

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vasilij VALENCIČ

**VPLIV TEHNOLOŠKIH POSTOPKOV NA
KAKOVOST NAMIZNIH OLJK SLOVENSKE ISTRE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vasilij VALENCIČ

**VPLIV TEHNOLOŠKIH POSTOPKOV NA KAKOVOST NAMIZNIH
OLJK SLOVENSKE ISTRE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE INFLUENCE OF PRODUCTION TECHNOLOGY ON THE
QUALITY OF TABLE OLIVES FROM SLOVENIAN ISTRIA**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2010

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja živilstva na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Laboratorijske analize vsebnosti antioksidantov in senzorično ocenjevanje je bilo opravljeno na Inštitutu za ekologijo, oljčno olje in kontrolo LABS d.o.o. v Izoli, mikrobiološke analize pa v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij na 40. redni seji 14.9.2007, po pooblastilu s 16. seje Senata Univerze v Ljubljani z dne 4.7.2007 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Terezija Golob in za somentorico prof. dr. Sonja Smole Možina.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Somentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Helena Abramovič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo

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

Članica: prof. dr. Sonja Smole Možina
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Olivera Koprivnjak
Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet

Datum zagovora: 28.01.2010

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorand:
Vasilij VALENČIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 664.8.02.03 + 579.67 : 634.63 : 543.06 (043) =163.6
KG namizne oljke/fermentacija namiznih oljk/*Olea europaea* L./'Štorta'/
'Istrska belica'/biofenoli/hidroksitirosol/tirosol/HPLC/antioksidativna učinkovitost/
DPPH/ kvasovke/restriksijski fragmenti/senzorične lastnosti
AV VALENČIČ, Vasilij, univ. dipl. inž. živilske tehnologije
SA GOLOB, Terezija (mentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in
biotehniških znanosti, področje živilstva
LI 2010
IN VPLIV TEHNOLOŠKIH POSTOPKOV NA KAKOVOST NAMIZNIH OLJK
SLOVENSKE ISTRE
TD Doktorska disertacija s področja živilstva
OP XII, 91 str., 16 pregl., 36 sl., 13 pril., 95 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V raziskavi smo proučevali vpliv tehnoloških postopkov na kakovost namiznih oljk Slovenske Istre sort 'Štorta' in 'Istrska belica'. Spremljali smo antioksidativno učinkovitost ter vsebnost in sestavo biofenolov s poudarkom na hidroksitirosolu in tirosolu, identificirali smo nekatere značilne vrste kvasovk, ki vodijo spontano fermentacijo namiznih oljk in končni izdelek tudi senzorično ovrednotili. Predelavo namiznih oljk smo izvedli na tradicionalni in modificirani španski način in med predelavo spremljali fizikalnokemijske parametre kakovosti, ki jih predpisuje Tržni standard o namiznih oljkah (Trade standard applying to table olives, 2004). Ugotovili smo, da imajo vzorci namiznih oljk, predelanih na tradicionalni način, večjo antioksidativno učinkovitost in vsebnost skupnih biofenolov, hidroksitirosola in tirosola kot vzorci, predelani na modificirani španski način. Rezultati mikrobiološke raziskave in identifikacije mikroorganizmov so pokazali, da kvasovke vodijo fermentacijo namiznih oljk Slovenske Istre. S kombinacijo molekularno biološke metode, PCR-RFLP regije ITS in tradicionalne metode identifikacije kvasovk smo identificirali naslednje vrste kvasovk: *Pichia anomala*, *Cryptococcus adeliensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila* in *Rhodotorula mucilaginosa*. Senzorična analiza namiznih oljk po 60 in 180 dneh fermentacije je pokazala, da so namizne oljke, predelane na tradicionalni način, v primerjavi z vzorci, predelanimi na modificirani španski način, bolj grenke, trde in vlaknate. Na podlagi senzoričnega ocenjevanja smo ugotovili, da je tradicionalni način predelave bolj primeren za predelavo namiznih oljk Slovenske Istre, saj tudi po 180 dneh fermentacije namizne oljke ohranijo primerne senzorične značilnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 664.8.02.03 + 579.67 : 634.63 : 543.06 (043) =163.6
CX table olives/table olives fermentation/*Olea europaea* L./“Štorta”/“Istrska belica”/
biophenols/ hydroxytyrosol/tyrosol/HPLC/antioxidant activity/DPPH/ yeasts/
restriction fragments/sensory attributes
AU VALENČIČ, Vasilij
AA GOLOB, Terezija (supervisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljani, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and
Biotechnical Sciences, Field: Food Science and Technology
PY 2010
TI THE INFLUENCE OF PRODUCTION TECHNOLOGY ON THE QUALITY OF
TABLE OLIVES FROM SLOVENIAN ISTRIA
DT Doctoral dissertation
NO XII, 91 p., 16 tab., 36 fig., 13 ann., 95 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The influence of two production technologies on the quality of “Štorta” and “Istrska
belica” table olives from Slovenian Istria was studied. The amount of biophenols,
hydroxytyrosol, tyrosol and antioxidant activity was evaluated. The leading
microorganisms in spontaneous fermentation were yeasts. Several species of yeast
were isolated and identified. Sensory characteristics of table olives were determined.
Table olives were processed using Slovenian traditional and a modified Spanish
style production technology. Physico-chemical parameters in accordance with Trade
standard applying to table olives (2004) were studied. Values of total biophenols,
hydroxytyrosol and tyrosol determined in table olives produced with traditional
technology were higher than in table olives produced with the modified Spanish
style technology. The highest antioxidant activity was determined in table olives
processed with traditional technology. The results of this work showed that only
yeasts play an essential role in fermentation of table olives from Slovenian Istria.
Pichia anomala, *Cryptococcus adeliensis*, *Metschnikowia pulcherrima*,
Aureobasidium pullulans, *Candida oleophila* and *Rhodotorula mucilaginosa* were
isolated and identified according to restriction analysis of the PCR amplicons ITS
and 5.8S rDNA and biochemical tests. To evaluate the influence of production
technology on the quality of table olives sensory assessment was performed. The
bitterness, hardness and fibrousness of table olives, that were processed 60 and 180
days using the traditional production technology, were more intensive compared to
the intensities of samples produced with the modified Spanish style. According to
the results of our research, the traditional production technology was better for
processing the two local olive varieties from Slovenian Istria, because even after 180
days they preserved appropriate bitterness, hardness and fibrousness that made them
suitable for consumption.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TEHNOLOGIJA PREDELAVE NAMIZNIH OLJK	3
2.1.1 Španski ali seviljski način predelave namiznih oljk	3
2.1.2 Naravni ali grški način predelave namiznih oljk	6
2.1.3 Kalifornijski način predelave namiznih oljk	7
2.2 TRŽNI STANDARD IN ZNAČILNOSTI NAMIZNIH OLJK	8
2.3 BIOFENOLI V PLODU OLJKE IN V NAMIZNIH OLJKAH	12
2.3.1 Biofenoli v namiznih oljkah	14
2.3.2 Biosinteza fenolnih spojin v oljkah	15
2.4 VLOGA KVASOVK PRI FERMENTACIJI NAMIZNIH OLJK	18
2.4.1 Biokemijske značilnosti kvasovk	19
2.4.2 Interakcija kvasovk in mlečnokislinskih bakterij	20
2.4.3 Rast kvasovk pri shranjevanju namiznih oljk	21
2.4.4 Genetske značilnosti kvasovk, izoliranih iz proizvodnje namiznih oljk	22
2.5 SENZORIČNO OCENJEVANJE NAMIZNIH OLJK	23
2.5.1 Negativne senzorične značilnosti (napake) namiznih oljk	24
2.5.1.1 Gnilobna fermentacija (po gnilem)	24
2.5.1.2 Maslena fermentacija	24
2.5.1.3 Nastanek plina (alambrado)	25
2.5.1.4 Mehčanje plodov (softening)	25
2.5.1.5 Nepravilna propionsko-maslena fermentacija (zapateria)	25
2.5.1.6 Gubanje plodov (arrugato)	26
2.5.1.7 Motnost in sluzavost slanice	26
2.5.1.8 Sprememba barve plodov	26
2.5.1.9 Poškodba eksokarpa in mehčanje mezokarpa	26
2.5.1.10 Zelene pege	26
3 MATERIAL IN METODE	27
3.1 MATERIAL	27
3.2 PREDELAVA NAMIZNIH OLJK	27
3.3 METODE	29
3.3.1 Merjenje vrednosti pH	29
3.3.2 Določevanje vsebnosti prostih kislin	29
3.3.3 Refraktometrično določevanje koncentracije slanice	29

	str.	
3.3.4	Priprava ekstraktov za določevanje biofenolov in antioksidativne učinkovitosti	29
3.3.5	Spektrofotometrično določevanje vsebnosti skupnih biofenolov	30
3.3.6	Določevanje vsebnosti skupnih biofenolov, hidroksitirosola in tirosola s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)	30
3.3.7	Določevanje antioksidativne učinkovitosti	31
3.3.8	Določevanje skupnega števila mikroorganizmov	31
3.3.9	Določevanje skupnega števila kvasovk in plesni	32
3.3.10	Določevanje števila mlečnokislinskih bakterij	32
3.3.11	Priprava vzorcev za identifikacijo kvasovk	32
3.3.12	Izolacija DNA	32
3.3.13	Priprava vzorcev za analizo RFLP (polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov) in pomnoževanje DNA v verižni reakciji s polimerazo (PCR)	33
3.3.14	Elektroforeza in identifikacija pomnožene rDNA	33
3.3.15	Restrikcija	33
3.3.16	Elektroforeza in identifikacija restriksijskih fragmentov	33
3.3.17	Fiziološki in biokemijski testi za identifikacijo kvasovk	34
3.3.17.1	Fermentacijski testi	34
3.3.17.2	Testi asimilacije ogljikovih spojin	34
3.3.17.3	Testi asimilacije dušikovih spojin	34
3.3.17.4	Testi rasti v različnih gojiščih	35
3.3.17.5	Testi rasti pri različnih temperaturah	35
3.3.18	Senzorično ocenjevanje namiznih oljk	35
3.3.19	Statistična obdelava podatkov	36
4	REZULTATI	37
4.1	REZULTATI MERJENJA VREDNOSTI pH SLANICE	37
4.2	REZULTATI DOLOČEVANJA VSEBNOSTI PROSTIH KISLIN V SLANICI	38
4.3	REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE SLANICE	39
4.4	REZULTATI DOLOČEVANJA VSEBNOSTI SKUPNIH BIOFENOLOV	39
4.5	REZULTATI DOLOČEVANJA VSEBNOSTI HIDROKSITIROSOLA IN TIROSOLA	45
4.6	REZULTATI DOLOČEVANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI	47
4.7	REZULTATI DOLOČEVANJA SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV V PLODOVIH IN NAMIZNIH OLJKAH	50
4.8	REZULTATI DOLOČEVANJA ŠTEVILA KVASOVK V PLODOVIH IN NAMIZNIH OLJKAH	50
4.9	REZULTATI DOLOČEVANJA ŠTEVILA MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ V PLODOVIH IN NAMIZNIH OLJKAH	51
4.10	IZOLACIJA KVASOVK	51
4.11	IDENTIFIKACIJA KVASOVK	52
4.12	REZULTATI SENZORIČNEGA OCENJEVANJA NAMIZNIH OLJK	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	67

		str.
5.1	RAZPRAVA	67
5.2	ZAKLJUČNE UGOTOVITVE	75
5.3	SKLEPI	76
6	POVZETEK	77
6.1	POVZETEK	77
6.2	SUMMARY	79
7	VIRI	83
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Parametri kakovosti namiznih oljk (Trade standard..., 2004)	9
Preglednica 2: Aditivi in tehnološka pomagala pri predelavi namiznih oljk (Trade standard..., 2004)	10
Preglednica 3: Parametri termične obdelave namiznih oljk (Trade standard..., 2004)	11
Preglednica 4: Kalibriranje plodov pred predelavo in namiznih oljk (Trade standard..., 2004)	12
Preglednica 5: Razvrščanje namiznih oljk v kategorije (Sensory analysis of table olives, 2008)	24
Preglednica 6: Rezultati merjenja koncentracije slanice (% NaCl) namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo	39
Preglednica 7: Rezultati HPLC in spektrofotometrične (FC) določitve vsebnosti skupnih biofenolov (mg/kg) v plodovih oljk pred predelavo	40
Preglednica 8: Rezultati HPLC in spektrofotometrične (FC) določitve vsebnosti skupnih biofenolov (mg/kg) v namiznih oljkah	40
Preglednica 9: Vsebnost hidroksitirosola (TyrOH) in tirosola (Tyr), v mg/kg, v plodovih oljk pred predelavo	45
Preglednica 10: Vsebnost hidroksitirosola (TyrOH) in tirosola (Tyr), v mg/kg, v namiznih oljkah	46
Preglednica 11: Antioksidativna učinkovitost, ARP (mg ⁻¹) v plodovih oljk pred predelavo	48
Preglednica 12: Antioksidativna učinkovitost, ARP (mg ⁻¹) namiznih oljk	48
Preglednica 13: Restriksijski fragmenti kvasovk	52
Preglednica 14: Rezultati fermentacijskih testov	52
Preglednica 15: Rezultati asimilacije ogljikovih spojin	53
Preglednica 16: Rezultati asimilacije dušikovih spojin, rasti pri različnih temperaturah, rasti v različnih gojiščih in morfološke značilnosti kvasovk	54

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema španskega načina predelave namiznih oljk (Brighigna, 1998)	5
Slika 2: Hidroliza olevropeina (Brighigna, 1998)	5
Slika 3: Shema naravnega načina predelave namiznih oljk (Brighigna, 1998)	6
Slika 4: Shema kalifornijskega načina predelave namiznih oljk (Brighigna, 1998)	7
Slika 5: Strukturna formula hidroksitirosilolenolata (Bianco in Uccella, 2000)	12
Slika 6: Strukturne formule oleozida, olevropeina in ligstrozida (Ryan in sod., 2002)	13
Slika 7: Strukturna formula verbaskozida (Ryan in sod., 2002)	13
Slika 8: Strukturni formuli oleozida in olevrozida (Ryan in sod., 2002)	15
Slika 9: Biosinteza olevropeina (Ryan in sod., 2002)	16
Slika 10: Strukturne formule razgradnih produktov olevropeina (Ryan in sod., 2002)	17
Slika 11: Shema poteka preskusa	28
Slika 12: Vrednost pH slanice namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo; povprečne vrednosti in standardna deviacija dveh letnikov	37
Slika 13: Vsebnost prostih kislin (g/100 mL) v slanici namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo; povprečne vrednosti in standardna deviacija dveh letnikov	38
Slika 14: Vsebnosti skupnih biofenolov v plodovih oljk pred predelavo in namiznih oljkah 'Štorta' (A) in 'Istrska belica' (B)	41
Slika 15: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v plodovih sorte 'Istrska belica' pred predelavo, letnik 2006	42
Slika 16: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način, po 60-ih dneh fermentacije, letnik 2006	43
Slika 17: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na modificirani španski način, po 60-ih dneh fermentacije, letnik 2006	43
Slika 18: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način, po 180-ih dneh fermentacije, letnik 2006	44
Slika 19: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na modificirani španski način, po 180-ih dneh fermentacije, letnik 2006	44
Slika 20: Vsebnost hidroksitirosola (TyrOH) in tirosola (Tyr) v vzorcih namiznih oljk 'Štorta' in 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni in modificirani španski način, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije	47
Slika 21: Antioksidativna učinkovitost (ARP) v vzorcih namiznih oljk 'Štorta' in 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni in modificirani španski način, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije	49

	str.
Slika 22: Skupno število mikroorganizmov v raztopini plodov pred predelavo (0) in v slanici namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo; povprečne vrednosti in standardna deviacija dveh letnikov	50
Slika 23: Število kvasovk v raztopini plodov pred predelavo (0) in v slanici namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo; povprečne vrednosti in standardna deviacija dveh letnikov	51
Slika 24: Restriksijski fragmenti <i>CfoI</i>	55
Slika 25: Restriksijski fragmenti <i>HaeIII</i>	55
Slika 26: Restriksijski fragmenti <i>Hinfl</i>	56
Slika 27: Populacijska dinamika med tradicionalnim načinom fermentacije (TP) namiznih oljk 'Štorta' (Š), letnik 2006 in letnik 2007	57
Slika 28: Populacijska dinamika med tradicionalnim načinom fermentacije (TP) namiznih oljk 'Istrska belica' (IB), letnik 2006 in letnik 2007	58
Slika 29: Populacijska dinamika med modificiranim španskim načinom fermentacije (ŠP) namiznih oljk 'Štorta' (Š), letnik 2006 in letnik 2007	59
Slika 30: Populacijska dinamika med modificiranim španskim načinom fermentacije (ŠP) namiznih oljk 'Istrska belica' (IB), letnik 2006 in letnik 2007	60
Slika 31: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, po 60-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov	61
Slika 32: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, po 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov	62
Slika 33: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni način (TP), po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov	63
Slika 34: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na modificirani španski način (ŠP), po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov	64
Slika 35: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov	65
Slika 36: Aromogram namiznih oljk 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov	66

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Karakterizacija plodov pred predelavo. Rezultati določitve vsebnosti biofenolov in mikrobiološke analize plodov
- Priloga B:** Rezultati fizikalnokemijskih in mikrobioloških analiz namiznih oljk
- Priloga C:** Rezultati vsebnosti biofenolov in antioksidativna učinkovitost namiznih oljk
- Priloga D:** Umeritvena krivulja za spektrofotometrično določevanje vsebnosti skupnih biofenolov
- Priloga E1:** Kromatogram HPLC določitve biofenolov v plodovih sorte 'Štorta' pred predelavo, letnik 2006
- Priloga E2:** Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na tradicionalni način, po 60-ih dneh fermentacije, letnik 2006
- Priloga E3:** Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na modificirani španski način, po 60-ih dneh fermentacije, letnik 2006
- Priloga E4:** Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na tradicionalni način, po 180-ih dneh fermentacije, letnik 2006
- Priloga E5:** Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na modificirani španski način, po 180-ih dneh fermentacije, letnik 2006
- Priloga F:** Restrikcijski fragmenti
- Priloga G:** Rezultati senzoričnega ocenjevanja namiznih oljk
- Priloga H:** Ocenjevalni list (Sensory analysis of table olives, 2008)
- Priloga I:** Suha snov v vzorcih plodov in namiznih oljk

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

3,4-DHPEA	3,4-dihidroksifeniletanol (hidroksitirosol)
3,4-DHPEA-EA	3,4-dihidroksifeniletanol-elenolna kislina (oleuropein aglikon)
3,4-DHPEA-EDA	3,4-dihidroksifeniletanol-dialdehidna oblika elenolne kisline (dialdehidna oblika oleuropein aglikona)
ARP	protiradikalska moč
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPP	dobra proizvodna praksa
FC	Folin Ciocalteu
Gluc	glukoza
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IB	sorta 'Istrska belica'
IOC	International Olive Council
MRS	De Man, Rogosa and Sharp agar
NA	nutrient agar
OGY	oxytetracycline glucose yeast agar
PCR	verižna reakcija s polimerazo
p-HPEA	p-hidroksifeniletanol (tirosol)
rDNA	ribosomska DNA
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
Rha	ramnoza
Š	sorta 'Štorta'
ŠP	modificirani španski način predelave
TP	tradicionalni način predelave
Tyr	tirosol
TyrOH	hidroksitirosol
YM	yeast mould agar

1 UVOD

Plodovi oljke so eni redkih sadežev, ki niso neposredno užitni ob obiranju. Oljke je potrebno s primerno tehnologijo predelave razgreniti in fermentirati, saj so zelo grenke in trpke. Grenkoba je posledica velike vsebnosti antioksidantov, med katerimi prevladuje oleuropein. Na neprijeten okus vplivajo tudi voski, lignini, celuloza in glukozidi. Znanih je veliko postopkov predelave namiznih oljk. V svetu so najbolj razširjeni španski način za predelavo zelenih namiznih oljk ter naravni in kalifornijski način za predelavo črnih oljk. Poleg teh je v uporabi še veliko tradicionalnih postopkov, ki so se ohranili z ustnimi izročili, zapisov o njih pa skorajda ni.

Proizvodnja namiznih oljk se v svetu močno povečuje. Glede na podatke Mednarodnega sveta za oljke (IOC) se je svetovna proizvodnja namiznih oljk povečala iz 950 tisoč ton v letu 1990 na 2 milijona ton v letu 2008.

Članice Evropske unije so v letu 2008 predelale 34 % svetovne proizvodnje namiznih oljk oziroma 694 tisoč ton. Glavnina proizvodnje znotraj Evropske unije se predela v Španiji (68 %), Grčiji (17 %) in Italiji (12 %). Poleg Egipta, Turčije, Maroka in Sirije so glavni proizvajalci namiznih oljk še Alžirija, Argentina, Peru, ZDA, Čile in Jordanija.

Na slovenskem trgu uvozimo letno 400 ton namiznih oljk (brez slanice), od teh je 350 ton iz držav članic EU in 50 ton iz drugih držav. Namizne oljke predelujemo tudi v Sloveniji, vendar je proizvodnja majhna, po ocenah je manj kot 1 % plodov predelanih v namizne oljke. V Sloveniji (v Slovenski Istri) je zasajenih 1561 ha oljčnikov oziroma 416 tisoč dreves (Bandelj Mavsar in sod., 2008). Letno se pridelava od 2000 do 2500 ton plodov in predela od 400 do 500 ton oljčnega olja. Najbolj razširjena sorta v Slovenski Istri je 'Istrska belica' (63 %), sledijo 'Leccino' (25 %), 'Pendolino' (3 %), 'Črnica' (2 %) in druge sorte (npr. 'Buga', 'Štorta', 'Mata', 'Frantoio', 'Maurino', 'Itrana', 'Leccione' in druge). Sorte, kot so 'Ascolana tenera', 'Santa Caterina' in 'Štorta', so primerne za predelavo v namizne oljke predvsem zaradi ugodnega razmerja mezokarp/endokarp. Že Carlo Hugues (Hočevar, 2005) je v knjigi *Oljkarstvo v Istri* opisal tri sorte ('Piranska kriva' ali 'Štorta', 'Piranska mata' in 'Piranska žižula') kot primerne za predelavo v namizne oljke in za nadaljnje gojenje v Istri. Navedene sorte uspevajo v Slovenski Istri, a so prisotne v zelo majhnem deležu. Tudi zaradi tega je predelava namiznih oljk še omejena in na ravni domače obrti. Namizne oljke Slovenske Istre so od leta 2008 registrirane z zaščiteno označbo porekla. Posebnosti namiznih oljk so pogojene s podnebnimi pogoji, sortami, takojšnjo predelavo, tehnologijo predelave s pripravo slanice iz Piranske soli z zaščiteno označbo porekla ter kontroliranim varstvom pred škodljivci (integrirana ali ekološka pridelava oljk).

Namizne oljke predelamo iz zdravih plodov (*Olea europaea* L.) primerne kakovosti. Plodovi morajo biti primerne velikosti in oblike, pomembno je razmerje mezokarp/endokarp (meso/koščica). Predelane oljke morajo biti primerne konsistence oziroma teksture in okusa. Pomembno je tudi, da se koščica lepo in z lahkoto loči od mesa (Trade standard applying to table olives, 2004).

Oljke so vir biofenolov, ki kot naravni antioksidanti ščitijo plodove, predelano oljčno olje in namizne oljke pred oksidacijo. Vplivajo tudi na grenak okus namiznih oljk in prispevajo k pikantnosti pridobljenega deviškega oljčnega olja. Vsebnost in sestava biofenolov namiznih oljk je zelo kompleksna. Odvisna je od sorte, stopnje zrelosti in tehnološkega

načina predelave oljk (Boskou in sod., 2006). Vsebnost olevropeina se s stopnjo zrelosti plodov postopoma zmanjšuje. Hkrati pa se povečuje vsebnost hidroksitirosola, tirosola in drugih derivatov olevropeina, ki prevladujejo v dozorelih in že črno obarvanih plodovih. Olevropein je nosilec grenkega okusa, zaradi katerega so nepredelane oljke senzorično nesprejemljive (Romero in sod., 2004). Zato je nujno, da v procesu priprave namiznih oljk zmanjšamo vsebnost teh spojin. Pri tem se poslužujemo različnih tehnoloških postopkov. Španski način predelave zelenih oljk in grški način predelave črnih oljk sta zelo razširjena in se uporabljata tako v industrijskem kot tudi v obrtnem merilu.

Pri španskem načinu oljke najprej namakajo v bazičnem mediju (lugu) in nato sledi mlečnokislinska fermentacija v slanici. Pri grškem načinu pa oljke namakajo najprej v vodi in jih zatem fermentirajo v slanici. Ne glede na različna postopka se med tehnološkim procesom spremeni sestava in vsebnost naravno prisotnih biofenolov (Blekas in sod., 2002).

Iz opravljenih raziskav različnih raziskovalcev je razvidno, da je kakovost namiznih oljk odvisna od sorte, načina oziroma tehnologije predelave in letnika ter pogojev pridelave oljk. Ker v Sloveniji podobna raziskava, s katero bi se seznanili o kakovosti naših namiznih oljk, še ni bila opravljena, smo si v okviru predložene disertacije zastavili cilj proučiti vpliv dveh tehnoloških postopkov predelave oljk na kakovost izdelka.

