1.5 ^{bA}	25.1 ± 1.9 ^{aB}
	S	5.3 ± 0.06 ^{cA}	4.2 ± 0.3 ^{bB}

Olje: IB: Ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica'; L: Ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino'; S: sončnično olje

^{a,b,c} Srednje vrednosti posameznega parametra v istem stolpcu, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo (P < 0,05).

^{A,B} Srednje vrednosti v isti vrstici, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo

PRILOGA D2: Vpliv stournega segrevanja pri 180 °C na kemijske parametre v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na kemijske parametre.

ANNEX D2: Influence of heating for 100 hours at 180 °C on chemical parameters in extra virgin olive and oil sunflower oil. Sources of variability and statistical characteristics of their influence on chemical parameters.

Parameter	P _O	P _P	P _{O*P}
kislost (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
peroksidno število (mmol O ₂ /kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
p-anisidinsko število (meq/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
totoks število (meq/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
K232	<0,0001	<0,0001	<0,0001
K270	<0,0001	<0,0001	<0,0001
dK	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 6:0 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 8:0 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 14:0 (ut. %)	<0,0001	-	-
C 16:0 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	0,0626
C 16:1 (ut. %)	<0,0001	0,4871	0,6308
C 17:0 (ut. %)	0,003	0,0141	0,483
C 17:1 (ut. %)	<0,0001	1	0,7288
C 18:0 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 18:1 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 18:2 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 18:3 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 20:0 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	0,6407
C 20:1 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 22:0 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C 24:0 (ut. %)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
druge maščobne kisline (ut. %)	<0,0001	<0,0001	0,0507
klorofilni pigmenti z metodo po Pokornyju (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
klorofilni pigmenti z metodo po Minguez-Mosqueri (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
karotenoidi (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	0,8819
α-tokoferol (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	0,0009
skupni biofenoli z metodo FC (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
vanilinska kislina (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
luteolin (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	0,0144
apigenin (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	0,0013
lignani (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	0,027
Ole (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
O-Agl-A (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
O-Agl-dA (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
DMO-Agl- dA (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
(DMO-Agl- dA)ox (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TyrOH (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge D2: Vpliv stournega segrevanja pri 180 °C na kemijske parametre v ekstra deviškem oljčnem olju in sončničnem olju. Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na kemijske parametre.

Parameter	P _O	P _P	P _{O*P}
L-Agl-A (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
L-Agl-dA (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
DML-Agl-dA (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	0,0001
(DML-Agl- dA)ox (mg/kg)	0,0582	<0,0001	0,1591
Tyr (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
skupni biofenoli z metodo HPLC (mg/kg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
indukcijski čas (h)	<0,0001	<0,0001	<0,0001

P ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv

P ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv

P ≤ 0,05 statistično značilen vpliv

P > 0,05 statistično ne značilen vpliv

O: vpliv olja: ekstra deviško oljčno olje sorte 'Istrska belica', ekstra deviško oljčno olje sorte 'Leccino', sončnično olje

P: vpliv segrevanja: pred segrevanjem, po segrevanju

O*P: interakcija vplivov olja in segrevanja