1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

V okviru raziskave smo oljke dveh sort, 'Štorta' in 'Istrska belica', predelali v namizne oljke na dva načina, in sicer na tradicionalni in na modificirani španski način predelave.

Cilji raziskave so bili naslednji:

- določiti fizikalnokemijske parametre kakovosti namiznih oljk s poudarkom na naravno prisotnih antioksidantih;
- spremljati in identificirati mikroorganizme, ki vodijo spontano fermentacijo namiznih oljk;
- senzorično ovrednotiti kakovost namiznih oljk.

Ob zastavitvi raziskave smo postavili naslednje hipoteze:

- tehnologija predelave vpliva na kakovost namiznih oljk: na vsebnost in sestavo biofenolov, na antioksidativno učinkovitost, na razvoj naravne mikrobne populacije in na senzorične značilnosti namiznih oljk;
- namizne oljke sorte 'Istrska belica' bodo vsebovale več biofenolov kot namizne oljke sorte 'Štorta';
- vsebnost biofenolov vpliva na zaznavo grenkega okusa v namiznih oljkah;
- vsebnost biofenolov vpliva na prisotnost in rast kvasovk in mlečnokislinskih bakterij;
- časovni potek fermentacije namiznih oljk vpliva na senzorične značilnosti namiznih oljk.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TEHNOLOGIJA PREDELAVE NAMIZNIH OLJK

Plodove oljk lahko predelamo na različne načine. Obstajajo različne tehnologije predelave in skoraj vsak pridelovalec ima svoj način predelave namiznih oljk.

Zelo pomembno je ročno obiranje plodov, saj lahko predelamo kakovosten izdelek le iz nepoškodovanih plodov. Oljke običajno obiramo v začetku oktobra oziroma mesec dni pred optimalno zrelostjo, ker je zelo pomembna konsistenca oziroma trdota plodov, ki jih nato izpostavimo izluževanju grenkih spojin.

Ravno tako je pomemben transport oljk do predelovalne linije. Plodove shranimo v nizke perforirane zaboje, da preprečimo morebitne fermentacijske procese in napake zaradi neprimerne skladiščenja in transporta.

Oljke pred izluževanjem in fermentacijo kalibriramo oziroma sortiramo po velikosti. Za učinkovito predelavo je zelo pomembno, da so plodovi enakomerne velikosti. Iz manjših plodov bi izlužili preveč olevropeina oziroma biofenolov in jih tako osiromašili, pri večjih pa bi bil postopek neučinkovit.

V splošnem poznamo tri različne tehnologije predelave:

- španski ali seviljski način predelave;
- naravni ali grški način predelave;
- kalifornijski način predelave.

2.1.1 Španski ali seviljski način predelave namiznih oljk

Je najbolj razširjeni način predelave zelenih oljk. Plodove oberemo, ko so zelene ali rumeno zelene barve. Izluževanje opravimo z raztopino NaOH. Običajno se uporablja 1,5-3 % raztopina (m/V), odvisno od sorte, stopnje zrelosti plodov in temperature predelave. Plodove izlužujemo največ 8-12 ur oziroma opazujemo prodor lužine v mezokarp. Medtem plodove premešamo vsako uro. Izluževanje zaključimo, ko lužina prodre do 2/3 ali 3/4 plodu. Koncentracija lužine vpliva na nadaljnji potek fermentacije in kakovost namiznih oljk. Uporaba bolj ali celo preveč koncentrirane lužine povzroči strukturne spremembe v plodu oziroma depektinizacijo celične stene, izlužijo se še preostali sladkorji oziroma substrati, ki so potrebni za fermentacijo namiznih oljk. Med samim postopkom izluževanja je zelo pomembno, da so plodovi popolnoma potopljeni v raztopino (plodove obtežimo), saj na stiku z zračnim kisikom oksidirajo, se delno razbarvajo in izluževanje je nepopolno. Z izluževanjem hidroliziramo olevropein do njegovega aglikona, v naslednji stopnji pa do elenolne kisline in hidroksitirosola. Po zaključenem izluževanju lužino lahko ponovno uporabimo za naslednje šarže.

Druga faza postopka predvideva spiranje oljk oziroma namakanje plodov v vodi 20-24 ur. S tem postopkom želimo odstraniti preostanek luga. V 24 urah vodo zamenjamo 2-4 krat. Tudi število spiranj in trajanje namakanja vpliva na nadaljnji potek fermentacije. Daljše namakanje lahko povzroči izgubo substratov, potrebnih za fermentacijo, v nasprotnem primeru, če je namakanje prekratko, pa je preostanek luga v plodovih prekomeren in

negativno vpliva na potek fermentacije, saj v končnem izdelku ne dosežemo primerne vrednosti pH.

Sledi mlečnokislinska fermentacija plodov v 8 ali 10 % (m/V) slanici. Začetna koncentracija slanice je lahko tudi 12 % (m/V), saj se v prvih dneh fermentacije zmanjša, ker se med plodovi in slanico vzpostavi ravnotežje. Oljke fermentiramo v slanici 2 ali 3 mesece, pri tem spremljamo koncentracijo slanice in pH raztopine. Organske kisline oziroma njihove soli (oksaloacetat, citrat, malat) difundirajo iz oljk v slanico in tvorijo puferni sistem, ki ugodno vpliva na regulacijo pH. Zaželjena je tvorba mlečne kisline. Če puferni sistem ni učinkovit, bo potek fermentacije prehitel, tvorilo se bo manj mlečne kisline, pH bo nižji (3-3,5) in povečala se bo količina nepovretega sladkorja, kar lahko vodi v nadaljnjo nepravilno fermentacijo in kvar izdelka. Na koncu fermentacije dosežemo pH 4 in vsaj 0,4 % mlečne kisline. Izdelek lahko pasteriziramo (Brighigna, 1998).

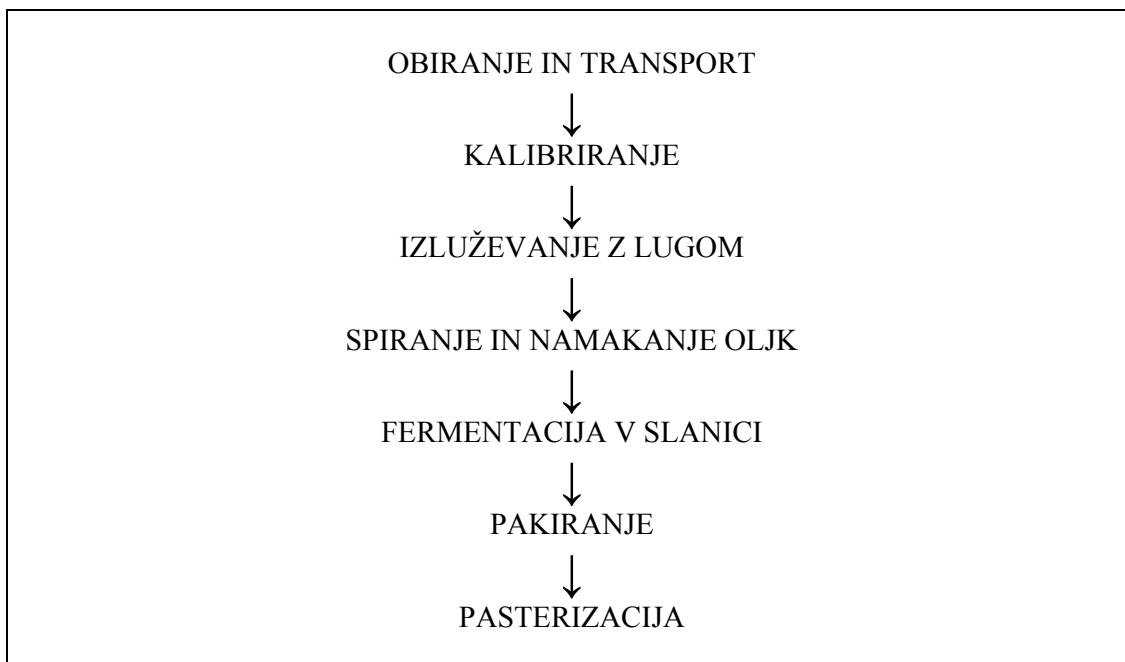
Fermentacija plodov v slanici poteka v treh glavnih stopnjah. Prva stopnja poteka 2-3 dni. Vrednost pH medija oziroma slanice je zaradi preostanka luga v plodovih bazičen (pH=9-11). V tej fazi se najprej razvijejo Gram-negativne anaerobne bakterije, ki ne sporulirajo, in aerobni mikroorganizmi. Razvije se ogljikov dioksid.

Razvijejo se naslednji mikroorganizmi, ki s svojim delovanjem znižujejo pH do približno 7: *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, *Flavobacterium diffusum* in *Aerochromobacter superficialis* (Fernández in sod., 1985). Hkrati se koncentracija slanice zniža iz začetnih 8-10 % (m/V) na 5 ali 6 % (m/V), predvsem zaradi osmoze med plodovi in slanico.

V drugi stopnji fermentacije se razvijejo in rastejo kvasovke in mlečnokislinske bakterije. Druga faza se začne tretji dan fermentacije (pH~7) in poteka do 10. ali 15. dneva (torej traja 7-12 dni). V tej stopnji potekajo homofermentativni in heterofermentativni procesi. Začetna mikrobna populacija se spremeni oziroma izumre. Mlečnokislinsko fermentacijo vodijo *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* in *Leuconostoc*. Na koncu druge stopnje fermentacije se pH slanice zniža na 5 ali 4,5.

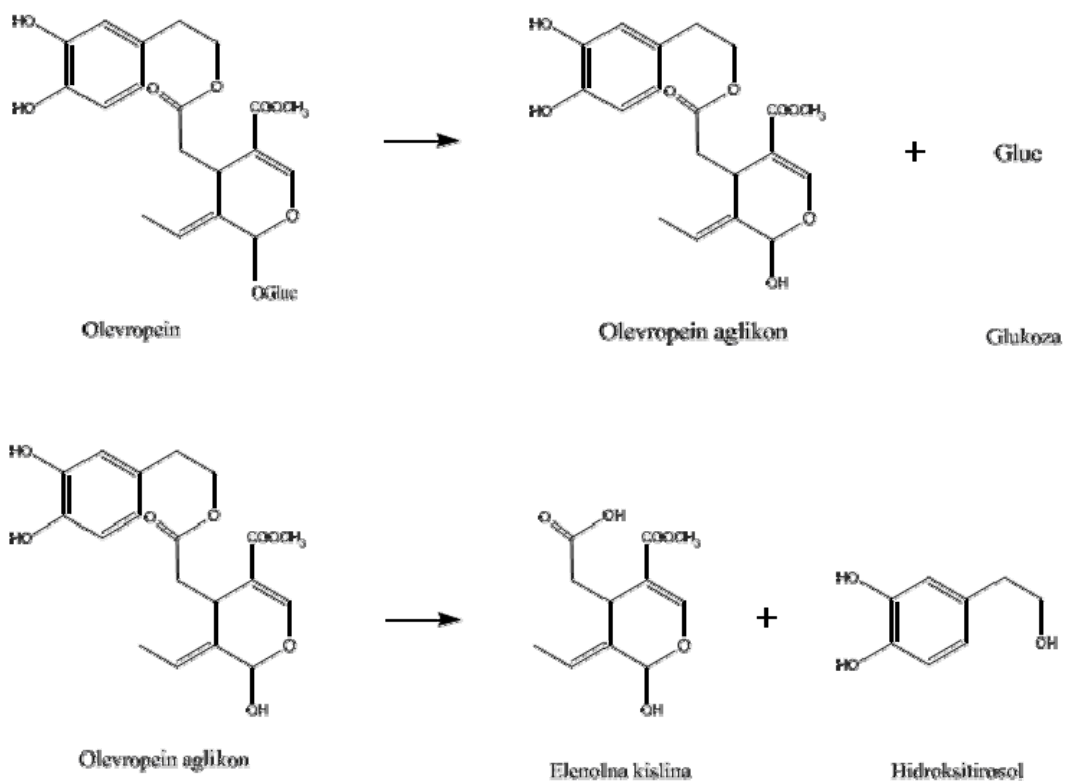
V tretji stopnji se fermentacija nadaljuje še vedno pod vplivom mlečnokislinskih bakterij. Vrednost pH se zniža na 3,5-4 in poveča se koncentracija mlečne kisline (3-10 g/L). Tretja stopnja lahko traja od 1 do 6 mesecev. Poleg mlečnokislinskih bakterij so prisotne tudi kvasovke *Hansenula anomala*, *Candida krusei* in *Saccharomyces chevalieri*. Na trajanje te faze vpliva veliko število dejavnikov: puferna kapaciteta slanice, preostanek hranil oziroma fermentabilnih substratov, temperatura, koncentracija slanice, pH in rod ali vrsta mlečnokislinskih bakterij. Na koncu fermentacije z vrsto *Lactobacillus plantarum* naj bi se tvorilo 0,8-1,5 % mlečne kisline (Brighigna, 1998).

Namizne oljke shranjujemo v isti (matični) slanici do pakiranja in prodaje. Spremljati moramo vrednost pH, koncentracijo in kislost slanice, saj bi se v nasprotnem primeru, na primer pri povišani temperaturi (poleti) lahko začela četrta faza fermentacije in s tem kvar namiznih oljk zaradi razvoja propionskih bakterij, ki znižujejo koncentracijo kislin in vodijo do negativnih senzoričnih sprememb (senzorična napaka imenovana zapateria). V primeru, da je prišlo do delne fermentacije in posledično do višjih vrednosti pH, moramo namizne oljke termično obdelati oziroma pasterizirati.



Slika 1: Shema španskega načina predelave namiznih oljk (Brighigna, 1998)

Fig. 1: Schematic review of Spanish style production technology of table olives (Brighigna, 1998)



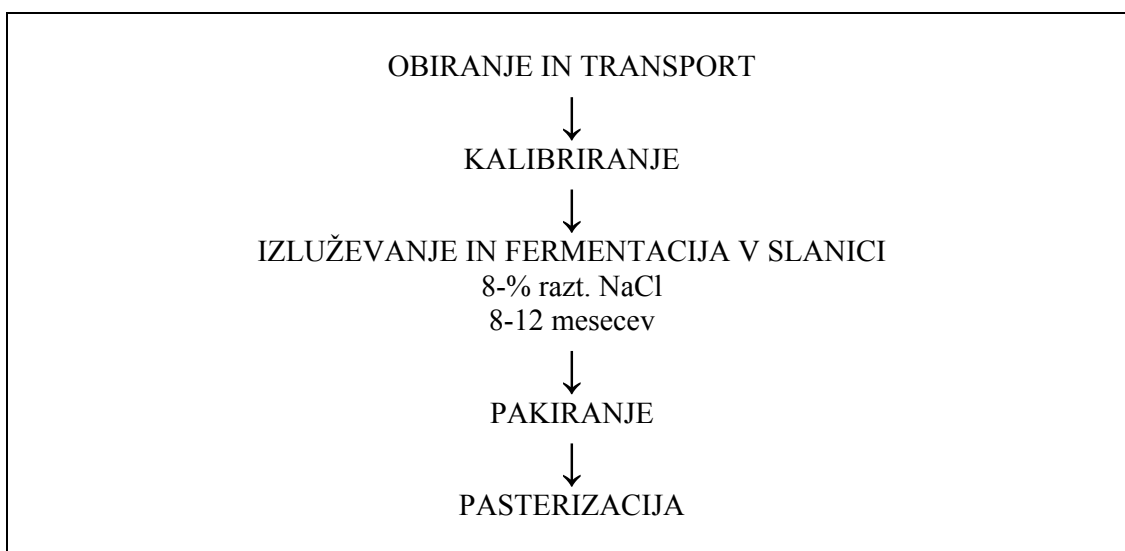
Slika 2: Hidroliza oleuropeina (Brighigna, 1998)

Fig. 2: Oleuropein hydrolysis (Brighigna, 1998)

2.1.2 Naravni ali grški način predelave namiznih oljk

Z grškim načinom ponavadi predelamo črne sorte oljk, sicer pa na tak način lahko pripravimo tudi zelene ali delno obarvane oljke. Oljke oberemo pred optimalno stopnjo zrelosti in sicer, ko je 2/3 mezokarpa obarvanega. Plodove učinkovito operemo pod tekočo vodo, da odstranimo ostanke prahu in morebitne nečistoče, ki lahko vplivajo na potek fermentacije. Nato plodove namakamo v 8-12 % (m/V) slanici. S tem postopkom izlužujemo oziroma razgrenimo in fermentiramo oljke 6-12 mesecev, odvisno od sorte, stopnje zrelosti, koncentracije slanice in temperature. Barva tako predelanih oljk je neenakomerna od vinsko rdeče do rjave nianse. Če plodove izpostavimo na zrak (2-4 dni), se izoblikuje bolj enakomerna rjava obarvanost (Brighigna, 1998).

V prvih 15-ih dneh fermentacije so prisotne Gram-negativne bakterije rodov *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Achromobacter*, *Aeromonas* in *Escherichia*, vendar naravni način fermentacije vodijo kvasovke. V 6-ih oziroma 12-ih mesecih ponavadi poteka alkoholna fermentacija. Garrido Fernández in sod. (2005) so ugotovili, da se razvijejo kvasovke *Saccharomyces oleaginosus*, *Pichia anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida diddensii*, *Candida boidinii*, *Candida krusei*, *Candida valida* in *Debaryomyces hansenii*.



Slika 3: Shema naravnega načina predelave namiznih oljk (Brighigna, 1998)

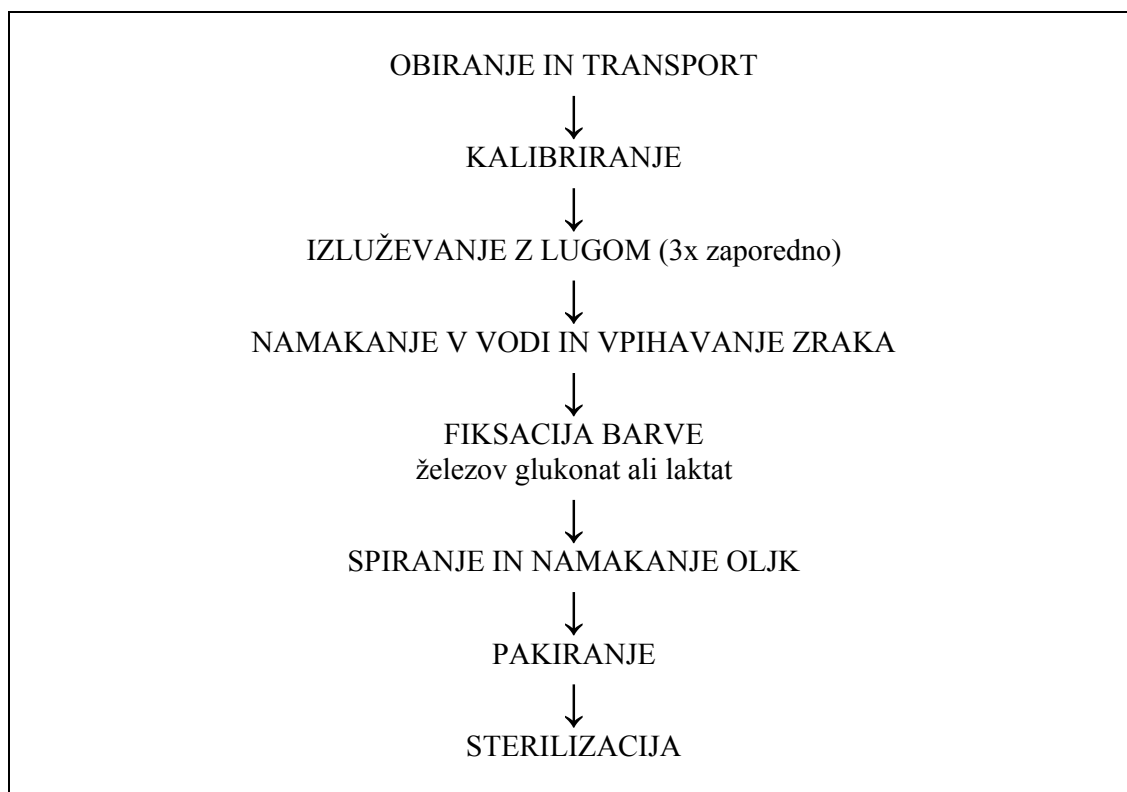
Fig. 3: Schematic review of natural style production technology of table olives (Brighigna, 1998)

Tudi zelene oljke lahko razgrenimo z naravnim načinom predelave v slanici. Pri tem se postavlja problem bakteriostatičnega vpliva olevropeina in njegovih razgradnih produktov na mlečnokislinske bakterije.

Lactobacillus plantarum ponavadi vodi mlečnokislinsko fermentacijo zelenih oljk, nekateri sevi pa lahko izkoristijo olevropein kot vir ogljika. Prva stopnja biološke razgradnje olevropeina poteka zaradi delovanja β -glukozidaze. Nato pa se olevropein aglikon hidrolizira do elenolne kisline in hidroksitirosola zaradi delovanja esteraz. Bolj poredko se pojavijo heterofermentativne mlečnokislinske bakterije rodov *Leuconostoc* in *Pediococcus*. Pojavijo se pri predelavi zelo zrelih plodov ali pri fermentaciji z vrsto *Lactobacillus plantarum* z nižjo koncentracijo slanice (pod 8 %) (Brighigna, 1998).

2.1.3 Kalifornijski način predelave namiznih oljk

Kalifornijski način uporabimo za predelavo zelenih in delno obarvanih oljk. Plodove trikrat zaporedno razgrenimo z 1-2 % lužino 2-4 ure. Prva lužina prodre skozi eksokarp (povrhnjico), druga skozi meso (mezokarp), tretja pa do koščice (endokarp). Med posameznimi fazami oljke izpostavimo na zrak za 24 ur ali jih prenesemo v drugo posodo z vodo, v katero vpihujemo zrak skozi cev, ki je pritrjena na dno rezervoarja. Zrak vpihujemo pod tlakom, kar povzroči premešanje plodov in postopno počrnenje oljk zaradi encimske oksidacije fenolnih spojin. Sodobni predelovalni industrijski postopek predvideva enkratno izluževanje oljk za 18-20 ur s hkratnim vpihavanjem zraka z dna rezervoarja. V vodo (ponavadi pri zadnjem izpiranju) dodamo 0,5-1 g/L železovega glukonata ali laktata in pustimo 8-12 ur. Tvorijo se stabilni kompleksi s fenolnimi spojinami, ki fiksirajo črno barvo. Sledi namakanje oziroma izpiranje namiznih oljk v vodi. Na koncu postopka preostanek železa ne sme preseči 150 mg/kg oljk. Tako predelane namizne oljke moramo sterilizirati pri 121 °C 30 min (Brighigna, 1998).



Slika 4: Shema kalifornijskega načina predelave namiznih oljk (Brighigna, 1998)

Fig. 4: Schematic review of Californian style production technology of table olives (Brighigna, 1998)

2.2 TRŽNI STANDARD IN ZNAČILNOSTI NAMIZNIH OLJK

Pogoji za zagotavljanje kakovostne predelave oljk v namizne oljke so opisani v zadnji dopolnjeni izdaji tržnega standarda Trade standard applying to table olives (COI/OT/NC no. 1, 2004), ki ga je leta 2004 izdal Mednarodni svet za oljke (IOC). Minimalne kakovostne zahteve so zajete tudi v standardu Codex alimentarius iz leta 1987 (CODEX STAN 66-1981, Rev. 1-1987). Tržni standard opredeljuje tip namiznih oljk (zelene, delno obarvane in črne) ter značilnosti plodov, kakovost, teksturo, barvo plodov, kalibriranje oziroma velikost plodov, značilnosti koščice in končni izgled izdelka. Zajeti so tudi različni načini predelave oljk (Trade standard applying to table olives, 2004) in osnovni parametri kakovosti.

Da postanejo oljke primerne za uživanje, jih moramo razgreniti oziroma hidrolizirati oleuropein in fermentirati. V ta namen lahko uporabimo, glede na recepturo in tehnološke značilnosti plodov, alkalije oziroma NaOH in vodo. Plodove lahko izlužujemo v slanici ali uporabimo starterske kulture za biološko razgradnjo biofenolov in fermentacijo namiznih oljk. Namizne oljke lahko hranimo v slanici, jih pasteuriziramo ali steriliziramo. Tržni standard (Trade standard..., 2004) dovoljuje pri shranjevanju namiznih oljk uporabo vode, soli, kisa, oljčnega olja, sladkorjev, začimb in dišav ter njihove ekstrakte in določene aditive.

Marsilio (2008) poroča, da so s tržnega in kakovostnega vidika pomembne naslednje značilnosti namiznih oljk:

- **Razmerje mezokarp/endokarp:** mora biti vsaj 3 pri črnih oljkah, kar pomeni, da je 75 % mezokarpa in 4 pri zelenih oljkah (80 % mezokarpa). Zaželjeno je razmerje mezokarp/endokarp večje od 5 ali 6 kar pomeni, da so plodovi zelo mesnati (več kot 85 % mezokarpa).
- **Kakovost mezokarpa:** ceni se fina struktura in kompaktnost mezokarpa. Pomembno je, da so plodovi primerne trdote in da se koščica zlahka loči od mezokarpa.
- **Konsistenca oz. trdota plodov:** pričakujemo določeno trdoto plodov. Namakanje dreves tik pred obiranjem plodov za predelavo v namizne oljke povzroči povečano turgidnost plodov, kar otežuje tehnološki proces predelave.
- **Barva plodov:** barva mora biti v skladu s pripadajočo tržno kategorijo. Zelena ali zeleno-svetlo rumena za zelene oljke, rožnata, delno rjava ali vinsko rdeča za delno obarvane plodove in enakomerno črna barva povrhnjice s črnim ali vinsko rdečim mezokarpom za črne oljke.
- **Koščica:** mora biti majhna z gladko površino.
- **Velikost in kalibriranje plodov:** pomembno je kalibriranje oziroma sortiranje plodov po velikosti, saj pakiramo skupaj plodove enakomerne velikosti.
- **Izgled:** plodovi morajo biti zdravi, nepoškodovani in nenagubani. Ne dopušča se prisotnost nečistoč.

Tržni standard (Trade standard..., 2004) opredeljuje **tržne vrste** namiznih oljk:

- Zelene oljke: plodovi obrani pred začetkom spremembe barve kožice, primerne velikosti.

- Delno obarvane oljke: plodovi obrani pred popolno zrelostjo, s spremenjeno barvo povrhnjice.
- Črne oljke: popolno zreli plodovi.

Zgoraj omenjene vrste namiznih oljk lahko pripravimo na različne **načine**.

- Obdelane oljke: plodove razgrenimo z lugom, sledi delna ali popolna fermentacija v slanici ter proizvod zakisamo po potrebi.
- Oljke predelane na naravni način: plodove se izlužuje v slanici, kjer se jih lahko delno ali popolnoma fermentira. Proizvod lahko zakisamo.
- Dehidrirane in/ali nagubane oljke: plodove razgrenimo z razredčenim lugom, hranimo v slanici ali dehidriramo s soljo in/ali termično obdelamo.
- Črne oksidirane oljke: zelene ali delno obarvane plodove fermentiramo v slanici, nato jih oksidiramo v alkalnem mediju in steriliziramo. Površina plodov mora biti enakomerno črna.
- Drugi posebni načini priprave: tržni standard (Trade standard..., 2004) dopušča še druge priprave namiznih oljk.

Namizne oljke prodajamo v primerni embalaži, ponavadi v neobarvanih steklenih kozarcih ali pa nepakirane v delikatesni prodaji. V prodaji so celi plodovi, ki so lahko delno stlačeni z nepoškodovano koščico ali podolžno zarezani in razkoščičeni plodovi. Razkoščičene oljke se prodaja cele, razpolovljene, razrezane na četrtine ali na rezine in sesekljane ter vložene. Za nadev se uporablja papriko, čebulo, mandlje, zeleno, korenje, kapre, sardine, limono, itd. in druge pripravljene mase.

Namizne oljke lahko hranimo v slanici, pasteriziramo ali steriliziramo v skladu s parametri termične obdelave, ki so prikazani v preglednici 3. Za konzerviranje je dovoljena uporaba kisa, olja in drugih dovoljenih konzervansov. Tržni standard dopušča oziroma dovoljuje uporabo vode, soli, kisa, oljčnega olja, sladkorjev, začimb in dišav ter njihove ekstrakte in aditive. V preglednici 2 so podani aditivi in konzervansi, ki se lahko uporabljajo pri predelavi in shranjevanju namiznih oljk.

V preglednici 1 so podane minimalne zahteve fizikalnokemijskih parametrov pakiranih namiznih oljk, ki zagotavljajo stabilnost in varnost izdelka. V primeru, da v obdelane oljke dodamo aditive (konzervanse) in jih shranjujemo v hladilniku, lahko zmanjšamo koncentracijo soli (NaCl) na 4 % in mlečne kisline na 0,4 %, če pa izdelek pasteriziramo ali steriliziramo, se dopušča višja vrednost pH (4,3). Koncentracija soli v dehidriranih in/ali nagubanih oljkah pa mora biti 10 %. Namizne oljke moramo pripraviti po načelu dobre proizvodne prakse.

Preglednica 1: Parametri kakovosti namiznih oljk (Trade standard..., 2004)

Table 1: Table olives quality parameters (Trade standard..., 2004)

Način priprave namiznih oljk	Min. NaCl (%)	Max. vrednost pH	Min. mlečne kisline (%)
Obdelane oljke	5	4,0	0,5
Naravne oljke	6	4,3	0,3

Preglednica 2: Aditivi in tehnološka pomagala pri predelavi namiznih oljk (Trade standard..., 2004)
Table 2: Additives and processing aids for table olives processing (Trade standard..., 2004)

	Max. koncentracija
Konzervansi	
- benzojska kislina in njene soli (benzoati)	1 g/kg
- sorbinska kislina in njene soli (sorbati)	0,5 g/kg
Kislina	
- mlečna kislina	15 g/kg
- citronska kislina	15 g/kg
- L-vinska kislina	15 g/kg
- očetna kislina	omejena glede na DPP
Antioksidanti	
- L-askorbinska kislina	omejena glede na DPP
Stabilizatorji	
- železov glukonat	0,15 g/kg (kot celokupno Fe)
- železov laktat	0,15 g/kg (kot celokupno Fe)
Arome	
- dovoljena je uporaba naravnih arom, ki jih definira Codex alimentarius	omejena glede na DPP
Ojačevalci arome	
- natrijev glutamat	5 g/kg
- drugi dovoljeni ojačevalci (Codex alimentarius)	
Ojačevalci trdote	
- kalcijev klorid	omejena glede na DPP
- kalcijev laktat	omejena glede na DPP
- kalcijev citrat	omejena glede na DPP
Zgoščevalci in gelirna sredstva	
- primerni za živilsko uporabo, ki jih predvideva Codex alimentarius za to živilo	omejena glede na DPP
Drugi aditivi	
- dovoljuje se uporaba drugih aditivov, ki jih predvideva Codex alimentarius za to živilo	omejena glede na DPP
Tehnološka pomagala	
- mlečnokislinske bakterije	omejena glede na DPP
- dušik	omejena glede na DPP
- ogljikov dioksid	omejena glede na DPP
- manganov laktat	omejena glede na DPP
- manganov glukonat	omejena glede na DPP
- natrijev ali kalijev hidroksid	omejena glede na DPP
- klorovodikova kislina	omejena glede na DPP

Preglednica 3: Parametri termične obdelave namiznih oljk (Trade standard..., 2004)
Table 3: Thermal treatment of table olives (Trade standard..., 2004)

Način priprave	Minimalni pogoji termične obdelave	
	$PU_{62,4}^{5,25}$ °C	F_{0121}^{10} °C
	Pasterizacija	Sterilizacija
Obdelane oljke	15	-
Naravna priprava	15	-
Dehidrirane in /ali nagubane oljke	15	-
Črne oksidirane oljke	-	15

Na podlagi ugotovljenih napak in dovoljenih toleranc oziroma odstopanj razvrščamo namizne oljke v tri kakovostne kategorije.

- V kategorijo **ekstra** uvrščamo namizne oljke višje kakovosti s poudarjenimi sortnimi in tehnološkimi značilnostmi. Dopuščajo se le rahle napake barve, oblike, povrhnjice in konsistence, ki ne vplivajo niti na celoten izgled niti na senzorične značilnosti namiznih oljk. V to kategorijo uvrščamo cele oljke, zarezane, razkoščičene in vložene namizne oljke velikosti nad 351/380.
- V **prvo** kategorijo (**I**) uvrščamo namizne oljke dobre kakovosti obrane ob primerni stopnji zrelosti s tipičnimi sortnimi in tehnološkimi značilnostmi. Dopuščajo se le rahle napake barve, oblike, povrhnjice in konsistence, ki ne vplivajo niti na celoten izgled niti na senzorične značilnosti. V kategorijo uvrščamo vse možne vrste oljk, ne glede na način priprave in način pakiranja oz. prodaje z izjemo sesekljanih in poškodovanih oljk ter namaza iz zmletih oljk.
- V **drugo** kategorijo (**II**) uvrščamo namizne oljke dobre kakovosti, ki izpolnjujejo zahtevane kriterije v skladu s tržnim standardom in ki jih ne moremo razvrstiti v prvi dve kategoriji.

Napake, ki jih določamo:

- prisotnost pecljev ali listov ter večjega neenakomernega razbarvanja oziroma madeža na plodovih;
- poškodovane in nagubane plodove neprimerne konsistence in barve;
- prisotnost delcev koščic in napake nadeva pri vloženi oljkah.

Za posamezno kategorijo se dopuščajo napake oziroma tolerance v naslednjih odstotkih: 12 % za 'ekstra', 17 % za 'prvo' in 22 % za 'drugo' kategorijo. Pred pakiranjem je potrebno plodove kalibrirati oziroma razvrstiti glede na število plodov na kilogram namiznih oljk, kot je prikazano v preglednici 4.

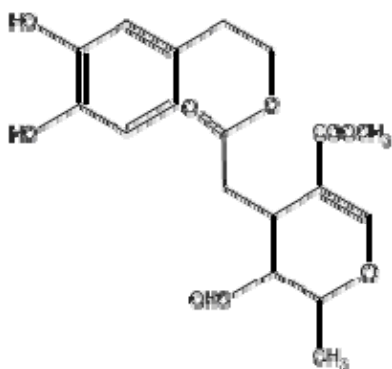
Preglednica 4: Kalibriranje plodov pred predelavo in namiznih oljk (Trade standard..., 2004)
Table 4: Olive fruits and table olives calibration (Trade standard..., 2004)

Število plodov pred predelavo in namiznih oljk/kg oljk		
60/70	121/140	201/230
71/80	141/160	231/260
81/90	161/180	261/290
91/100	181/200	291/320
101/110		321/350
111/120		351/380
		381/410*

*nad 410 je razlika za 50 plodov

2.3 BIOFENOLI V PLODU OLJKE IN V NAMIZNIH OLJKAH

Biofenoli oljke (*Olea europaea* L.) so sekundarni metaboliti, naravno prisotni antioksidanti, ki ščitijo plodove, oljčno olje in namizne oljke pred oksidacijo. Vplivajo tudi na grenak okus namiznih oljk in prispevajo k pikantnosti pridobljenega deviškega oljčnega olja. Biofenoli so lahko enostavne substituirane spojine z majhno molekulsko maso, ki imajo na aromatskem obroču vezano eno ali več hidroksilnih skupin, lahko pa so tudi kompleksnejše strukture vezane na monoterpene. V strukturi biofenolov, ki so prisotni v plodovih oljke, je več funkcionalnih skupin. Hidroksitirosol je predstavnik enostavnih biofenolov, za katere je značilno, da vključujejo hidroksilno ali aldehidno ali karboksilno skupino. Monoterpenska enota in/ali glukozidna enota sta lahko vezani v kompleksnejšo biomolekulo biofenolov, kot na primer pri olevropeinu in hidroksitirosilelenolatu (Bianco in Uccella, 2000).

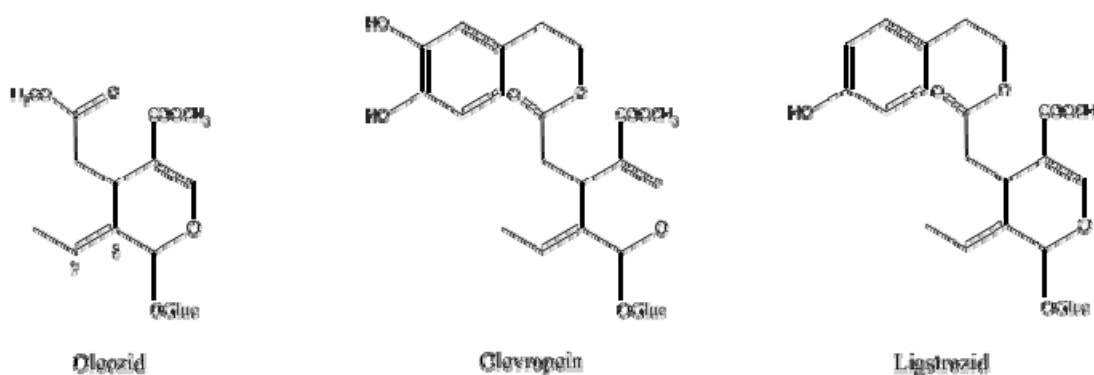


Slika 5: Strukturna formula hidroksitirosilelenolata (Bianco in Uccella, 2000)

Fig. 5: Structure of hydroxytyrosylelenolate (Bianco and Uccella, 2000)

Oljka (*Olea europaea* L.) spada v družino *Oleaceae*, v kateri se pojavljajo spojine podobne kumarinom, to so sekoiridoidi (Jensen in sod., 2002). Sekoiridoidi so tesno povezani z iridoidi, ki so podskupina monoterpenov. Za sekoiridoide je značilna eksociklična dvojna

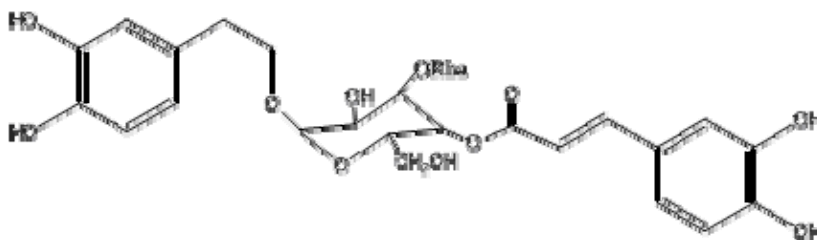
vez na položaju 8,9- oziroma oleozid (slika 6), značilen za rastline iz družine *Oleaceae* (Ryan in sod., 2002). Značilna oleozida sta olevropein, ki je ester elenolne kisline in 2-(3,4-dihidroksifenil)etanola (3,4-DHPEA) in ligstrozid, ki je ester elenolne kisline in 2-(4-hidroksifenil)etanola (*p*-HPEA). Strukturne formule oleozida, olevropeina in ligstrozida so prikazane na sliki 6.



Slika 6: Strukturne formule oleozida, olevropeina in ligstrozida (Ryan in sod., 2002)

Fig. 6: Structure of oleoside, oleuropein and ligstroside (Ryan et al., 2002)

Olevropein, demetilolevropein, ligstrozid in oleozid predstavljajo glavne fenolne oleozide v oljki, medtem ko je verbaskozid (slika 7) glavni derivat hidroksicinamata. V oljki so prisotni tudi tirozol, hidroksitirozol, ferulna in galna kislina.



Slika 7: Strukturna formula verbaskozida (Ryan in sod., 2002)

Fig. 7: Structure of verbascoside (Ryan in sod., 2002)

Sestava sekundarnih metabolitov se razlikuje tako v različnih delih rastline kot v samem plodu oljke. Znano je, da je nuzhenid prisoten izključno v endokarpu, luteolin-7-glukozid in rutin pa sta v lupini plodov oziroma eksokarpu (Silva in sod., 2006). Medtem ko so bili verbaskozid, olevropein, in demetilolevropein določeni v celotnem plodu, je koncentracija olevropeina in demetilolevropeina večja v mezokarpu (Bianco in Uccella, 2000).

Plodovi oljke vsebujejo tudi enostavne fenolne spojine (na primer kavno kislino), derivate kumarne kisline, fenolne glukozide, fenolne oleozide in flavonoide, kot na primer luteolin, luteolin rutinozid in luteolin glukozid ter apigenin glukozid in rutin (Luque de Castro in Japón-Luján, 2006).

Blekas in sod. (2002) so ugotovili, da so nekateri biofenoli topni v citoplazmi, kot na primer enostavni, kompleksni in esterificirani biofenoli. Našli so tudi netopne biofenole, vezane na celično steno plodov. Pri pripravi končnega izdelka - namiznih oljk - se topni biofenoli delno izlužijo, medtem ko biofenoli, ki so vezani na celično steno, prispevajo k teksturi namiznih oljk.

2.3.1 Biofenoli v namiznih oljkah

Znano je, da so oljke vir antioksidantov. Postopki predelave oziroma izluževanja grenkih snovi za pripravo končnega izdelka oziroma namiznih oljk zmanjšajo vsebnost le-teh.

Blekas in sod. (2002) so ugotovili, da hidroksitirozol, tirozol in luteolin prevladujejo v namiznih oljkah. Največ hidroksitirozola so določili v oljkah predelanih iz grške črne sorte Kalamata in iz zelenih oljk sorte Chalkidiki (250-760 mg/kg). V namiznih oljkah je pomembna tudi vsebnost sekoroida oleuropeina, ki ga sestavljata oleozid-11-metilni ester in hidroksitirozol in daje grenek okus namiznim oljkam. V namiznih oljkah so prisotni tudi derivati oleuropeina, to so oleuropein aglikon, demetiloleuropein, hidroksitirozol glukozid in hidroksitirozol.

Blekas in sod. (2002) so v namiznih oljkah določili tudi derivata tirozola, to sta tirozol 1-*O*-glukozid in ligstrozid, fenolna spojina zelo podobna oleuropeinu.

Nepredelane oljke vsebujejo tudi 3,4-dihidroksifenilglikol, antocianine, flavonoide in fenolne kisline. Prevladujoča antocianina sta cianidin 3-*O*-glukozid in cianidin 3-*O*-rutinozid. Nepredelane oljke vsebujejo tudi flavonoida kvercetin 3-*O*-glukozida (rutin) in luteolin 7-*O*-glukozida. V mezokarpu plodov so določili tudi vsebnost hidroksibenzoata, hidroksicinamata, hidroksifenilacetata in hidroksikafeata. V znatnih količinah so našli kavno in *p*-kumarno kislino.

Romero in sod. (2004) poročajo, da sta hidroksitirozol in tirozol glavna biofenola, ki sta prisotna tako v vodni fazi plodov kot v olju. Tirozol acetat, hidroksitirozol acetat in lignani (1-acetoksinorezinol in pinorezinol) pa prevladujejo v olju oziroma v lipidni fazi plodov namiznih oljk. Pri delno obarvanih plodovih, hranjenih v slanici, je bila določena največja vsebnost skupnih biofenolov (1200 mg/kg), medtem ko so pri oksidiranih oljkah določili le 200 mg/kg. Vsebnost oleuropeina se postopno zmanjšuje v plodovih oljk s stopnjo dozorelosti in z namakanjem oljke (rastline). Hkrati pa se povečuje koncentracija hidroksitirozol glukozida, ki prevladuje v črnih dozorelih plodovih. Avtorji navajajo, da so v plodovih oljk določili tudi naslednje fenolne spojine: verbaskozid, ligstrozid, salidrozd, rutin, luteolin-7-glukozid, ter antocianina cianidin-3-glukozid in cianidin-3-rutinozid. Ugotovili so, da je za vsako sorto oljk značilen določen biofenolni profil oziroma določena sestava biofenolov.

Pri pregledu literature smo ugotovili, da se raziskovalci poslužujejo različnih metod za ekstrakcijo biofenolov iz namiznih oljk. Najbolj pogoste metode temeljijo na ekstrakciji trdno-tekoče z mešanico metanola in vode (80:20, v/v) kot poročajo Silva in sod. (2006), Morelló in sod. (2005), Marsilio in sod. (2005), Damak in sod. (2008), Bouaziz in sod. (2004), Gomez-Rico in sod. (2008), Savarese in sod. (2007) in Malik in Bradford (2006). Obied in sod. (2007) so ekstrahirali biofenole v metanolu in vodi v razmerju 60:40 (v/v), Kalua in sod. (2005) in McDonald in sod. (2001) pa v mešanici metanola in vode (50:50,

v/v). Iz pregleda literature je razvidno, da je učinkovita tudi ekstrakcija biofenolov v 100 % metanolu, o tej metodi poročajo Vinha in sod. (2005), Bianco in sod. (2003), Bouaziz in sod. (2004), Sousa in sod. (2006), Boskou in sod. (2006) in Pereira in sod. (2006).

2.3.2 Biosinteza fenolnih spojin v oljkah

Sekundarni metaboliti v oljkah se sintetizirajo po različnih poteh. Iz fosfoenolpiruvata se po šikimat/arogenatni poti sintetizira fenilalanin. Iz slednjega pa se po fenilalanin/hidroksicinamatni poti, preko 4-kumarata, sintetizirajo fenilpropanoidi (kafeat, ferulat, sinapat). Regulacijski encim je PAL (fenilalanin-amonia-liaza) (Ryan in sod., 2002).

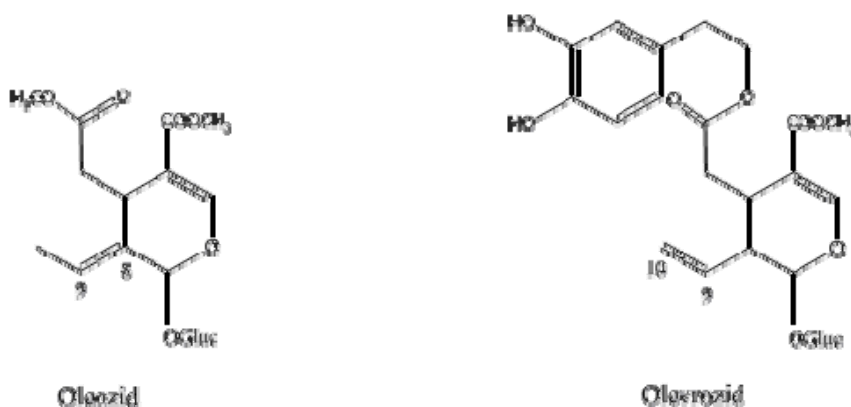
Biosinteza flavonoidov se začne iz acetyl-CoA preko malonil-CoA, ki se kondenzira s 4-kumaroil-CoA. Nastali produkt naringenin kalkan je prekursor za nastanek flavonoidov (Ryan in sod., 2002).

Plodovi oljke vsebujejo največ biofenolov sekoiridoidnega tipa: olevropein, ligstrozid, oleozid in razpadne produkte olevropein aglikon, dialdehidno obliko olevropein aglikona, tirosol, hidroksitirosol. Ryan in sod. (2002) poročajo, da acetat/mevalonatna pot vodi do biosinteze sekoiridoidov, kot je prikazano z naslednjimi reakcijami. Regulacijski encim je HMG-CoA reduktaza.

AcetylCoA → acetoacetylCoA → mevalonat → 10-hidroksigeraniol → iridodial → loganin → aglikon deksiloganske kisline → deksiloganska kislina.

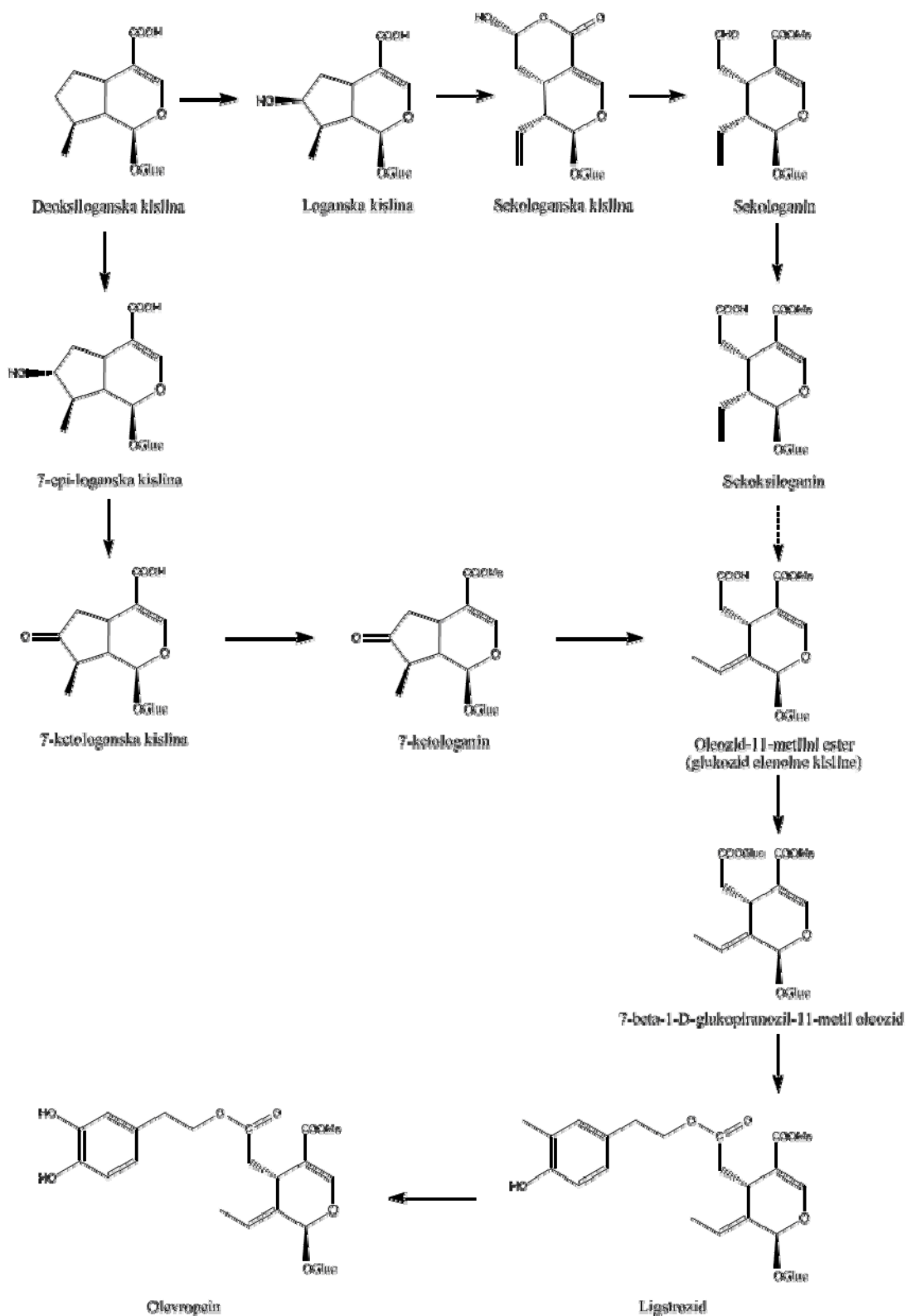
Ryan in sod. (2002) poročajo, da se olevropein sintetizira iz deksiloganske kisline preko 7-ketologanina in glukozida elenolne kisline (oleozid-11-metilni ester), kot je prikazano na sliki 9.

Biosinteza izomerne oblike olevropeina, olevrozida (slika 8), ki je bil določen v listih oljke, poteka preko sekoiloganske kisline in sekoisiloganina. Od te stopnje dalje še niso dokončno znani intermediati biosinteze (Ryan in sod., 2002). Olevropein in olevrozid se razlikujeta glede na položaj dvojne vezi – med 9. in 10. eksocikličnim ogljikom pri olevrozidu.



Slika 8: Strukturni formuli oleozida in olevrozida (Ryan in sod., 2002)

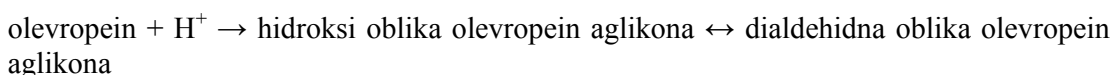
Fig. 8: Structure of oleoside and oleuroside (Ryan et al., 2002)



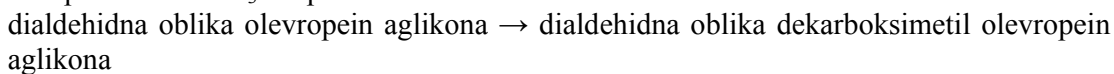
Slika 9: Biosinteza oleuropeina (Ryan in sod., 2002)
 Fig. 9: Biosynthesis of oleuropein (Ryan et al., 2002)

Razgradnja oleuropeina :

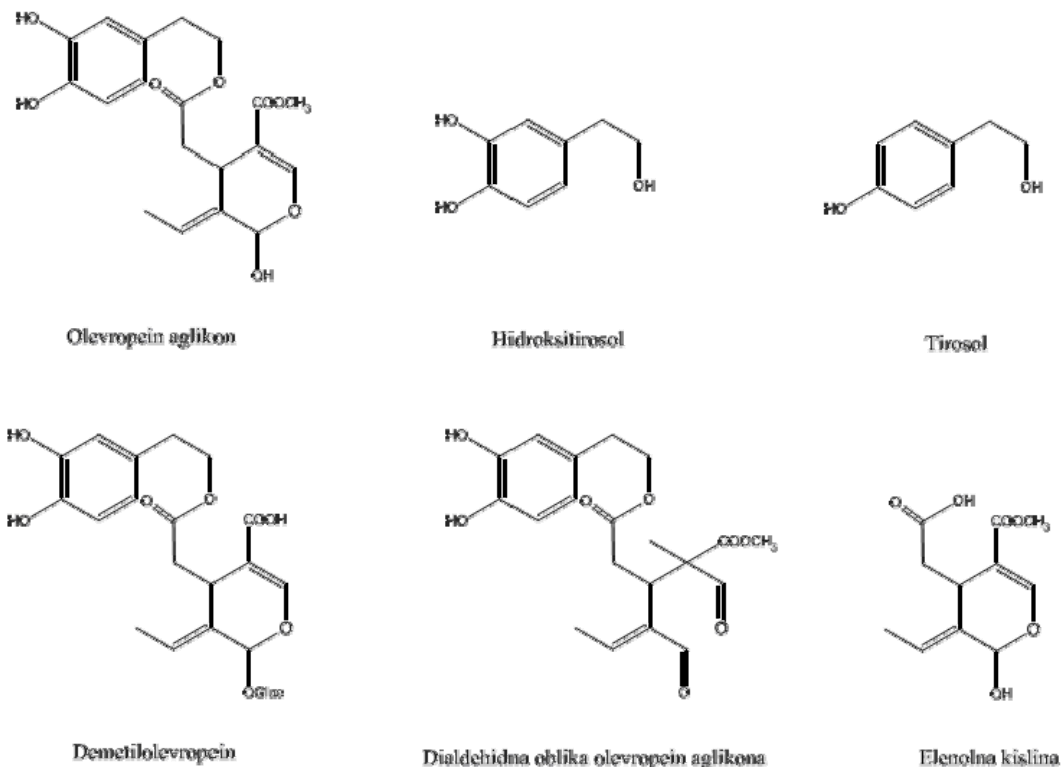
Oleuropein je ester hidroksitirosola, elenolne kisline in β -D-glukopiranoze. Z manjšanjem koncentracije oleuropeina se pri dozorevanju hkrati povečuje koncentracija oziroma se kopičita hidroksitirosol in glukozid elenolne kisline. Encimska hidroliza oleuropeina poteka pod vplivom β -glukozidaze. Nastali oleuropein aglikon se izomerizira preko dialdehidne oblike. Sledi razgradnja do hidroksitirosola in elenolne kisline (Ryan in sod., 2002).



odcepitev $-\text{COOCH}_3$ skupine:



Razgradni produkti oziroma derivati oleuropeina so oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA), demetiloleuropein, dialdehidna oblika oleuropein aglikona (3,4-DHPEA-EDA), tirosol (p-HPEA), hidroksitirosol (3,4-DHPEA) in elenolna kislina.



Slika 10: Strukturne formule razgradnih produktov oleuropeina (Ryan in sod., 2002)

Fig. 10: Structures of oleuropein derivatives (Ryan et al., 2002)

2.4 VLOGA KVASOVK PRI FERMENTACIJI NAMIZNIH OLJK

V preglednem članku Arroyo López in sod. (2008) obravnavajo vlogo kvasovk pri fermentaciji namiznih oljk. Ugotovili so, da kvasovke pozitivno vplivajo na potek fermentacije in s svojimi metaboliti prispevajo k izoblikovanju senzoričnih značilnosti namiznih oljk. Vendar lahko delujejo tudi kot tehnološki kvarljivci pri fermentaciji in shranjevanju namiznih oljk. *Candida boidinii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula glutinis* in *Saccharomyces cerevisiae* so najbolj pogosto izolirane vrste kvasovk iz namiznih oljk. Stratford (2006) navaja, da več vrst kvasovk, predvsem pa rod *Saccharomyces* povzročata kvar fermentiranih živil in pijač z nizkim pH, visoko koncentracijo soli in med skladiščenjem pri nizkih temperaturah. Ravno namizne oljke so primer opisanega živila.

Mrak in sod. (1956, cit. po Arroyo López in sod., 2008) so identificirali kvasovke vrste *Candida krusei*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *Pichia membranifaciens* in *Rhodotorula glutinis* iz zelenih namiznih oljk fermentiranih in skladiščenih v ZDA. González Cancho (1965, 1966a, 1966b, cit. po Arroyo López in sod., 2008) je identificiral kvasovke rodu *Candida* (*C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *C. rugosa*), *Pichia* (*P. anomala*, *P. membranifaciens*) ter *Saccharomyces cerevisiae* iz zelenih oljk, fermentiranih na španski način. V vzorcih zelenih in delno obarvanih namiznih oljk fermentiranih oziroma predelanih le v slanici so raziskovalci ugotovili prisotnost rodov *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* in *Saccharomyces* (Pelegatti, 1978, cit. po Arroyo López in sod., 2008; Marquina in sod., 1992). Balatsouras (1967, cit. po Arroyo López in sod., 2008) je identificiral kvasovke iz grških namiznih oljk, ki so bile predelane na naravni oziroma grški način. V vzorcih je ugotovil prisotnost rodov *Trichosporon*, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Torulopsis* in *Debaryomyces*. Kvasovke rodu *Debaryomyces* so bile potrjene tudi v namiznih oljkah turškega porekla (Borcakli in sod., 1993).

González Cancho in sod. (1975, cit. po Arroyo López in sod., 2008) so ugotovili, da v črnih oljkah španskega porekla in fermentiranih na naravni način vodita fermentacijo *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia anomala*. Durán Quintana in sod. (1986) navajajo, da v primeru, ko so omenjene namizne oljke fermentirali v aerobnih pogojih oziroma v prisotnosti zraka, so identificirali tudi vrste *Candida saitoana*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens* in *Williopsis saturnus* var. *mrakii*. Vrste *Torulopsis delbrueckii*, *D. hansenii* in *Cryptococcus laurentii* prevladujejo v črnih oljkah grškega porekla (Kotzekidou, 1997), medtem ko so v namiznih oljkah iz Maroka identificirali kvasovke *C. boidinii*, *P. membranifaciens* in *T. delbrueckii* (Marquina in sod., 1997). Pri predelavi zelenih namiznih oljk portugalskega porekla so Hernández in sod. (2007) ugotovili, da vodijo fermentacijo oljk kvasovke *Pichia anomala*, *Kluyveromyces marxianus* in *Saccharomyces cerevisiae*.

Arroyo López in sod. (2006) so z uporabo molekularnih metod identificirali vrste *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia occidentalis* in *Geotrichum candidum* iz zelenih namiznih oljk ter vrsti *Candida boidinii* in *Hanseniaspora guilliermondii* iz črnih namiznih oljk. Coton in sod. (2006) je z isto metodo uspel identificirati vrste *Pichia anomala*, *Candida boidinii* in *Debaryomyces etchellsii* iz črnih namiznih oljk francoskega porekla. Hurtado in sod. (2008) so ugotovili prisotnost *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida membranifaciens*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kluyveri* in *Rhodotorula glutinis* pri fermentaciji španskih namiznih oljk sorte Arbequina.

Arroyo López in sod. (2008) navajajo, da so vrste *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *P. anomala* in *R. glutinis* prisotne v vseh namiznih oljkah ne glede na način fermentacije, medtem ko so vrsto *C. boidinii* uspeli izolirati iz oljk, fermentiranih neposredno v slanici. Avtorji navajajo, da so vrsto *D. hansenii* izolirali iz namiznih oljk, ki so bile predelane v bolj koncentrirani slanici.

2.4.1 Biokemijske značilnosti kvasovk

Mlečnokislinske bakterije vodijo fermentacijo zelenih oljk, ki so predelane na španski način. Garrido Fernández in sod. (1997) navajajo, da so kvasovke vselej prisotne, ugotovili so populacijo kvasovk od 4 do 6 log CFU mL⁻¹. Avtorji navajajo, da so mlečnokislinske bakterije vrste *Lactobacillus plantarum* in *Lactobacillus pentosus* pomembne pri sintezi mlečne kisline, le-ta končni izdelek stabilizira in prispeva k senzoričnim značilnostim zelenih namiznih oljk. V primeru, da v namiznih oljkah ne dosežemo dovolj nizke vrednosti pH (pH<4,5) obstaja možnost, da se razvijejo Gram-negativne bakterije in tveganje za kaljenje spor Gram-pozitivne bakterije *Clostridium botulinum* (Nout, 1994, cit. po Arroyo López in sod., 2008). V primeru, da prevladujejo kvasovke nad mlečnokislinskimi bakterijami, so senzorične značilnosti namiznih oljk manj intenzivne, zmanjša se tudi stabilnost končnega izdelka.

Fernández Díez in sod. (1985) poročajo, da prekomerna rast kvasovk (>7 log CFU mL⁻¹) lahko tvori preveč CO₂, ki vdre v plodove in jih poškoduje. Durán Quintana in sod. (1979) so v omenjenem primeru identificirali vrsti *S. cerevisiae* in *P. anomala*, in sicer v črnih namiznih oljkah. Raziskovalci so ugotovili, da v slanici z večjo vsebnostjo soli (nad 8 %) prevladujejo kvasovke nad mlečnokislinskimi bakterijami (Garrido Fernández in sod., 1997; Tassou in sod., 2002).

Garrido in sod. (1995) ter Garrido Fernández in sod. (1997) poročajo o pozitivni vlogi kvasovk pri sintezi etanola, glicerola, višjih alkoholov, estrov in drugih hlapnih snovi, ki prispevajo k izoblikovanju arome in teksture fermentiranih živilih. Pri fermentaciji namiznih oljk so ugotovili prisotnost očetne, jantarne in mravljične kisline ter etanola (Sánchez in sod., 2000). Tudi Montaño in sod. (2003) so pri industrijski predelavi zelenih namiznih oljk ugotovili večje vsebnosti etanola, metanola in očetne kisline ter manjšo vsebnost acetaldehida. Vendar Arroyo López in sod. (2008) navajajo, da niso uspeli povezati prisotnosti naštetih organskih spojin z rastjo določenega seva kvasovk.

Hernández in sod. (2007) so raziskovali esterazno in lipazno aktivnost kvasovk, ki so jih izolirali iz zelenih namiznih oljk. V večini primerov sevov so ugotovili esterazno aktivnost, medtem ko so zaradi delovanja lipaze ugotovili povečano vsebnost prostih maščobnih kislin v namiznih oljkah.

Sekundarni metaboliti kvasovk so pomembni zaradi antioksidativnega delovanja. Abbas (2006) je ugotovil, da določeni sevi rodov *Candida* in *Saccharomyces* lahko sintetizirajo karotenoide, citronsko kislino, glutation in tokoferole, ki so pomembni antioksidanti.

Kvasovke so zelo pomembne pri fermentaciji črnih oljk na naravni način. Z omenjeno tehnologijo oljke fermentirajo neposredno v slanici, brez predhodnega razgrenjevanja z lugom. V tem primeru naravno prisotni biofenoli inhibirajo razvoj mlečnokislinskih

bakterij. Arroyo López in sod. (2008) navajajo, da se populacija kvasovk med fermentacijo namnoži od 4 do 7 log CFU mL⁻¹.

2.4.2 Interakcija kvasovk in mlečnokislinskih bakterij

Arroyo López in sod. (2008) navajajo, da kvasovke lahko pospešijo rast in razvoj mlečnokislinskih bakterij. Tsapatsaris in Kotzekidou (2004) sta ugotovila, da 48 urna inokulacija kvasovke *D. hansenii* pospeši rast bakterije *L. plantarum*, ravno tako so Segovia Bravo in sod. (2007) pri predelavi zelenih namiznih oljk ugotovili povečano rast *L. pentosus* ob prisotnosti *S. cerevisiae* in posledično večjo sintezo mlečne kisline. Kvasovke so ključnega pomena pri sintezi vitaminov (na primer tiamina, piridoksina, nikotinske in pantotenske kisline), aminokislin in purinov ter pri razgradnji kompleksnih ogljikovih hidratov, saj na tak način vzpostavijo nujne oziroma osnovne pogoje za rast mlečnokislinskih bakterij (Viljoen, 2006). Mlečnokislinske bakterije pa sintetizirajo mlečno kislino, ki znižuje pH slanice namiznih oljk in s tem preprečuje rast in razvoj nezaželenih enterobakterij in klostridijev.

Sánchez in sod. (2001) so proučevali vpliv starterske kulture mlečnokislinskih bakterij na potek fermentacije zelenih namiznih oljk na španski način. Zelene oljke sorte 'Manzanilla' so razgrenili z lugom in ostanke le tega odstranili s spiranjem in namakanjem oljk v vodi. Nato so namizne oljke fermentirali v 10 % slanici ter dodali startersko kulturo mlečnokislinskih bakterij vrste *Lactobacillus pentosus* (8 log CFU mL⁻¹). Avtorji poročajo, da so mlečnokislinske bakterije kljub visoki vrednosti pH slanice (pH nad 9) pospešile fermentacijski proces in s tem posledično zmanjšale možnost kontaminacije namiznih oljk z enterobakterijami. Enterobakterije pa lahko v začetnih dneh fermentacije zaradi sinteze plina posredno poškodujejo strukturo oziroma teksturo namiznih oljk in vodijo nepravilno fermentacijo oljk (na primer masleno fermentacijo) ter s tem poslabšajo kakovost in povzročijo kvar namiznih oljk. Leal-Sánchez in sod. (2003) so ugotovili, da inokulum mlečnokislinskih bakterij *Lactobacillus plantarum* (≥ 7 log CFU mL⁻¹) ugodno vpliva na potek fermentacije zelenih namiznih oljk, ki so jih predelali iz sorte 'Manzanilla' na španski način. Ugotovili so tudi, da dodatek starterske kulture mlečnokislinskih bakterij pozitivno vpliva na rast in razvoj naravno prisotne populacije kvasovk.

Hurtado in sod. (2009) so proučili vpliv stopnje zrelosti plodov in koncentracije soli na razvoj mikroorganizmov pri predelavi namiznih oljk iz sorte 'Arbequina'. Izolirali so rodove *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida* in *Cryptococcus*. Ugotovili so, da se v primerjavi z delno obarvanimi in črnimi namiznimi oljkami mlečnokislinske bakterije pojavijo v zelenih namiznih oljkah (zgodnje obrani plodovi sorte 'Arbequina') 10 dni kasneje. Mlečnokislinske bakterije so določili v vzorcih zelenih namiznih oljk po 14-ih dneh fermentacije v zelo nizki koncentraciji (1 log CFU mL⁻¹), kvasovke pa so se razvile že po treh dneh fermentacije (1 log CFU mL⁻¹). Avtorji so pri fermentaciji delno obarvanih plodov po sedmih dneh fermentacije ugotovili prisotnost mlečnokislinskih bakterij (5 log CFU mL⁻¹) in kvasovk (3 log CFU mL⁻¹). V vzorcih namiznih oljk, ki so jih predelali iz popolnoma zrelih plodov, so mlečnokislinske bakterije določili po sedmih dneh fermentacije (2 log CFU mL⁻¹), medtem ko so prisotnost kvasovk na površini plodov določili že pred predelavo (3 log CFU mL⁻¹). Hurtado in sod. (2009) so ugotovili, da zeleni

plodovi sorte 'Arbequina' vsebujejo več biofenolov, ki inhibirajo rast mlečnokislinskih bakterij.

Kvasovke imajo pomembno tehnološko vlogo tudi pri drugih načinih predelave oljk. Panagou (2006) je proučeval fizikalnokemijske in mikrobiološke spremembe črnih namiznih oljk, ki so bile predelane v plasteh neposredno v soli. Ugotovil je, da so po 20-ih dneh predelave prisotne le kvasovke ($5,6 \log \text{CFU mL}^{-1}$) in da je začetna populacija mlečnokislinskih bakterij zaradi nizke vodne aktivnosti ($a_w = 0,84$) izumrla.

Arroyo López in sod. (2008) navajajo, da je interakcija med kvasovkami in mlečnokislinskimi bakterijami pomembna za končno stabilnost izdelka. Raziskav na tem področju je še relativno malo, potrebno je natančno proučiti antagonistične in sinergistične učinke med omenjenimi mikroorganizmi.

2.4.3 Rast kvasovk pri shranjevanju namiznih oljk

Garrido Fernández in sod. (1997) poročajo, da kvasovke lahko, kljub nizki vrednosti pH pakiranih namiznih oljk, delujejo kot kvarljivci, saj za rast lahko izkoristijo rezidualni oziroma nepovreti sladkor in se tako namnožijo do $6 \log \text{CFU mL}^{-1}$. Ruiz Cruz in González Cancho (1969, cit. po Arroyo López in sod., 2008) poročata, da kvasovke lahko v aerobnih pogojih izkoristijo mlečno in očetno kislino kot substrat za rast. V anaerobnih pogojih kvasovke niso sposobne izkoristiti omenjenih kislin in tako ne povzročajo kvar namiznih oljk.

Panagou (2002) je ugotovil, da shranjevanje namiznih oljk v modificirani atmosferi oziroma z uporabo CO_2 ugodno vpliva na kakovost oljk in inhibira rast kvasovk. Betts in sod. (1999) poročajo o sinergističnem vplivu pH-ja, koncentracije soli in nizke temperature skladiščenja namiznih oljk pri ohranjanju stabilnosti izdelka. Poskuse so opravili na rodove *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida* in *Saccharomyces*. Tudi Durán Quintana in sod. (2003) so potrdili rezultate sinergističnega učinka omenjenih dejavnikov na vrstah *P. anomala*, *P. membranifaciens*, *P. minuta*, *S. cerevisiae* in *D. hansenii*. Arneborg in sod. (1995) poročajo, da je učinek očetne kisline, ki je naravno prisotna ali lahko dodana kot konzervans, pri zaviranju rasti *S. cerevisiae* zelo odvisen od puferske kapacitete slanice.

Kvasovke lahko negativno vplivajo na značilnosti končnega izdelka oziroma namiznih oljk. V primeru, da s svojim metabolizmom proizvajajo večje količine CO_2 povzročajo napihovanje embalaže, odgovorne so za motnost slanice in s svojimi metaboliti negativno vplivajo na vonj in okus oziroma na senzorične značilnosti namiznih oljk. Arroyo López in sod. (2008) navajajo, da so številni raziskovalci proučili vpliv sorbinske in benzojske kisline in njunih soli na stabilnost namiznih oljk in ugotovili inhibicijo kvasovk. Uporaba omenjenih konzervansov je med drugim dovoljena tudi v Tržnem standardu o namiznih oljkah (Trade standard..., 2004).

Pri zagotavljanju stabilnosti pakiranih namiznih oljk je potrebno zagotoviti ustrezen pH, koncentracijo soli in temperaturo, ki preprečuje rast kvasovk. V ta namen se lahko namiznim oljkam dodajajo različne kisline (na primer citronska, mlečna, očetna, klorovodikova, sorbinska, benzojska) in druge dodatke, kot je, na primer, naravni ekstrakt rožmarina. Arroyo López in sod. (2008) poročajo, da je potrebno z raziskavami vpliva ekoloških dejavnikov na rast in inhibicijo kvasovk ter o uporabi podatkov pri modeliranju

in vodenju fermentacije in zagotavljanju primerne skladiščenja namiznih oljk nadaljevati, saj je trenutno zbranih premalo podatkov.

Novejše raziskave so osredotočene tudi na zimocidno aktivnost (killer activity) določenih vrst kvasovk. Zimocidne kvasovke lahko sintetizirajo strupene beljakovine oziroma glikoproteine (zimocine), ki povzročijo smrt določenih občutljivih sevov kvasovk. Arroyo López in sod. (2008) navajajo, da so številni avtorji ugotovili, da ob prisotnosti zimocidnih kvasovk lahko zmanjšamo uporabo soli in konzervansov pri pakiranju in ohranjanju kakovosti namiznih oljk. Zimocidna aktivnost je bila ugotovljena pri kvasovkah rodu *Debaryomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida* in *Torulaspota*. Santos in sod. (2000) so ugotovili, da *P. membranifaciens* sintetizira zimocin, ki se veže na (1→6)-β-D-glukan celične stene kvasovke *C. boidinii* IGC 3430 in da je toksin najbolj aktiven v prisotnosti NaCl. Vezava na (1→6)-β-D-glukan je zelo hitra, saj poteče že v 2 minutah. Aktivnost je pogojena z vrednostjo pH medija in koncentracijo soli v slanici (Hernández in sod., 2008).

2.4.4 Genetske značilnosti kvasovk, izoliranih iz proizvodnje namiznih oljk

Kakovost namiznih oljk je odvisna od poteka fermentacije, ki jo vodijo kvasovke in/ali mlečnokislinske bakterije. Posamezen sev kvasovk lahko pomembno vpliva na izoblikovanje končnih značilnosti namiznih oljk. Arroyo López in sod. (2006) so proučevali genetski profil desetih izolatov *Saccharomyces cerevisie* iz zelenih namiznih oljk. Z restrikcijsko analizo z encimom *HinfI* so določili štiri različne genetske profile in ugotovili, da je populacija izoliranih kvasovk heterogena. Barrio in sod. (2006) navajajo, da do sedaj genetske značilnosti izolatov rodu *Saccharomyces*, ki vodijo fermentacijo namiznih oljk niso bile opisane. To bi bilo koristno pri razvoju primerne starterske kulture, ki bi lahko izboljšala industrijsko proizvodnjo namiznih oljk z določenimi senzoričnimi značilnostmi.

2.5 SENZORIČNO OCENJEVANJE NAMIZNIH OLJK

Senzorično ocenjevanje namiznih oljk temelji na kvalitativni in kvantitativni deskriptivni senzorični analizi. Metoda senzoričnega ocenjevanja in kriteriji za razvrščanje namiznih oljk v kakovostne kategorije so opisani v dokumentu COI/OT/MO/Doc. No 1 Sensory analysis of table olives, ki ga je oktobra 2008 izdal Mednarodni svet za oljke (IOC).

Senzorično ocenjevanje poteka v laboratoriju, opremljenem v skladu z zahtevami, ki so opredeljene v standardu Mednarodnega sveta za oljke COI/T.20/Doc. no. 6/Rev. 1 Guide for the installation of a test room. Vzorci namiznih oljk so predstavljeni v kozarcih, ki se sicer uporabljajo pri senzoričnem ocenjevanju deviškega oljčnega olja. Značilnosti kozarcev so definirane v standardu COI/T.20/Doc. no. 5 Glass for oil testing. Pri senzoričnem ocenjevanju namiznih oljk sodeluje od 8 do 10 izšolanih preskuševalcev. Da preskuševalec opravi svojo nalogo pravilno, mora imeti vsako ocenjevalno mesto naslednjo opremo:

- predpisane in označene kozarce z vzorci, pokrite z urnim steklom;
- plastično ali kovinsko palico (nabodalo), vilice, žlico ali klešče;
- specifični ocenjevalni list;
- svinčnik ali pero;
- kozarec vode sobne temperature.

V vsak kozarec za senzorično ocenjevanje pripravimo toliko namiznih oljk, da je dno kozarca pokrito z enim slojem oljk in z zadostno količino slanice, da prekrije vzorec. V primeru, da je velikost oziroma kaliber vzorcev nad 91/100 (manjši plodovi), pripravimo v kozarce toliko oljk, da volumen vzorca ne presega polovico višine kozarca oziroma 30 mm. V primeru, da je kaliber namiznih oljk pod 91/100 (večji plodovi) pripravimo v kozarec vsaj 3 namizne oljke in nalijemo zadostno količino slanice oziroma vsaj do treh četrtin višine plodov. Kozarce označimo in pokrijemo z urnim steklom. Vzorce, pripravljene za senzorično ocenjevanje, hranimo v kozarcih pri sobni temperaturi, ki ne sme biti nižja od 20-22 °C.

Preskuševalci zapisujejo prisotnost in intenzivnost zaznanih senzoričnih značilnosti na ocenjevalni list, ki je prikazan v prilogi. Definicije navedenih značilnosti so opisane in podane v poglavju 3.3.18 Senzorično ocenjevanje namiznih oljk.

Standard Sensory analysis of table olives (2008) predpisuje tudi največje dovoljeno število vzorcev, ki se lahko senzorično oceni v enem dnevu, in sicer dovoljuje se tri ocenjevanja na dan, pri vsakem ocenjevanju pa se lahko senzorično preskusi le dva vzorca namiznih oljk. Torej skupno 6 vzorcev na dan. Ko preskuševalec zaključi ocenjevanje posameznega vzorca in pred pričetkom ocenjevanja naslednjega vzorca, si nevtralizira okus s kozarcem vode sobne temperature in si odpočije vsaj 15 minut. V primeru, da preskuševalec zazna na vonju zelo intenzivno negativno značilnost, lahko z ocenjevanjem preneha in to izredno okoliščino zabeleži na ocenjevalni list.

Standard priporoča, da se vzorci namiznih oljk senzorično ocenjujejo v dopoldanskem času, pred kosilom, ko je ostrina vohalno-okušalnih sposobnosti preskuševalcev optimalna.

Po zaključenem ocenjevanju vodja panela zbere ocenjevalne liste in s pomočjo računalniškega programa prouči intenzivnost mediane za posamezno značilnost.

Namizne oljke se razvršča v tri kakovostne kategorije (ekstra, prva in druga kategorija), predhodno opisane v poglavju 2.2 Tržni standard in značilnosti namiznih oljk, v skladu z izračunano mediano negativne značilnosti, ki je najbolj intenzivna. Kriteriji oziroma mejne vrednosti za razvrščanje namiznih oljk v kakovostne kategorije so podani v spodnji preglednici 5.

Preglednica 5: Razvrščanje namiznih oljk v kategorije (Sensory analysis of table olives, 2008)
Table 5: Table olives categorization (Sensory analysis of table olives, 2008)

Kategorija	Mediana najbolj intenzivne napake
ekstra	Me < 2,0 cm
prva	2 cm < Me ≤ 3,5 cm
druga	3,5 cm < Me ≤ 6,0 cm
Oljke, neprimerne za prehrano	Me > 6,0 cm

V kategorijo oljke, neprimerne za prehrano, se uvrščajo namizne oljke z zelo izrazitimi senzoričnimi napakami in zato niso namenjene za trg.

2.5.1 Negativne senzorične značilnosti (napake) namiznih oljk

Ricci (2007) poroča, da tehnološki postopek priprave oziroma fermentacije namiznih oljk in shranjevanje namiznih oljk pomembno vplivata na končno kakovost izdelka. Nepravilna tehnologija predelave lahko vodi do spremembe fizikalnokemijskih parametrov in senzoričnih značilnosti namiznih oljk ter h kvaru živila. Bakterije in kvasovke vplivajo s svojimi metaboliti k izoblikovanju senzoričnih značilnosti namiznih oljk. Ugotovljeno je bilo, da se na površini slanice lahko razvije sloj plesni, ki skupaj s kvasovkami in bakterijami kvarijo namizne oljke oziroma kvasovke porabijo mlečno kislino in posledično se zvišuje vrednost pH slanice.

2.5.1.1 Gnilobna fermentacija (po gnilem)

Po definiciji je zaznava, ki spominja na vonj po razkroju organskih snovi. Pojavi se bolj pogosto v prvi fazi fermentacije zelenih namiznih oljk, ki so bile predelane na španski način, vendar z zmanjšano populacijo oziroma v odsotnosti mlečnokislinskih bakterij. V začetni fazi fermentacije se zaradi ugodnih pogojev (dostopnost hranil oziroma substratov za fermentacijo, vrednost pH je še visoka) lahko razvijejo bakterije rodov *Clostridium*, ki s svojim delovanjem privedejo do razkroja organskih spojin in zavirajo mlečnokislinsko fermentacijo. Gniloben vonj in okus se ne da odpraviti niti s spiranjem oljk, zakisanjem izdelka in/ali menjavo slanice. Zato je pomembno, da predelava namiznih oljk poteka v higiensko ustreznih sodih oziroma bioreaktorjih.

2.5.1.2 Maslena fermentacija

Maslena fermentacija se pojavi v začetnih 15-ih ali 20-ih dneh fermentacije, ponavadi pri predelavi zelenih oljk na španski način. Zaradi višje vrednosti pH (zaradi usedline luga

oziroma sodavice), nižje koncentracije soli in povišane temperature se razvijejo anaerobne bakterije vrste *Clostridium butyricum*, ki sintetizirajo masleno kislino. Pojavi se lahko tudi pri naravnem načinu predelave črnih oljk. Namizne oljke pridobijo značilen vonj po žarkem maslu. Rast in razvoj vrste *Clostridium butyricum* lahko preprečimo, če fermentiramo plodove v 7-8 % slanici pri vrednosti pH, ki ni višja od 4,3. Preventivno moramo paziti na higieno opreme, ki jo uporabljamo za predelavo namiznih oljk, v začetnih dneh predelave sistematično premešamo in homogeniziramo slanico ter spremljamo vrednost pH in koncentracijo slanice.

2.5.1.3 Nastanek plina (alambrado)

Poškodba strukture namiznih oljk (zelenih in črnih) zaradi prisotnosti plina kaže, da je prišlo do kontaminacije z Gram-negativnimi bakterijami (npr. *Aerogenes*, *Aerobacter* in drugi rodovi), ki uspevajo pri višji vrednosti pH ali pri koncentraciji slanice manjši od 6 %. Znanih je več poškodb namiznih oljk. Plin se lahko zadrži in pod povrhnjico plodov se izoblikujejo žepki (gas pocket), ali pa v obliki ribjega očesa (fish eye) oziroma pride do poškodbe mezokarpa vse do koščice (alambrado).

Pogosto se tovrstna napaka pojavi pri plodovih, ki se nahajajo v zgornjih plasteh tik pod površino slanice. Običajno se plodovi napihnejo in zaradi nižje specifične teže lebdiijo oziroma plavajo na površini slanice. V primeru, da opazimo opisani pojav, lahko pravočasno ukrepamo in z dodajanjem mlečne ali očetne kisline znižamo vrednost pH do 4, hkrati pa povečamo koncentracijo slanice na 6,5-7,5 %.

V primeru predelave zelenih oljk na španski način lahko preprečimo nastanek plina z vpihovanjem CO₂ in z zakisanjem slanice z očetno kislino. Pri predelavi črnih oljk, na naravni način) pa se vpihuje kisik, da prevladujejo aerobni procesi, in že v začetku rahlo zakisamo slanico. Nizke temperature pa preprečujejo nastanek plina pri shranjevanju in skladiščenju namiznih oljk.

2.5.1.4 Mehčanje plodov (softening)

Mehčanje plodov je posledica delovanja encima poligalakturonaza (pektolitična diastaza) zaradi kontaminacije s plesni (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) in/ali aktivnosti kvasovk (*Candida*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*) in bakterij, ki se razvijejo pri vrednosti pH višji od 4,8 in nizki koncentraciji slanice. Do napake lahko pride že pri fermentaciji zelenih oljk ali pri skladiščenju zelenih ali črnih oljk. Napako lahko preprečimo, zato je pomembno, da spremljamo pH in koncentracijo slanice, ter se izognemo plesnivemu filmu na površini slanice. Pomembno je, da vzdržujemo konstanten nivo slanice oziroma, da so posode vedno polne.

2.5.1.5 Nepravilna propionsko-maslena fermentacija (zapateria)

Vonj in okus po propionsko-masleni fermentaciji spominja na gnilo usnje, v Španiji napako imenujejo zapateria, saj zaznave spominjajo na čevljarsko delavnico. Ponavadi do te napake pride pri predelavi zelenih namiznih oljk na španski način.

Do napake pride zaradi delovanja bakterij rodov *Clostridium* in *Propionibacterium*, ki se razvijajo na koncu fermentacije ali pri skladiščenju namiznih oljk, pri nizki vrednosti pH (pod 4,2), ko je vsebnost prostih kislin med 3 in 4 g/L, pri koncentraciji slanice, nižji od 6 % in pri (zelo) povišani temperaturi.

2.5.1.6 Gubanje plodov (arrugato)

Do gubanja plodov pride pri uporabi zelo koncentriranih slanice. Napaka je reverzibilna, če zmanjšamo koncentracijo slanice oziroma prenesemo oljke v novo manj koncentrirano slanico. Do napake pride tudi, če se med predelavo CO₂ zadržuje v plodovih in po zaključeni fermentaciji le ta izhaja. Posledično se eksokarp oziroma povrhnjica namiznih oljk naguba.

2.5.1.7 Motnost in sluzavost slanice

Motnost in sluzavost slanice se pojavi pri skladiščenju zelenih oljk, ki so bile predelane na španski način. Motnost in sluzavost slanice ne vplivata na senzorične značilnosti namiznih oljke. Napaka je lahko reverzibilna, vendar v primeru, da se slanica ne zbistri, je priporočljivo pripraviti novo slanico.

2.5.1.8 Sprememba barve plodov

Do spremembe barve pride pri skladiščenju črnih oljk, predelanih na naravni način, ali pa pri fiksaciji barve, ko izpostavimo plodove na zrak, pred končnim izborom namiznih oljk. Plodovi se modrikasto obarvajo oziroma barva se lahko spremeni v zelenkasto ali sivo, kar negativno vpliva na končni izgled namiznih oljk. V Grčiji imenujejo tovrstno napako z izrazom galazoma. Opazili so, da se barva plodov spremeni, če so hranjeni v slanici s koncentracijo pod 8 %, ali pri temperaturi nad 30 ali 32 °C oziroma pri plodovih, ki so bili zgodaj obrani v oljčnikih, opremljenih z namakalnim sistemom.

2.5.1.9 Poškodba eksokarpa in mehčanje mezokarpa

Do poškodbe in pretrganja povrhnjice ter mehčanja mezokarpa pride pri predelavi črnih oljk na kalifornijski način zaradi delovanja bakterije *Cellulomonas flavigena* in koliformnih bakterij, ki razgrajujejo celulozo.

2.5.1.10 Zelene pege

Pojav zelenih madežev na površini zelenih namiznih oljk, predelanih na španski način, so opazili le pri predelavi nekaterih španskih sort oljk (npr. *Manzanilla*). Vzroki za nastanek madežev še niso znani, vendar izključujejo, da so posledica uporabe fungicidov in preparatov na bazi bakra.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

V raziskavo smo vključili oljke dveh, za Slovensko Istro značilnih, sort 'Štorta' in 'Istrska belica'. Plodove smo vzorčili oktobra 2006 in 2007. Pred predelavo smo plodove kalibrirali oziroma razvrstili glede na število plodov na kilogram s pomočjo laboratorijskega kalibratorja v naslednje skupine: 'Štorta' 351/380 (od 351 do 380 plodov/kg oljk) in 'Istrska belica' 321/350.

Sorta 'Štorta' je avtohtona sorta, ki dozori zgodaj. Plodovi so srednje veliki in podolgovate oblike. Občutljiva je na napad oljčne muhe (*Bactrocera oleae*). Zaradi manjše vsebnosti olja, primerne teksture in dobre ločbe koščice od mezokarpa se plodove sorte 'Štorta' tradicionalno predela v namizne oljke. Plodovi so bili ob obiranju delno obarvani.

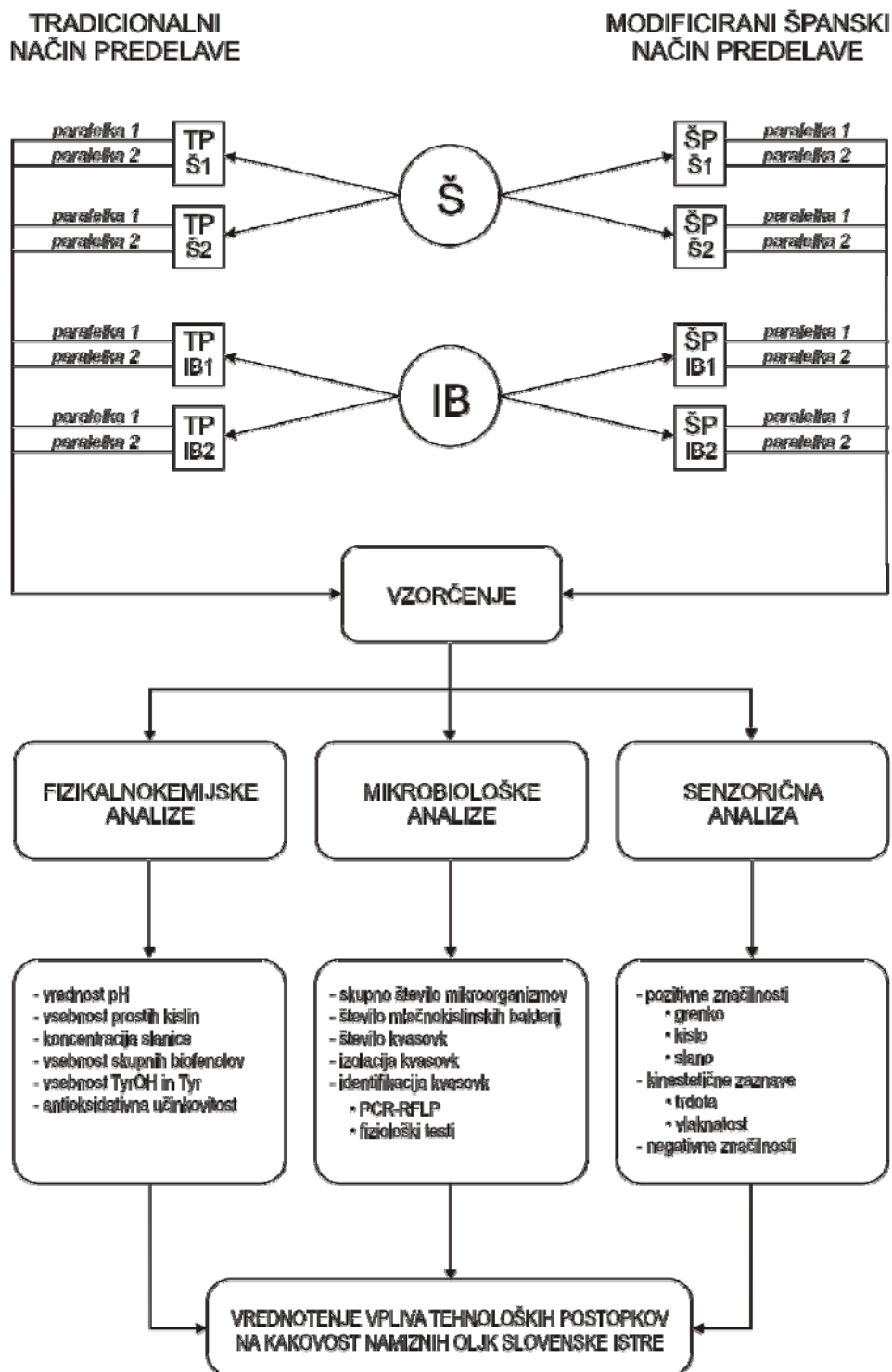
Sorta 'Istrska belica' je najbolj razširjena (63 % vseh kultiviranih sort) sorta v Slovenski Istri, ki je bila verjetno prinesena po pozebi leta 1929. Plodovi so eliptične oblike, srednje velikosti in zeleno obarvani. Listi pa so značilno spiralasto zviti, suličaste oblike. Dozoreva pozno, običajno sredi novembra. Dobro prenaša nizke temperature, občutljiva pa je na napad oljčne muhe (*Bactrocera oleae*) in kaparja (*Cicloconium oleaginum*). Za sorto 'Istrska belica' je značilna visoka vsebnost olja, zato se večino pridelka predela v kakovostno ekstra deviško oljčno olje, vendar jo zaradi dobre zastopanosti v regiji pridelovalci uporabljajo tudi za predelavo v namizne oljke.

3.2 PREDELAVA NAMIZNIH OLJK

Namizne oljke sort 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB) smo takoj po obiranju predelali v namizne oljke. Poslužili smo se dveh različnih tehnoloških postopkov:

- **Tradicionalni način predelave:** plodove oljk smo razgrenjevali v vodi (10 dni) in fermentirali v slanici. Vodo smo menjali na dva dni, oljke pa fermentirali 2 dni v 3,5 % slanici, nato 5 dni v 4,2 % slanici in do zaključka predelave v 6,2 % slanici. Potekala je spontana fermentacija, starterske kulture nismo dodali.
- **Modificirani španski način predelave:** plodove smo razgrenjevali z 2 % raztopino NaOH 8 ur, spirali ostanke luga 24 ur in fermentirali v 6,2 % slanici. Potekala je spontana fermentacija, starterske kulture nismo dodali.

Vsak tehnološki postopek smo izvedli v dveh ponovitvah (slika 11). Za vsak tehnološki postopek smo uporabili po 2 kg zdravih plodov sort 'Štorta' in 'Istrska belica'. V vsako posodo smo dali 1 kg oljk in 1,5 L vode, luga oziroma slanice. Fermentacijo smo izvajali v 3 L zaprtih posodah pri sobni temperaturi 60 in 180 dni. Iz vsake posode smo odvzeli po 2 vzorca, torej smo analize za vsak tehnološki postopek izvedli v 4 ponovitvah.



Slika 11: Shema poteka preskusa
Fig. 11: Flow chart of the experiment

3.3 METODE

Za proučevanje vpliva tehnologije predelave na kakovost in značilnost namiznih oljk Slovenske Istre, smo uporabili različne fizikalnokemijske analize slanice (merjenje vrednosti pH, določevanje vsebnosti prostih kislin in koncentracije slanice), ki jih določa Tržni standrad... (2004), spektrofotometrijsko in kromatografsko določevanje vsebnosti skupnih biofenolov, hidroksitirosola in tirosola ter določevanje antioksidativne učinkovitosti. Mikrobiološke analize so obsegale določevanje skupnega števila mikroorganizmov, skupnega števila kvasovk in plesni, števila mlečnokislinskih bakterij in identifikacijo kvasovk s fiziološkimi in molekularnimi metodami. Za senzorično analizo namiznih oljk smo uporabili kvantitativno opisno analizo.

3.3.1 Merjenje vrednosti pH

Vrednost pH slanice smo merili s pH metrom Iskra, Slovenija, tip MA 5730.

3.3.2 Določevanje vsebnosti prostih kislin

Proste kisline smo določili titrimetrično. 10 mL vzorca slanice smo odpipetirali v erlenmajerico, dodali nekaj kapljic fenolftaleina (1 % etanolna raztopina) in titrirali do ekvivalentne točke s standardizirano 0,1 M raztopino NaOH. Rezultat smo izrazili v g mlečne kisline/100 mL.

$$\text{Vsebnost prostih kislin (g / 100 mL)} = \frac{c_{\text{NaOH}} (\text{molL}^{-1}) \times V_{\text{NaOH}} (\text{mL}) \times 90,08 (\text{gmol}^{-1})}{10 \text{ mL} \times 10} \dots (1)$$

3.3.3 Refraktometrično določevanje koncentracije slanice

Koncentracijo slanice smo določili z refraktometrom Neolab, Nemčija, model 7-0111, ki je specifičen za določevanje koncentracije slanice. Rezultat (% slanice) smo neposredno odčitali na skali instrumenta.

3.3.4 Priprava ekstraktov za določevanje biofenolov in antioksidativne učinkovitosti

100 g plodov smo liofilizirali pri -60 °C in 0,04 mbar 72 ur oziroma do konstantne mase v liofilizatorju Christ, Nemčija, model Alfa 1-2 LD. Zabeležili smo izgubo mase vzorcev in izračunali suho snov. Liofilizirane vzorce smo homogenizirali in zmleli v prah.

Biofenole smo ekstrahirali po modificirani metodi, ki jo opisujejo Vinha in sod. (2005). Metodo smo optimizirali, saj smo biofenole ekstrahirali ob dodatku internega standarda. V 50 mL-centrifugirko smo odtehtali 250 mg zmletega vzorca in dodali 1 mL internega standarda (siringinska kislina, $c = 0,15 \text{ mg/mL}$). Biofenole smo ekstrahirali (stresali) 2 minuti s 5 mL metanola in filtrirali skozi grobi filtrirni papir. Ekstrakcijo smo ponovili še 2 krat (do negativne reakcije z 20 % NaOH; pri pozitivni reakciji se ekstrakt rumeno obarva). Združene filtrate smo na rotavaporju posušili do suhega ($40 \text{ }^\circ\text{C}$). Posušeni ekstrakt smo raztopili v 4 mL metanola, filtrirali skozi filter s porami $\text{Ø } 0,45 \text{ }\mu\text{m}$ in prenesli v vialo za HPLC.

Vzorci za spektrofotometrično določevanje skupnih biofenolov in antioksidativne učinkovitosti smo pripravili na zgoraj opisani način, brez dodatka internega standarda.

3.3.5 Spektrofotometrično določevanje vsebnosti skupnih biofenolov

Vsebnost skupnih biofenolov smo določili spektrofotometrično v skladu z metodo, ki opisana v literaturi (Gutfinger, 1981). V 10 mL-merilno bučko smo dodali 5 mL vode, 50 μL metanolnega ekstrakta in 0,5 mL reagenta Folin-Ciocalteu. Vzorec smo premešali in po 3 minutah dodali 1 mL nasičene raztopine Na_2CO_3 in dopolnili bučko do oznake z vodo. Nastal je obarvan kompleks, katerega intenziteto smo izmerili spektrofotometrijsko proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 725 nm, po 1 uri. Slepri vzorec smo pripravili na enak način kot vzorec brez dodatka ekstrakta. Vsebnost skupnih biofenolov smo izračunali iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili s kavno kislino (30-100 $\mu\text{g}/10 \text{ mL}$).

$$\text{Vsebnost skupnih biofenolov (mg/kg)} = \frac{m_B \times V_r}{V_{ex} \times m_v} \times \frac{ss}{100} \times 1000 \quad \dots (2)$$

m_B	masa biofenolov v bučki (μg), dobljena iz umeritvene krivulje ($m_B = k * A + n$)
A	izmerjena absorbanca
V_r	volumen delovne raztopine (mL)
V_{EX}	volumen dodanega ekstrakta (μL)
m_v	odtehta vzorca (g)
ss	suha snov (%)

3.3.6 Določevanje vsebnosti skupnih biofenolov, hidroksitirosola in tirosola s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Vsebnost skupnih biofenolov, hidroksitirosola in tirosola smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) po modificirani metodi, ki jo opisujejo Cortesi, Rovellini in Fusari (2002). Optimizirali smo uporabo mobilnih faz. V izvorni metodi avtorji uporabljajo tri mobilne faze, vendar, ker je razmerje dveh mobilnih faz konstantno, smo se odločili, da pripravimo mešanico le-teh (metanol:acetonitril=1:1, V,V).

Raziskovalci so metodo razvili za določevanje vsebnosti biofenolov v oljčnem olju in je sprejeta s strani Mednarodnega sveta za oljke (IOC). Določuje se vsoto naravnih in oksidiranih derivatov olevuropeina in ligstrozida ter lignane, flavonoide in fenolne kisline pri 280 nm.

Uporabili smo tekočinski kromatograf Hewlett Packard 1050 Series HPLC system, opremljen s kvaternarno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom in UV detektorjem (detekcija pri valovni dolžini 280 nm). Biofenole smo ločili na reverzni fazi na koloni C18 Phenomenex Luna C18 (2), 250 x 4,6 mm, 5 µm (ZDA).

Separacija biofenolov je potekala z gradientno elucijo, pretok 1 mL/min. Mobilna faza A je bila 0,2 % vodna raztopina H₃PO₄ (V/V), mobilna faza B mešanica metanola in acetonitrila (1:1, V/V). Gradient na začetku analize je bil 96 % mobilne faze A in 4 % mobilne faze B, ki se je nato v 40 min spremenil na 50 % B, v naslednjih 5 min na 60 % B in v zadnjih 15 min na 100 % B. Po 72 min od začetka analize se je koncentracija mobilne faze B zmanjšala na začetno vrednost 4 % za 10 min.

Sestavo biofenolov smo določili v 10 µL alikvotu metanolnega ekstrakta. Biofenole smo kvantitativno določili na osnovi internega (siringinska kislina) in zunanega standarda oziroma kalibracijske mešanice tirosola (0,030 mg/mL) in siringinske kisline (0,015 mg/mL). Izračunali smo faktor odziva za tirosol in siringinsko kislino. Nato smo izračunali še relativni faktor odziva med siringinsko kislino in tirosolom, ki nam omogoča, da ob uporabi internega standarda preračunamo vsebnost biofenolov na tirosol. Vsebnost biofenolov smo ovrednotili s pomočjo programa Chemstation. Pri podajanju vsote skupnih biofenolov smo upoštevali površino vseh vrhov, ki se eluirajo pri retencijskem času od 10 do 50 minut.

3.3.7 Določevanje antioksidativne učinkovitosti

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov namiznih oljk smo določili z DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalom, v skladu z metodo, ki je opisana v literaturi (Brand-Williams, Cuvelier in Berset, 1995). V 1 cm kiveto smo dali 3 mL DPPH (1×10^{-4} mol/L) in izmerili absorbanco (A_0) pri 515 nm. Dodali smo od 0 do 300 µL metanola (V_m) in $(300 - V_m)$ µL ekstrakta. Kiveto smo postavili v temo in 15 min po dodatku ekstrakta ponovno izmerili absorbanco (A_{15}). Antioksidativno učinkovitost (IC_{50}) smo preračunali s pomočjo grafične interpolacije podatkov in pridobili koncentracijo substrata, ki zmanjša začetno količino DPPH za 50 %. Zaradi bolj nazorne interpretacije rezultatov smo preračunali protiradikalno moč ($ARP = 1/IC_{50}$).

3.3.8 Določevanje skupnega števila mikroorganizmov

Za določevanje skupnega števila mikroorganizmov smo uporabili gojišče NA (hranljivi agar) (Oxoid LTD., Anglija, koda: CM003). Odtehtali smo 14 g gojišča v 500 mL vode in dodali 1,5 g glukoze. Vzorce matične raztopine plodov (pred predelavo) in slanice smo redčili po Kochu in inkubirali pri 37 °C 2 dni.

3.3.9 Določevanje skupnega števila kvasovk in plesni

Za določevanje skupnega števila kvasovk in plesni smo uporabili gojišče OGY (Biolife Italiana S.r.l., Italija, koda: 4018382). Odtehtali smo 20 g gojišča v 500 mL vode. Pred razvijanjem plošč smo v gojišče dodali antibiotik tetraciklin (0,1 g/L), ki inhibira rast bakterij. Vzorce matične raztopine plodov (pred predelavo) in slanice smo redčili po Kochu in inkubirali pri 28 °C 7 dni.

3.3.10 Določevanje števila mlečnokislinskih bakterij

Za določevanje števila mlečnokislinskih bakterij smo uporabili gojišče MRS (Merck KgaA, Nemčija, koda: 1.10660.0500). Odtehtali smo 34 g gojišča v 500 mL vode. Z očetno kislino smo znižali pH gojišča na 4,9 in dodali kalijev sorbat (0,4 g/L) za inhibicijo rasti kvasovk in plesni. Vzorce matične raztopine plodov (pred predelavo) in slanice smo redčili po Kochu, shranili v anaerobni lonec, prepihali s CO₂ in inkubirali pri 37 °C 3 dni.

3.3.11 Priprava vzorcev za identifikacijo kvasovk

Izolirane kulture kvasovk smo shranili v 1 mL 10 % raztopine glicerola in globoko zamrznili pri -80 °C do revitalizacije v tekočem gojišču YM, ki je vsebovalo 0,3 % kvasnega ekstrakta, 0,3 % sladnega ekstrakta, 0,5 % peptona in 1 % glukoze. Vzorce smo inkubirali pri 27 °C na stresalniku (200 rpm). Kvasovke smo nacepili na trdno gojišče YM, ki je poleg predhodno naštetih substratov vseboval 2 % agarja in 0,5 % ampicilina. Plošče smo inkubirali pri 27 °C 5 dni.

3.3.12 Izolacija DNA

Izolacijo DNA smo izvedli po veljavnem protokolu genskega laboratorija (Raspor, Smole Možina in Čadež, 2001). V 1,5 mL-mikrocentrifugirko smo dodali sterilni pesek in 4 kolonije kvasovk ter z vrtenjem s sterilno mikropestilo zdrobili celice. Dodali smo 500 µL TES pufra (1 M Tris pufer pH=8; 100 mM EDTA pH=8; 2 % SDS), ki smo mu predhodno dodali proteinazo K (0,2 mg/vzorec). Inkubirali smo 30 min pri 55-60 °C in vsake 5 min premešali. Dodali smo 140 µL 5M NaCl in 65 µL mešanice 10 % CTAB in 0,7 M NaCl, premešali in inkubirali 10 min pri 65 °C. Dodali smo 700 µL mešanice kloroforma in izoamilnega alkohola (24:1, V/V), premešali in inkubirali 30 min na ledu. Centrifugirali smo 10 min pri 4 °C pri 14000 rpm. V nove mikrocentrifugirke smo dodali 225 µL 5 M amonacetata, odpipetirali supernatant, premešali in inkubirali 30 min na ledu. Centrifugirali smo 10 min pri 4 °C pri 14000 rpm. V nove mikrocentrifugirke smo dodali 700 µL izopropanola, odpipetirali supernatant, premešali in inkubirali 15 min na ledu. Centrifugirali smo 10 min pri 4 °C pri 14000 rpm. Odlili smo supernatant, pelet sprali z 900 µL 70 % etanola in centrifugirali 10 min pri 14000 rpm pri sobni temperaturi. Odlili smo etanol, pelet posušili na zraku in raztopili DNA v 100 µL TE pufra.

3.3.13 Priprava vzorcev za analizo RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov) in pomnoževanje DNA v verižni reakciji s polimerazo (PCR)

V vsako Eppendorf centrifugirko z DNA smo dodali 1 μ L RNAze (10 mg/mL), premešali v centrifugi (Eppendorf centrifuge 5415C), inkubirali pri 37 °C 30 min ter ponovno premešali. Odpipetirali smo 3 μ L DNA v posodice za PCR.

Za vsak vzorec smo v posodice za PCR odpipetirali 27 μ L mešanice kemikalij in začetnih oligonukleotidov (3,3 μ L 10x pufra PCR, 1,3 μ L 50 mM MgCl₂, 2,6 μ L 2,5 mM dNTP, 1,6 μ L ITS1, 1,6 μ L ITS4, 19 μ L bidestilirane vode, 0,1 μ L polimeraze Taq). Skupen volumen za restrikcijo je bil 30 μ L. Regijo ITS rDNA smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v naslednjem zaporedju: segrevanje na 95 °C 5 min, 30 ciklov namnoževanja (95 °C 30 s - 55,5 °C 30 s - 72 °C 1 min), 72 °C 7 min in ohladitev na 4 °C.

3.3.14 Elektroforeza in identifikacija pomnožene rDNA

Specifičnost pomnožitve smo preverili z elektroforezo (Consort E455). Pripravili smo 170 mL 1,5 % agaroznega gela v 1 x pufru TAE. Na ploščice smo pripravili 1 μ L nanašalnega pufra, 2 μ L destilirane vode in 3 μ L pomnožene rDNA. Razredčen produkt smo nanесли v žepke gela ter v prvi in zadnji žepki dodali 5 μ L označevalca dolžin (100 kb ladder, Fermentas). Elektroforeza je potekala pri 180 V in 500 mA okvirno 30 min. Gel smo barvali v raztopini etidijevega bromida (0,5 μ g/ μ L) 15 min in spirali v destilirani vodi 10 min. Fragmente smo dokumentirali s sistemom GelDoc 2000 BIORAD za dokumentiranje gelov in rezultate ovrednotili s programom QuantityOne.

3.3.15 Restrikcija

Restrikcijo smo izvedli z uporabo treh restrikcijskih endonukleaz: *CfoI*, *HaeIII* in *Hinfi*. Za vsak vzorec smo pripravili restrikcijsko mešanico za posamezen encim (1 μ L specifičnega pufra za določen restrikcijski encim, 0,2 μ L restrikcijskega encima in 1,8 μ L bidestilirane vode).

7 μ L pomnožene rDNA smo odpipetirali v tri epice in dodali 3 μ L restrikcijske mešanice za posamezen encim. Vzorce smo premešali in inkubirali pri 37 °C 3 ure.

3.3.16 Elektroforeza in identifikacija restrikcijskih fragmentov

Po zaključeni inkubaciji smo produktu restrikcije dodali 2 μ L nanašalnega pufra. Pripravili smo 170 mL 2,5 % agaroznega gela v 1 x pufru TAE. Produkt smo nanесли v žepke gela ter v prvi in zadnji žepki dodali 5 μ L označevalca dolžin (100 kb ladder, Fermentas). Elektroforeza je potekala pri 120 V in 500 mA okvirno 60 min. Gel smo barvali v raztopini etidijevega bromida (0,5 μ g/ μ L) 15 min in spirali v destilirani vodi 10 min. Fragmente smo

dokumentirali s sistemom GelDoc 2000 BIORAD za dokumentiranje gelov in dolžine fragmentov ocenili s programom QuantityOne.

3.3.17 Fiziološki in biokemijski testi za identifikacijo kvasovk

Fiziološke in biokemijske teste smo izvajali v označenih epruvetah. Uporabili smo specifične oznake za posamezen test, z veliko začetnico F smo označili fermentacijske teste, s C smo označili asimilacijske teste sladkorjev, z N asimilacijo dušikovih spojin, z oznako O smo označili teste za rast v različnih gojiščih ter z oznako T smo označili teste za rast pri različnih temperaturah. Rezultate raziskave smo ovrednotili s pomočjo računalniškega programa Yeast Identification PC Program, Version 4, Registration No. 40039.

3.3.17.1 Fermentacijski testi

V vsako epruveto z Durchamovo cevko smo k 100 mL destilirane vode dodali po 2 g D-glukoze, D-galaktoze, maltoze, saharoze in laktoze. Nato smo dodali 100 μ L kulture suspendirane v sterilni destilirani vodi. Vzorce smo inkubirali pri 27 °C 7 dni, 14 dni in 21 dni.

3.3.17.2 Testi asimilacije ogljikovih spojin

Pripravili smo 100 mL 50 mM raztopine naslednjih substratov: D-glukoza, D-galaktoza, L-sorboza, D-glukozamin, D-riboza, D-ksiloza, L-arabinoza, D-arabinozae, L-ramnoza, saharoza, maltoza, α,α -trehaloza, Me- α -D-glukozid, celobioza, salicin, arbutin, melibioza, laktoza, rafinoza, melezitoza, škrob, glicerol, eritritol, ribitol, ksilitol, L-arabinitol, D-glucitol, D-manitol, galaktikol, mio-inozitol, D-glukono-1,5-lakton, 2-keto-D-glukonat, D-glukonat, D-glukuronat, D-galakturonat, DL-laktat, sukcinat, citrat, metanol, etanol.

V epruvete smo odpipetirali 4,5 mL substrata, 0,5 mL YNB (yeast nitrogen base) in dodali 100 μ L kulture. Vzorce smo inkubirali pri 27 °C 7 dni, 14 dni in 21 dni.

3.3.17.3 Testi asimilacije dušikovih spojin

V vsako epruveto smo k 100 mL destilirane vode dodali kalijev nitrat (0,078 g), natrijev nitrit (0,026 g), etilaminhidroklorid (0,064 g), L-lizin (0,056 g) in kadaverindihidroklorid (0,068 g), nato smo dodali 0,5 mL YCB (yeast carbon base) in 100 μ L kulture. Vzorce smo inkubirali pri 27 °C 7 dni, 14 dni in 21 dni.

3.3.17.4 Testi rasti v različnih gojiščih

V 5 mL asimilacijskega gojišča z glukozo smo dodali 0,1 % oz. 0,01 % raztopino cikloheksimida in 100 µL kulture. Vzorce smo inkubirali pri 27 °C 7 dni, 14 dni in 21 dni.

3.3.17.5 Testi rasti pri različnih temperaturah

Svežo kulturo smo nacepili na YPD gojišče, inkubirali in opazovali rast pri različnih temperaturah (25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C in 40 °C).

3.3.18 Senzorično ocenjevanje namiznih oljk

Senzorično kakovost namiznih oljk smo ocenili z metodo opisano v smernicah Mednarodnega sveta za oljke (IOC). Pri senzoričnem ocenjevanju je sodelovalo 9 preskuševalcev. V šifrirane kozarce smo pripravili po tri namizne oljke in nekaj mL slanice. Preskuševalci so ocenjevali senzorične značilnosti z naslednjimi deskriptorji: slano, grenko, kislo, trdota, vlaknatost, nepravilna fermentacija, plesnivo, žarko, segreto in drugo. Intenzivnost zaznanih značilnosti so zabeležili na 10 centimetrski nestrukturirani lestvici. Po zaključenem ocenjevanju smo za posamezno senzorično značilnost izračunali mediano in grobi koeficient variacije.

Senzorični slovar, ki se uporablja pri razvrščanju namiznih oljk v kakovostne kategorije, je opredeljen v standardu COI/OT/MO/Doc. No 1, ki ga je Mednarodni svet za oljke (IOC) izdal oktobra 2008 in ga predlagal v sprejem vsem državam članicam EU. V nadaljevanju navajamo prevod deskriptorjev senzoričnih značilnostih namiznih oljk.

- **negativne značilnosti – napake:**

Nepravilna fermentacija: značilna olfaktorna zaznava, zaznana direktno ali retronazalno, po nepravilni fermentaciji. Nepravilno fermentacijo lahko opišemo kot sledi:

- gnilobna fermentacija (po gnilem): zaznava, ki spominja na vonj po razkroju organskih snovi;
- maslena fermentacija (po maslu): zaznava, ki spominja na maslo ali sir;
- zapateria (po gnilem usnju): zaznava, ki jo povzroča kombinacija hlapnih maščobnih kislin.

Plesnivo: značilna olfaktorna zaznava, zaznana direktno ali retronazalno, po oljkah, v katerih se je razvilo večje število plesni.

Žarko: značilna olfaktorna zaznava, zaznana direktno ali retronazalno, po žarkih oljkah.

Segreto / zažgano: značilna olfaktorna zaznava, zaznana direktno ali retronazalno, ki ga povzroči premočno in/ali predolgo segrevanje med pasterizacijo ali med sterilizacijo oljk.

Milnato: značilen vonj in okus, ki spominja na milo.

Kovinsko: značilen vonj in okus, ki spominja na kovino.

Po zemlji: značilen vonj in okus, ki spominja na zemljo ali prah.

- **okušalne zaznave:**

Slano: osnovni okus po vodnih raztopinah natrijevega klorida.

Grenko: osnovni okus po vodnih raztopinah kinina in kofeina.

Kislo: osnovni okus po vodnih raztopinah vinske kisline ali citronske kisline.

- **kinestetične zaznave:**

Trdota: mehanska lastnost teksture, ki se nanaša na silo, potrebno za določeno deformacijo ali prediranje proizvoda (plodovi oljk). V ustih se trdota zazna s stiskanjem proizvoda med zobmi (trdi proizvodi) ali med jezikom in nebom (poltrdi proizvodi). Zaznano trdoto plodov opišemo z izrazi: mehka, čvrsta ali trda.

Vlaknatost: geometrijska lastnost teksture, ki se nanaša na zaznavo oblike in usmerjenosti delcev v proizvodu. Dolgi delci usmerjeni v isto smer. V ustih zaznamo občutke vlakna med jezikom in nebom pri žvečenju oljke.

Hrustljivost: mehanska lastnost teksture, ki se nanaša na vezljivost in na silo, ki je potrebna, da se proizvod razlomi ali razdrobi. Določa se z nenadnim stiskom proizvoda med sekalci.

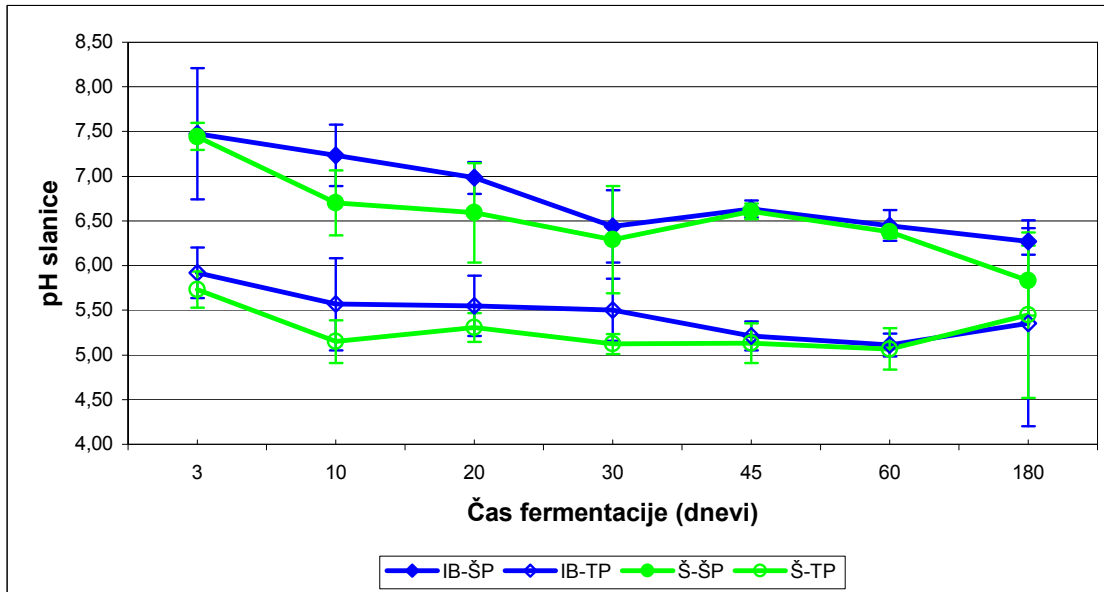
3.3.19 Statistična obdelava podatkov

Rezultate preskusov smo statistično obdelali, izračunali smo Levenov test in s tem preverili homogenost varianc ter s t-testom ovrednotili statistično značilne razlik med povprečnimi vrednostmi rezultatov. Izračunali smo tudi Pearsonov koeficient korelacije.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI MERJENJA VREDNOSTI pH SLANICE

Parameter, ki smo ga v naši raziskavi redno spremljali, je bila vrednost pH slanice. Merili smo jo po treh, 10-ih, 20-ih, 30-ih, 45-ih, 60-ih in 180-ih dneh fermentacije. Na sliki 12 so podane povprečne vrednosti pH slanice med fermentacijo, posebej za vsak tehnološki postopek in vsako sorto, a kot povprečje dveh letnikov. Iz grafičnega prikaza (slika 12) je razvidno, da se pH postopoma niža. Po treh dneh fermentacije je bil pH slanice namiznih oljk, ki smo jih predelali z modificiranim španskim načinom (ŠP), višji od vrednosti pH slanice namiznih oljk, ki smo jih predelali na tradicionalni način (TP). V slanici oljk, predelanih na ŠP, smo ugotovili višje vrednosti pH v primerjavi s slanico iz TP. Po 180-ih dneh fermentacije je bila vrednost pH namiznih oljk, ki smo jih predelali s TP 5,45 ('Štorta') in 5,35 ('Istrska belica'), v vzorcih namiznih oljk, ki smo jih predelali s ŠP pa 5,83 (Š) in 6,27 (IB). V tržnem standardu (Trade standard..., 2004) so predpisane mejne vrednosti za pH glede na tehnologijo predelave namiznih oljk. Ugotovili smo, da so vrednosti pH vzorcev slanice glede na zahteve [za TP ($\text{pH} \leq 4,3$) in ŠP ($\text{pH} \leq 4,0$)] po zaključeni fermentaciji previsoke. Zato je potrebno izdelek zakisati in/ali termično obdelati oz. pasterizirati.

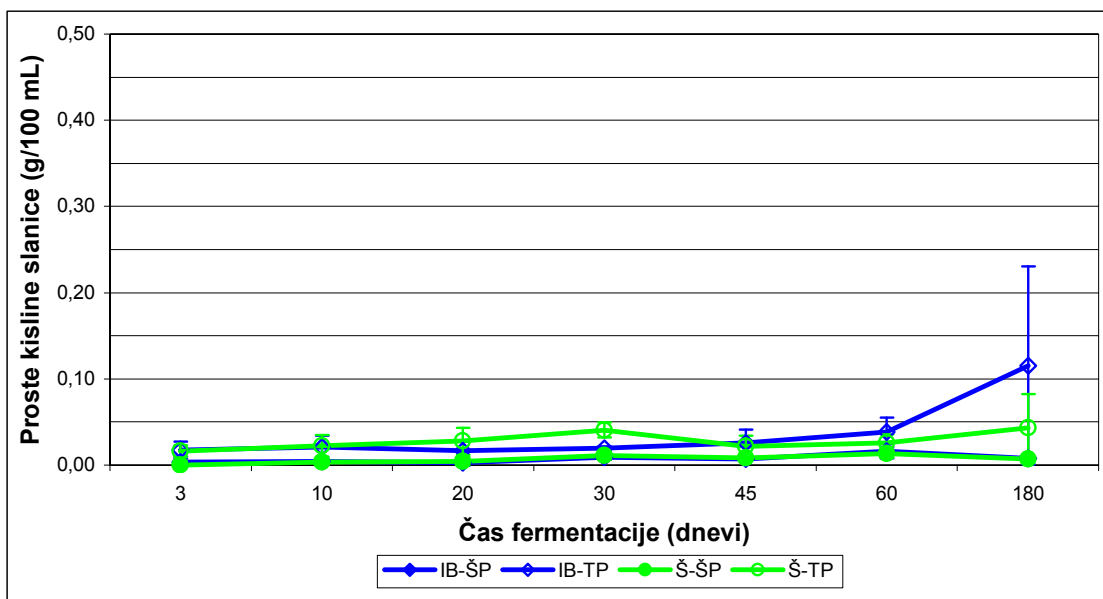


Slika 12: Vrednost pH slanice namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo; povprečne vrednosti in standardna deviacija dveh letnikov

Fig. 12: Average values and standard deviations of pH values of two crop years of brines 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB), produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, during fermentation

4.2 REZULTATI DOLOČEVANJA VSEBNOSTI PROSTIH KISLIN V SLANICI

V vzorcih slanice smo po treh, 10-ih, 20-ih, 30-ih, 45-ih, 60-ih in 180-ih dneh fermentacije titrimetrično določili vsebnost prostih kislin. Rezultat smo preračunali v g mlečne kisline/100 mL slanice. Iz grafičnega prikaza povprečnih vsebnosti prostih kislin (slika 13) je razvidno, da je bila vsebnost prostih kislin manjša v vzorcih slanice namiznih oljk, ki smo jih predelali na ŠP. Največjo vsebnost prostih kislin smo določili v slanici oljk, predelanih na TP, in sicer po 180-ih dneh fermentacije. Zlasti je izstopala slanica, v kateri smo fermentirali namizne oljke sorte 'Istrska belica', saj je vsebnost prostih kislin po 180-ih dneh fermentacije dosegla 0,116 g/100 mL. V slanici iz ŠP je bila ne glede na sorto oljk vsebnost prostih kislin opazno manjša; največjo vsebnost sta imeli slanici obeh sort po 60-ih dneh fermentacije, in sicer 0,013 g/100 mL v slanici namiznih oljk Š in 0,016 g/100 mL v slanici namiznih oljk IB. Glede na zahteve tržnega standarda (Trade standard..., 2004) za TP (0,3 g/100 mL) in ŠP (0,5 g/100 mL) smo ugotovili, podobno kot pri merjenju vrednosti pH, da je potrebno izdelek zakisati in/ali termično obdelati oz. pasterizirati.



Slika 13: Vsebnost prostih kislin (g/100 mL) v slanici namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo; povprečne vrednosti standardna deviacija dveh letnikov

Fig. 13: Average values and standard deviations of free acidity (g/100 mL) of two crop years of brines 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB), produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, during fermentation

4.3 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE SLANICE

Koncentracijo slanice (% NaCl) smo določili s specifičnim refraktometrom. V prvih petih dneh fermentacije smo v slanici namiznih oljk, predelanih na TP, dnevno določili koncentracijo slanice in v primeru zmanjšanja le-te, zaradi osmoze med plodovi in slanico, smo glede na dobljeni rezultat dodali toliko soli, da smo vzpostavili pogoje, ki so predpisani za posamezno tehnologijo predelave. V vzorcih, ki smo jih predelali na ŠP, smo ugotovili, da je po petih dneh fermentacije koncentracija slanice konstantna. Rezultati merjenja koncentracije slanice so podani v preglednici 6.

Preglednica 6: Rezultati merjenja koncentracije slanice (% NaCl) namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo

Table 6: Brine concentration (% NaCl) of 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB) table olives, produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, during fermentation

		Koncentracija slanice (% NaCl) *															
		Čas fermentacije (dnevi)															
Tehnologija	Letnik	1	2	3	4	5	10	11	12	13	14	17	18	20	30	60	180
TP	2006	-	-	-	-	-	3,5	2,9	4,2	4,0	4,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
	2007	-	-	-	-	-	3,5	3,0	4,2	3,8	4,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
ŠP	2006	6,2	4,2	5,8	6,0	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
	2007	6,2	4,5	5,6	6,0	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2

* povprečje 4 ponovitev

4.4 REZULTATI DOLOČEVANJA VSEBNOSTI SKUPNIH BIOFENOLOV

Vsebnost skupnih biofenolov smo določili spektrofotometrično po Gutfingerju (1981), z uporabo Folin-Ciocalteujevega reagenta, in s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) po metodi, ki je od maja 2009 sprejeta pri Mednarodnem svetu za oljke (IOC). Vsebnost skupnih biofenolov smo določili v plodovih oljk pred predelavo in v namiznih oljkah, predelanih na TP in ŠP, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije. V plodovih IB, pred predelavo, smo določili večjo vsebnost skupnih biofenolov (preglednica 7). Iz podatkov, ki so podani v preglednici 8 ter iz grafičnega prikaza (slika 14), je razvidno, da je po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije vsebnost skupnih biofenolov v vzorcih, ki smo jih predelali na ŠP, znatno manjša kot v vzorcih predelanih na TP.

V nadaljevanju (slike 15-19) prikazujemo tudi kromatografsko določitev vsebnosti biofenolov na primeru sorte IB.

Preglednica 7: Rezultati HPLC in spektrofotometrične (FC) določitve vsebnosti skupnih biofenolov (mg/kg) v plodovih oljk pred predelavo

Table 7: Total biophenol content (mg/kg) determined by HPLC and spectrophotometrically (FC) in olive fruits before processing

		Vsebnost skupnih biofenolov (mg/kg) *			
		Sorta 'Štorta'		Sorta 'Istrska belica'	
Letnik		HPLC metoda	FC metoda	HPLC metoda	FC metoda
2006	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	10482 (10406-10559)	5594 (5591-5596)	14545 (14506-14583)	7590 (7581-7599)
2007	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	11108 (10963-11252)	6354 (6347-6361)	14833 (14821-14844)	7118 (7115-7120)

* povprečje 4 ponovitev

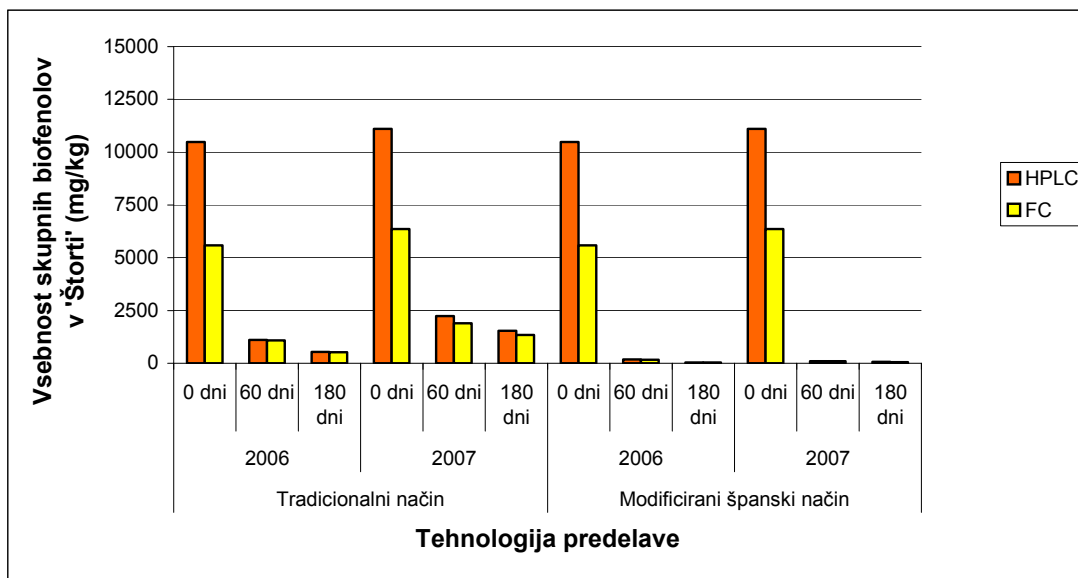
Preglednica 8: Rezultati HPLC in spektrofotometrične (FC) določitve vsebnosti skupnih biofenolov (mg/kg) v namiznih oljkah

Table 8: Total biophenol content (mg/kg) determined by HPLC and spectrophotometrically (FC) in table olives

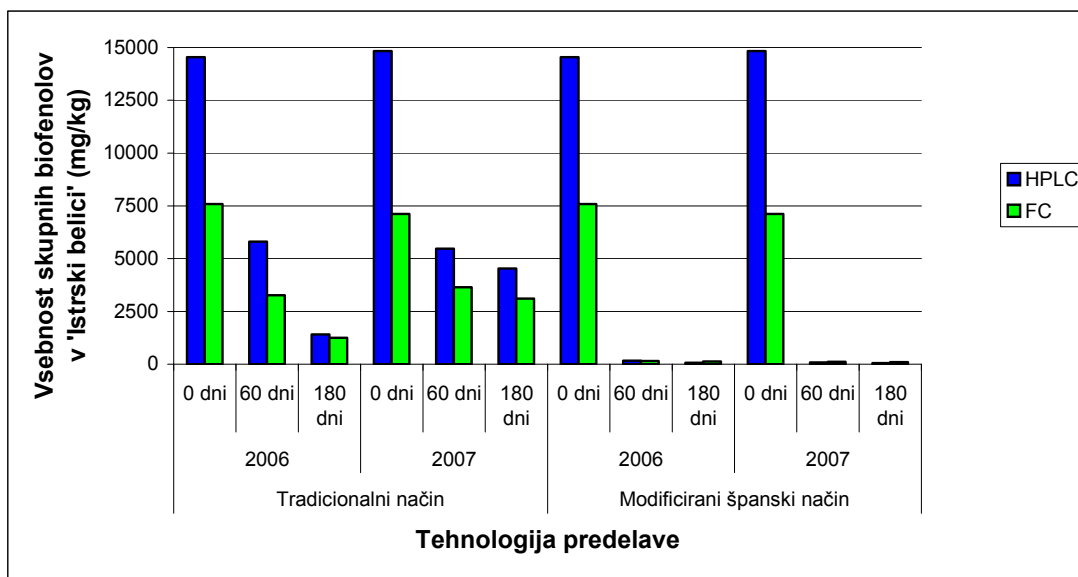
				Vsebnost skupnih biofenolov (mg/kg) *			
				Sorta 'Štorta'		Sorta 'Istrska belica'	
Tehnologija	Letnik	Dnevi		HPLC metoda	FC metoda	HPLC metoda	FC metoda
TP	2006	60	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	1109 (976-1368)	1079 (1045-1094)	5803 (5695-5919)	3263 (3072-3460)
ŠP	2006	60	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	183 (128-237)	167 (154-180)	177 (156-196)	153 (113-198)
TP	2006	180	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	544 (521-593)	531 (401-678)	1412 (1356-1485)	1256 (1210-1300)
ŠP	2006	180	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	44 (35-50)	40 (28-49)	75 (65-86)	134 (100-165)
TP	2007	60	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	2245 (2219-2288)	1900 (1878-1918)	5476 (5302-5721)	3649 (3579-3716)
ŠP	2007	60	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	94 (89-99)	98 (93-102)	89 (81-98)	110 (101-125)
TP	2007	180	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	1545 (1487-1600)	1340 (1314-1370)	4533 (4231-4872)	3104 (3098-3104)
ŠP	2007	180	\bar{x} ($x_{min}-x_{max}$)	70 (65-74)	63 (59-66)	52 (47-55)	95 (92-100)

* povprečje 4 ponovitev

A

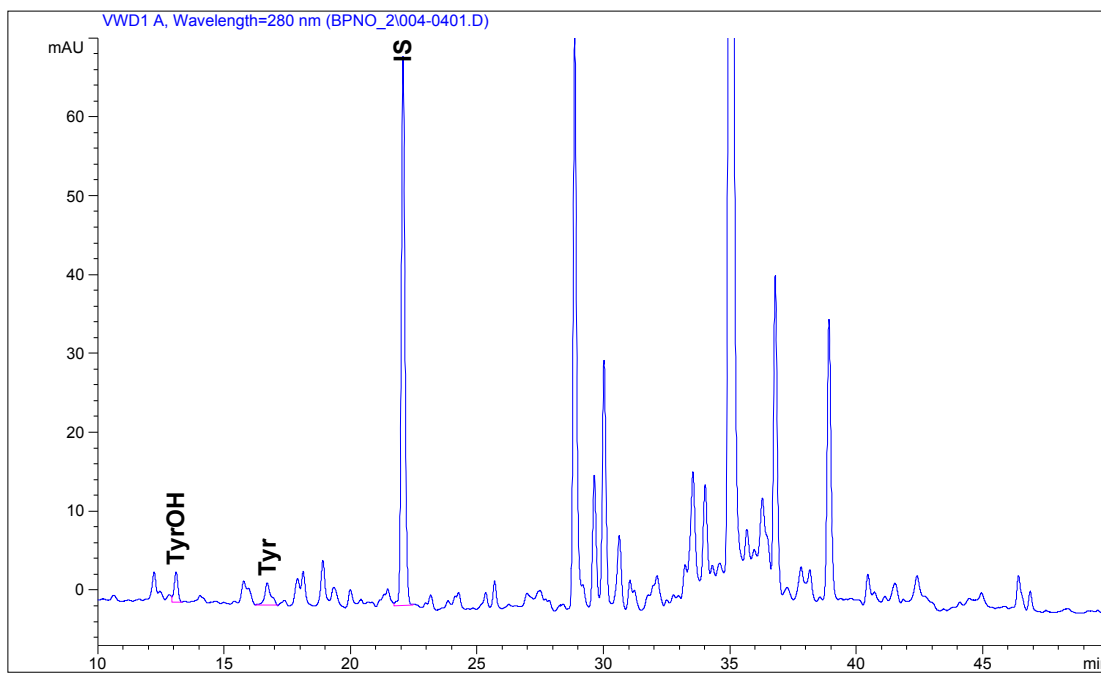


B



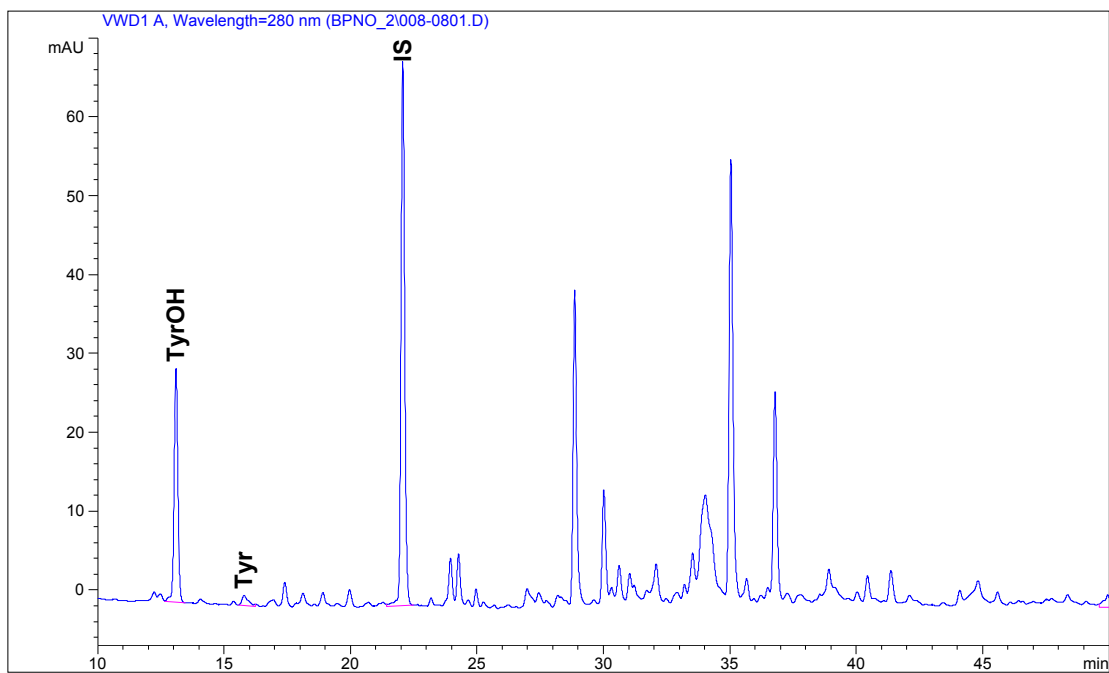
Slika 14: Vsebnost skupnih biofenolov v plodovih oljk pred predelavo in namiznih oljkah 'Štorta' (A) in 'Istrska belica' (B)

Fig. 14: Total biophenol content in olive fruits before processing and table olives 'Štorta' (A) and 'Istrska belica' (B)



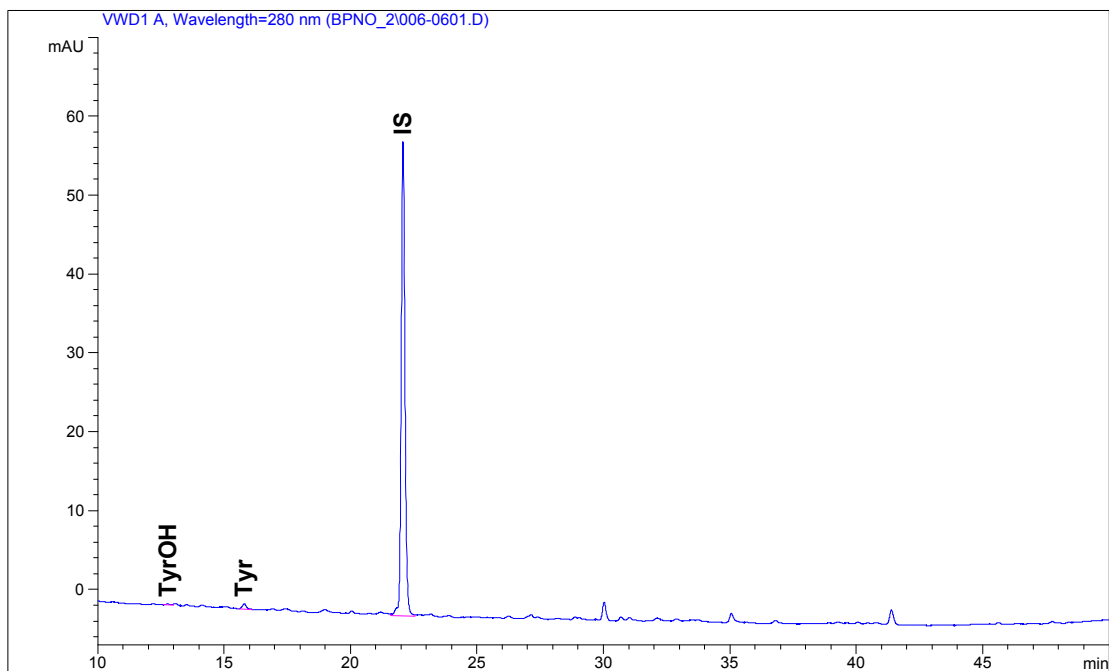
Slika 15: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v plodovih sorte 'Istrska belica' pred predelavo, letnik 2006

Fig. 15: Chromatogram of total biophenol content in "Istrska belica" olive fruits before processing, crop year 2006



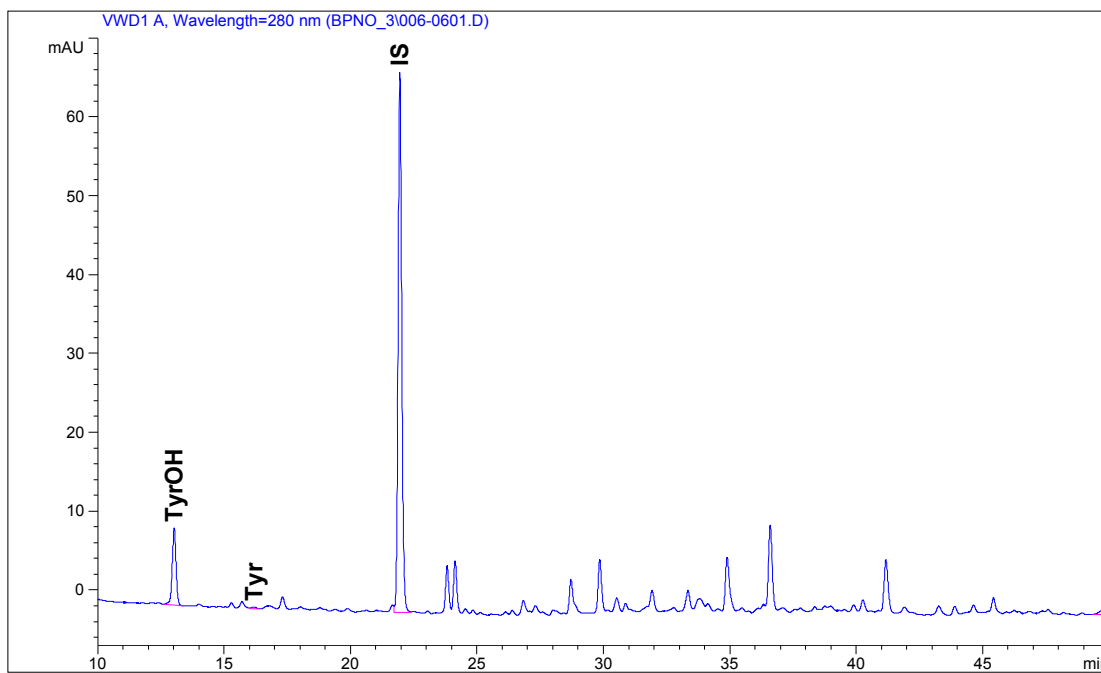
Slika 16: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način, po 60-ih dneh fermentacije, letnik 2006

Fig. 16: Chromatogram of total biophenol content in "Istrska belica" table olives after 60 days of production with traditional technology, crop year 2006



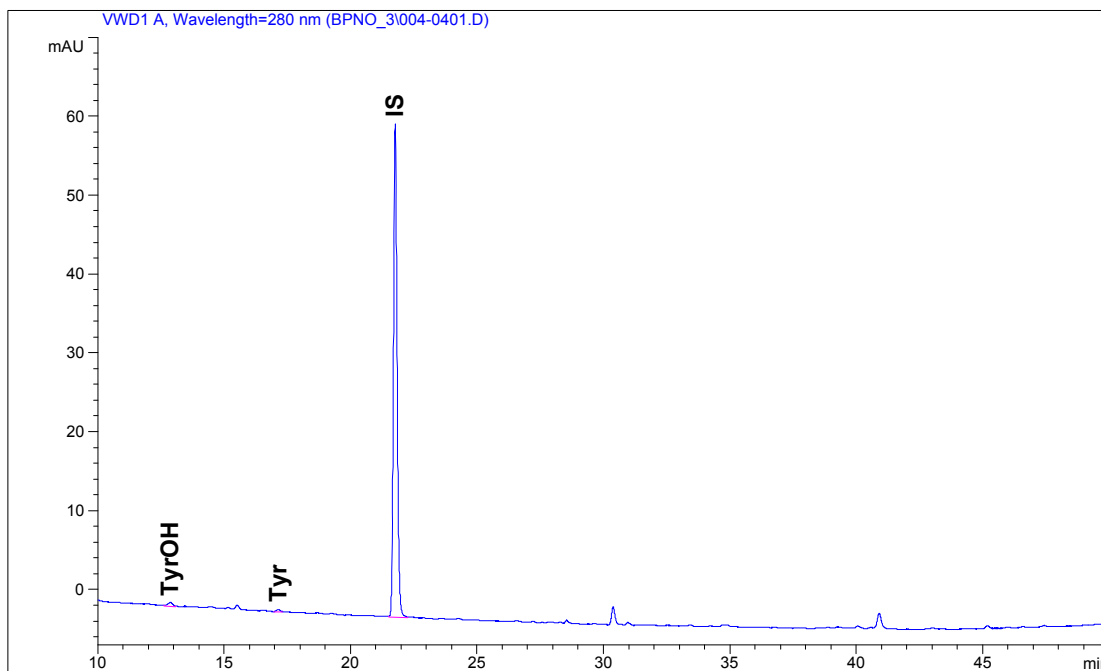
Slika 17: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na modificirani španski način, po 60-ih dneh fermentacije, letnik 2006

Fig. 17: Chromatogram of total biophenol content in "Istrska belica" table olives after 60 days of production with modified Spanish style technology, crop year 2006



Slika 18: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način, po 180-ih dneh fermentacije, letnik 2006

Fig. 18: Chromatogram of total biophenol content in "Istrska belica" table olives after 180 days of production with traditional technology, crop year 2006



Slika 19: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na modificirani španski način, po 180-ih dneh fermentacije, letnik 2006

Fig. 19: Chromatogram of total biophenol content in "Istrska belica" table olives after 180 days of production with modified Spanish style technology, crop year 2006

4.5 REZULTATI DOLOČEVANJA VSEBNOSTI HIDROKSITIROSOLOLA IN TIROSOLOLA

Vsebnost hidroksitirosola (TyrOH) in tirosola (Tyr) smo določili v plodovih pred predelavo (preglednica 9) in v namiznih oljkah, predelanih na oba obravnavana načina, TP in ŠP, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije (preglednica 10 in slika 20).

Primerjava vsebnosti hidroksitirosola in tirosola v plodovih oljk pokaže, da so bile oljke sorte 'Štorta' v primerjavi z vzorci sorte 'Istrska belica' bogatejše z vsebnostjo hidroksitirosola, zlasti letnika 2006. Za vsebnost tirosola pa ugotavljamo, da je bilo v vzorcih obeh sort letnika 2007 več tirosola kot v oljkah letnika 2006.

Spremljanje vsebnosti hidroksitirosola v namiznih oljkah pokaže, da se je njegova vsebnost med fermentacijo glede na plodove pri tradicionalnem postopku predelave povečala, in sicer v namiznih oljkah 'Štorta' letnika 2006 za 1,96-krat, v vzorcih letnika 2007 pa celo za 17,2-krat.

Za vsebnost tirosola pa smo ugotovili, da se je v namiznih oljkah 'Štorta' med predelavo zmanjšala, ne glede na tehnološki način predelave, v namiznih oljkah 'Istrska belica' pa je v prvih 60-ih dneh fermentacije pri tradicionalnem postopku predelave prišlo do povečanja njegove vsebnosti in tudi po 180-ih dneh fermentacije je bila njegova vsebnost večja kot v plodovih pred predelavo.

Na sliki 20 je opazna razlika med vsebnostjo hidroksitirosola in tirosola v namiznih oljkah, predelanih po dveh različnih postopkih, saj v vzorcih, predelanih po ŠP analiziranih komponent po 60-ih oziroma 180-ih dneh praktično ni.

Največjo vsebnost hidroksitirosola in tirosola smo določili v vzorcih namiznih oljk 'Istrska belica', predelanih na TP po 60-ih dneh fermentacije. Najmanjšo vsebnost hidroksitirosola smo določili v namiznih oljkah Š in IB, predelanih na ŠP, po 180-ih dneh fermentacije, medtem ko smo najmanjšo vsebnost tirosola določili v vzorcih namiznih oljk IB (letnik 2007), predelanih na ŠP, po 180-ih dneh fermentacije.

Preglednica 9: Vsebnost hidroksitirosola (TyrOH) in tirosola (Tyr), v mg/kg, v plodovih oljk pred predelavo
Table 9: Hydroxytyrosol (TyrOH) and tyrosol (Tyr) content (mg/kg) in olive fruits before processing

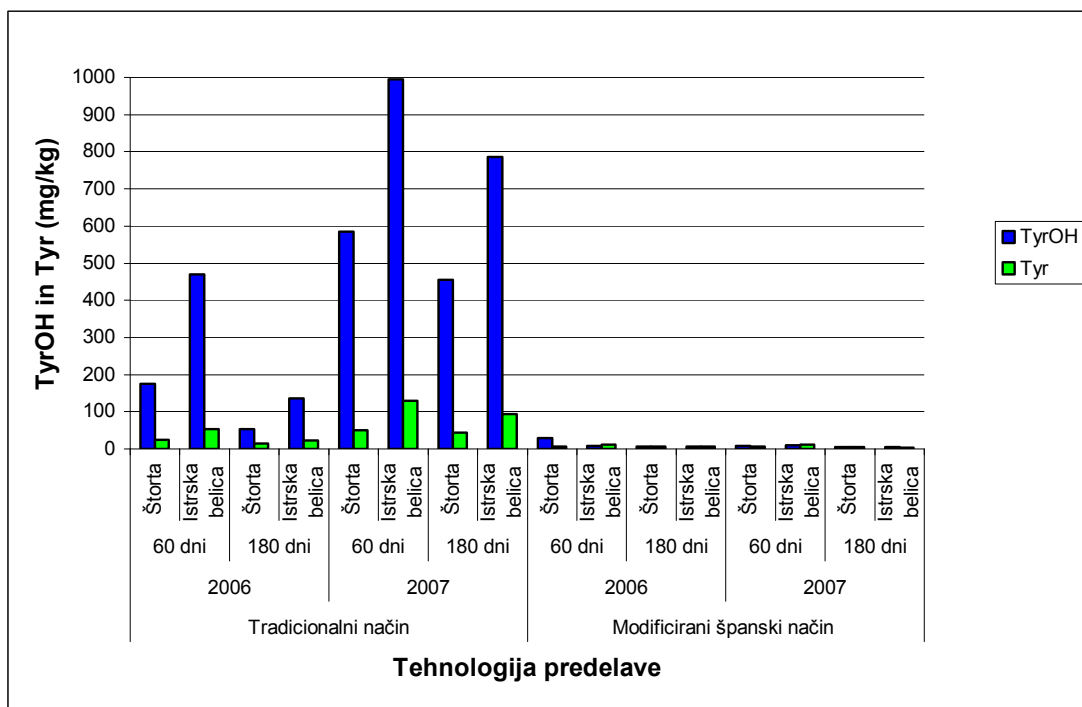
		Vsebnost hidroksitirosola in tirosola (mg/kg) *			
		Sorta 'Štorta'		Sorta 'Istrska belica'	
Letnik		TyrOH	Tyr	TyrOH	Tyr
2006	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	90 (89-91)	37 (36-38)	62 (60-63)	16 (15-16)
2007	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	60 (58-62)	67 (66-67)	58 (56-59)	77 (76-77)

* povprečje 4 ponovitev

Preglednica 10: Vsebnost hidroksitirosola (TyrOH) in tirosola (Tyr), v mg/kg, v namiznih oljках
Table 10: Hydroxytyrosol (TyrOH) and tyrosol (Tyr) content (mg/kg) in table olives

				Vsebnost hidroksitirosola in tirosola (mg/kg) *			
				Sorta 'Štorta'		Sorta 'Istrska belica'	
Tehnologija	Letnik	Dnevi		TyrOH	Tyr	TyrOH	Tyr
TP	2006	60	\bar{x} (x_{min} - x_{max})	176 (161-192)	25 (19-32)	471 (446-494)	53 (51-56)
ŠP	2006	60	\bar{x} (x_{min} - x_{max})	29 (19-39)	7 (6-8)	9 (8-9)	11 (10-11)
TP	2006	180	\bar{x} (x_{min} - x_{max})	54 (51-57)	14 (14-15)	136 (134-139)	23 (21-25)
ŠP	2006	180	\bar{x} (x_{min} - x_{max})	6 (5-8)	7 (6-8)	7 (5-11)	6 (5-7)
TP	2007	60	\bar{x} (x_{min} - x_{max})	585 (574-595)	50 (47-53)	995 (981-1017)	129 (124-132)
ŠP	2007	60	\bar{x} (x_{min} - x_{max})	8 (7-8)	6 (5-7)	9 (8-11)	11 (9-12)
TP	2007	180	\bar{x} (x_{min} - x_{max})	456 (429-487)	43 (40-46)	785 (752-823)	95 (89-100)
ŠP	2007	180	\bar{x} (x_{min} - x_{max})	5 (4-6)	5 (4-5)	5 (4-6)	4 (3-5)

* povprečje 4 ponovitev



Slika 20: Vsebnost hidroksitirosola (TyrOH) in tirosola (Tyr) v vzorcih namiznih oljk 'Štorta' in 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni in modificirani španski način, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije

Fig. 20: Hydroxytyrosol (TyrOH) and tyrosol (Tyr) content in 'Štorta' and 'Istrska belica' table olives, produced with traditional and modified Spanish style technology, after 60 and 180 days

4.6 REZULTATI DOLOČEVANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI

Rezultati določevanja antioksidativne učinkovitosti v plodovih oljk pred predelavo in v namiznih oljkah so podani v preglednicah 11 in 12 ter grafično prikazani na sliki 21. Ugotavljamo, da so plodovi obeh proučevanih sort 'Štorta' in 'Istrska belica' v letu 2007 imeli večjo antioksidativno učinkovitost, in sicer plodovi Š za 1,24-krat, plodovi IB pa za 1,18-krat.

V namiznih oljkah smo določili največjo antioksidativno učinkovitost v vzorcih IB, predelanih na TP in fermentiranih 60 dni, medtem ko smo ugotovili najmanjšo antioksidativno učinkovitost v vzorcih namiznih oljk Š, predelanih na ŠP po 180-ih dneh fermentacije. Primerjava antioksidativne učinkovitosti med namiznimi oljkami, predelanimi na TP in ŠP pa pokaže (slika 21) prednost TP, saj je antioksidativna učinkovitost namiznih oljk, predelanih s tem načinom, opazno večja.

Preglednica 11: Antioksidativna učinkovitost, ARP (mg^{-1}) v plodovih oljk pred predelavo
Table 11: Antioxidant activity, ARP (mg^{-1}) in olive fruits before processing

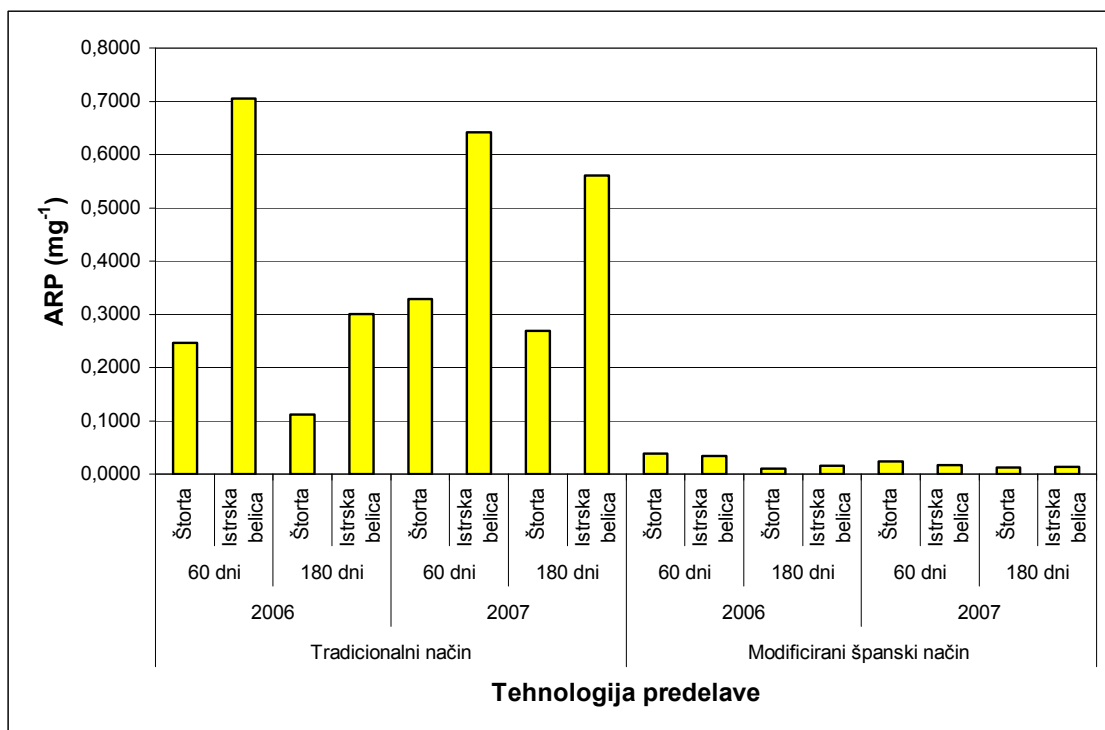
		Antioksidativna učinkovitost, ARP (mg^{-1}) *	
Letnik		Sorta 'Štorta'	Sorta 'Istrska belica'
2006	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	1,1534 (1,1531-1,1536)	1,1779 (1,1772-1,1786)
2007	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	1,4301 (1,4299-1,4303)	1,3923 (1,3825-1,4021)

* povprečje 4 ponovitev

Preglednica 12: Antioksidativna učinkovitost, ARP (mg^{-1}) v namiznih oljkah
Table 12: Antioxidant activity, ARP (mg^{-1}) in table olives

				Antioksidativna učinkovitost, ARP (mg^{-1}) *	
Tehnologija	Letnik	Dnevi		Sorta 'Štorta'	Sorta 'Istrska belica'
TP	2006	60	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	0,2459 (0,2186-0,2717)	0,7049 (0,6383-0,7740)
ŠP	2006	60	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	0,0381 (0,0177-0,0586)	0,0342 (0,0322-0,0372)
TP	2006	180	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	0,1115 (0,1070-0,1159)	0,3010 (0,2916-0,3096)
ŠP	2006	180	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	0,0100 (0,0090-0,110)	0,0163 (0,0139-0,0187)
TP	2007	60	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	0,3285 (0,3098-0,3485)	0,6417 (0,6314-0,6480)
ŠP	2007	60	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	0,0241 (0,0222-0,0261)	0,0166 (0,0130-0,0201)
TP	2007	180	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	0,2685 (0,2436-0,2927)	0,5601 (0,4889-0,6340)
ŠP	2007	180	\bar{x} (x_{\min} - x_{\max})	0,0121 (0,0115-0,0126)	0,0135 (0,0100-0,0169)

* povprečje 4 ponovitev

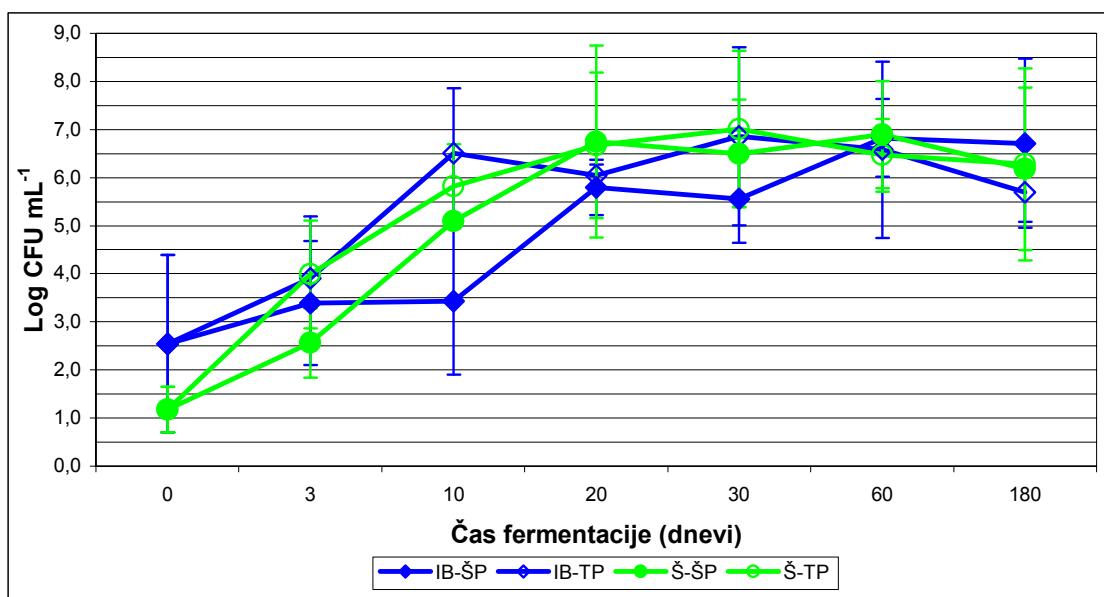


Slika 21: Antioksidativna učinkovitost (ARP) v vzorcih namiznih oljk 'Štorta' in 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni in modificirani španski način, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije

Fig. 21: Antioxidant activity (ARP) in 'Štorta' and 'Istrska belica' table olives, produced with traditional and modified Spanish style technology, after 60 and 180 days

4.7 REZULTATI DOLOČEVANJA SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV V PLODOVIH IN NAMIZNIH OLJKAH

Skupno število mikroorganizmov smo določili v matični raztopini plodov in v slanici namiznih oljk po treh, 10-ih, 20-ih, 30-ih, 60-ih in 180-ih dneh fermentacije. Povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov dveh letnikov so prikazane na sliki 22, iz katere je razvidno, da je število mikroorganizmov v matični raztopini plodov (pred predelavo) sorte 'Istrska belica' ($2,54 \log \text{CFU mL}^{-1}$) večje v primerjavi s sorto 'Štorta' ($1,18 \log \text{CFU mL}^{-1}$). Največjo vrednost skupnega števila mikroorganizmov smo določili v slanici namiznih oljk Š po 30-ih dneh fermentacije na TP ($7,02 \log \text{CFU mL}^{-1}$). Ravno tako smo po 30-ih dneh predelave na TP določili največje skupno število mikroorganizmov v slanici namiznih oljk IB ($6,86 \log \text{CFU mL}^{-1}$).



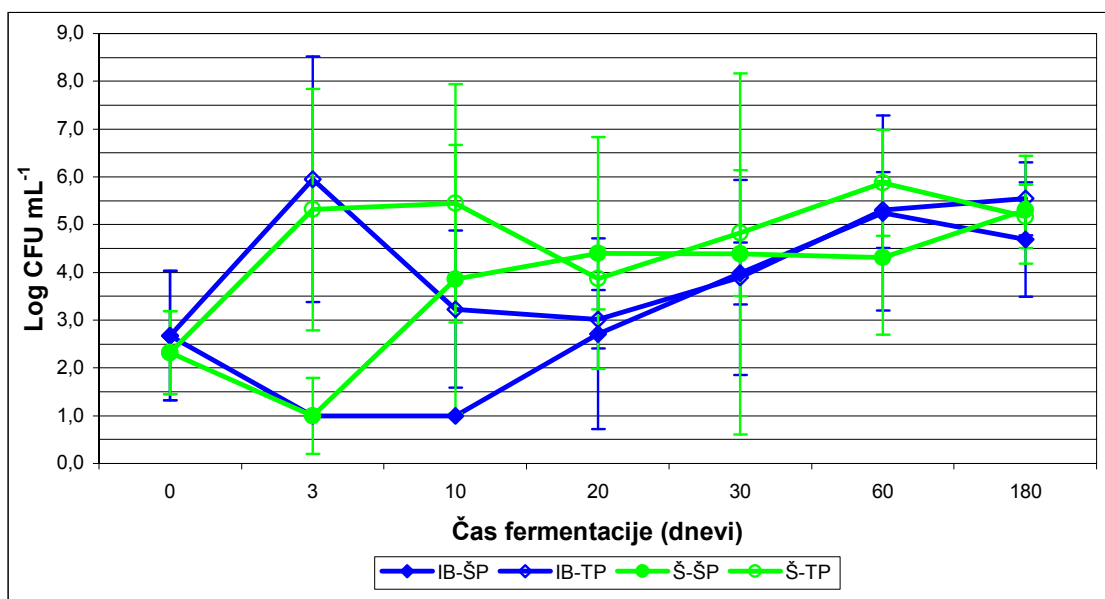
Slika 22: Skupno število mikroorganizmov v raztopini plodov pred predelavo (0) in v slanici namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo; povprečne vrednosti in standardna deviacija dveh letnikov

Fig. 22: Average values and standard deviations of total number of microorganisms of two crop years in olives fruits before processing (0) and in 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB) brines, produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, during fermentation

4.8 REZULTATI DOLOČEVANJA ŠTEVILA KVASOVK V PLODOVIH IN NAMIZNIH OLJKAH

V matični raztopini plodov in v slanici namiznih oljk smo po treh, 10-ih, 20-ih, 30-ih, 60-ih in 180-ih dneh fermentacije določili število kvasovk in plesni. Slika 23 prikazuje povprečno število kvasovk dveh letnikov, iz katere je razvidno, da je število kvasovk v matični raztopini plodov (pred predelavo) sorte IB ($2,68 \log \text{CFU mL}^{-1}$) večje v primerjavi

s sorto Š ($2,32 \log \text{CFU mL}^{-1}$). Največjo vrednost skupnega števila kvasovk smo določili v slanici namiznih oljk IB po treh dneh fermentacije na TP ($5,95 \log \text{CFU mL}^{-1}$), medtem ko smo v vzorcih slanice Š določili največje število kvasovk po 60-ih dneh fermentacije na TP ($5,87 \log \text{CFU mL}^{-1}$). Na podlagi rezultatov (slika 23) smo ugotovili, da se po treh dneh fermentacije na ŠP število kvasovk znatno zmanjša ($1,00 \log \text{CFU mL}^{-1}$ za Š in IB) in, da se nato po 10-ih dneh predelave postopoma povečuje.



Slika 23: Število kvasovk v raztopini plodov pred predelavo (0) in v slanici namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, med fermentacijo; povprečne vrednosti in standardna deviacija dveh letnikov

Fig. 23: Average values and standard deviations of number of yeasts of two crop years in olives fruits before processing (0) and in 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB) brines, produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, during fermentation

4.9 REZULTATI DOLOČEVANJA ŠTEVILA MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ V PLODOVIH IN NAMIZNIH OLJKAH

Število mlečnokislinskih bakterij smo določili v matični raztopini plodov pred predelavo in v slanici namiznih oljk po treh, 10-ih, 20-ih, 30-ih, 60-ih in 180-ih dneh fermentacije. Ugotovili smo, da se mlečnokislinske bakterije niso razvile oziroma, da ne vodijo fermentacije namiznih oljk, ki smo jih predelali na TP in ŠP iz sorte 'Istrska belica' in 'Štorta'.

4.10 IZOLACIJA KVASOVK

Kvasovke smo izolirali iz dveh vzorcev matične raztopine plodov pred predelavo in iz osmih posod, kjer smo fermentirali namizne oljke. Za vsak letnik predelave smo skupno zbrali 48 vzorcev slanice. Izolirali smo 48 kolonij kvasovk (32 letnika 2006 in 16 letnika

2007) in na podlagi morfoloških značilnosti kolonij smo na vsaki številni plošči gojišča OGY določili deleže različnih kolonij. Izvedli smo restrikcijsko analizo z verižno reakcijo s polimerazo pomnoženega fragmenta regije ITS in 5,8S ribosomske DNA (PCR-RFLP regije ITS) in na podlagi ugotovljenih restrikcijskih fragmentov izolate razvrstili v 6 skupin (3 skupine za posamezni letnik). Predstavnike posameznih skupin smo nato identificirali s fiziološkimi testi. Rezultate izolacije kvasovk smo uporabili pri vrednotenju populacijske dinamike kvasovk med fermentacijo namiznih oljk.

4.11 IDENTIFIKACIJA KVASOVK

Značilnosti izoliranih vrst kvasovk so podane v preglednicah 14, 15 in 16. Fiziološke teste smo izvajali na predstavnikih kvasovk, ki smo jih izbrali po predhodni analizi restrikcijski fragmentov rDNA (preglednica 13). Slike 24, 25 in 26 prikazujejo primer vrednotenja elektroforetske določitve restrikcijskih fragmentov, ki smo jih dobili z restrikcijskimi endonukleazami *CfoI*, *HaeIII* in *HinfI*. Identificirane vrste kvasovk in deleži le-teh pa smo prikazali na slikah 27, 28, 29 in 30.

Preglednica 13: Restrikcijski fragmenti kvasovk

Table 13: Yeasts restriction fragments

Kvasovka	Restrikcijski fragmenti		
	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
<i>Pichia anomala</i>	700	640	310 + 310
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	330	510 + 70	360 + 290
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	250 + 110	280 + 110	210 + 180
<i>Aureobasidium pullulans</i>	190 + 170 + 100	420 + 150	280 + 180 + 130
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	300 + 220 + 100	390 + 220	330 + 210

Kvasovko *Candida oleophila* smo identificirali na podlagi fizioloških testov, saj restrikcijske analize ni bilo mogoče izvesti, ker je bila izolacija DNA, kljub mnogim poskusom neuspešna.

Preglednica 14: Rezultati fermentacijskih testov

Table 14: Results of fermentation tests

Test		<i>Pichia anomala</i>	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Candida oleophila</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
F1	D-glukoza	+	-	+	-	+	-
F2	D-galaktoza	+	-	-	-	+	-
F3	maltoza	-	-	-	-	-	-
F5	saharoza	+	-	-	-	-	-
F8	laktoza	-	-	-	-	-	-

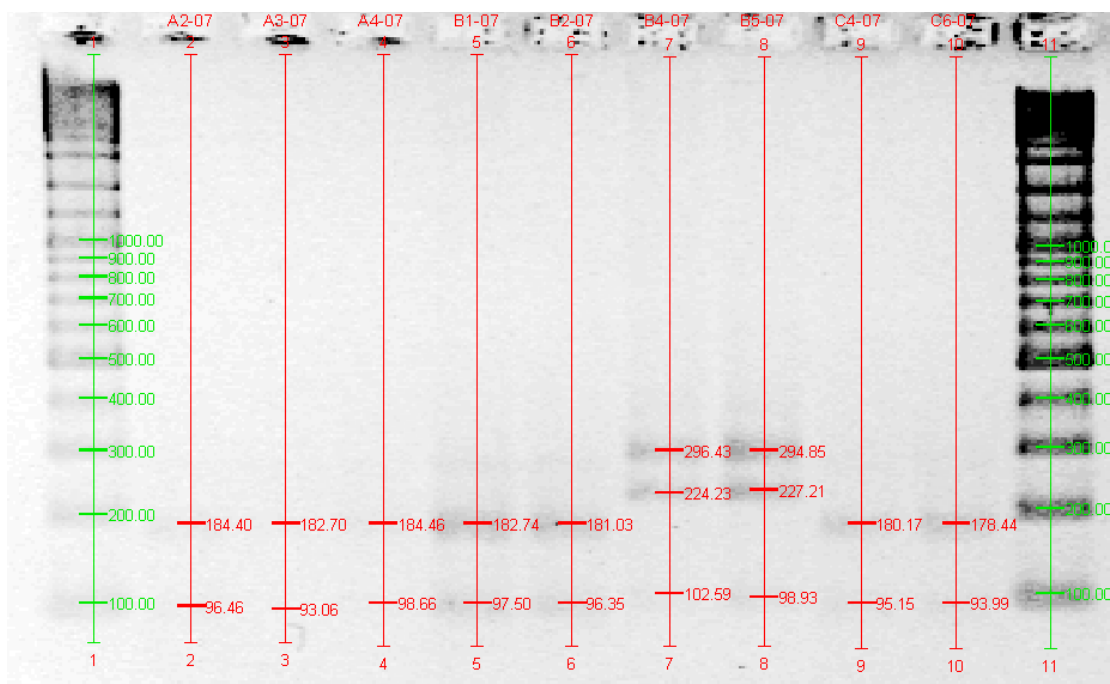
Preglednica 15: Rezultati asimilacije ogljikovih spojin
Table 15: Results of carbon compounds assimilation

Test		<i>Pichia anomala</i>	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Candida oleophila</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
C1	D-glukoza	+	+	+	+	+	+
C2	D-galaktoza	+	+	+	+	+	+
C3	L-sorboza	-	-	+	+	+	+
C4	D-glukozamin	-	-	+	-	+	-
C5	D-riboza	-	-	+	+	-	+
C6	D-ksiloza	+	+	+	+	+	+
C7	L-arabinoza	+	+	-	+	+	+
C8	D-arabinozae	-	-	-	-	-	-
C9	L-ramnoza	+	+	-	+	-	-
C10	saharoza	+	+	+	+	+	+
C11	maltoza	+	+	+	+	+	+
C12	α,α -trehaloza	+	+	+	+	+	+
C13	Me- α -D-glukozid	+	+	+	-	-	-
C14	celobioza	+	+	+	+	+	-
C15	salicin	+	-	+	-	-	+
C16	arbutin	+	-	+	+	+	+
C17	melibioza	+	-	-	+	-	-
C18	laktoza	-	-	-	+	-	-
C19	rafinosa	+	+	-	+	+	+
C20	melezitoza	+	+	+	+	+	+
C22	škrob	+	+	+	+	+	+
C23	glicerol	+	-	+	+	+	+
C24	eritritol	+	-	-	+	-	-
C25	ribitol	-	-	+	+	-	+
C26	ksilitol	+	-	+	+	-	+
C27	L-arabinitol	-	-	-	+	-	+
C28	D-glucitol	+	+	+	+	+	+
C29	D-manitol	+	+	+	+	+	+
C30	galaktikol	-	-	-	-	-	-
C31	mio-inozitol	-	+	-	+	-	-
C32	D-glukono-1,5-lakton	+	-	+	-	+	+
C33	2-keto-D-glukonat	-	+	+	-	+	-
C35	D-glukonat	-	-	+	+	+	-
C36	D-glukuronat	-	+	-	+	-	-
C37	D-galakturonat	-	-	-	-	-	-
C38	DL-laktat	+	-	-	+	-	-
C39	sukcinat	+	-	+	-	+	+
C40	citrat	+	+	+	-	+	-
C41	metanol	-	-	-	-	-	-
C42	etanol	+	+	+	-	+	+

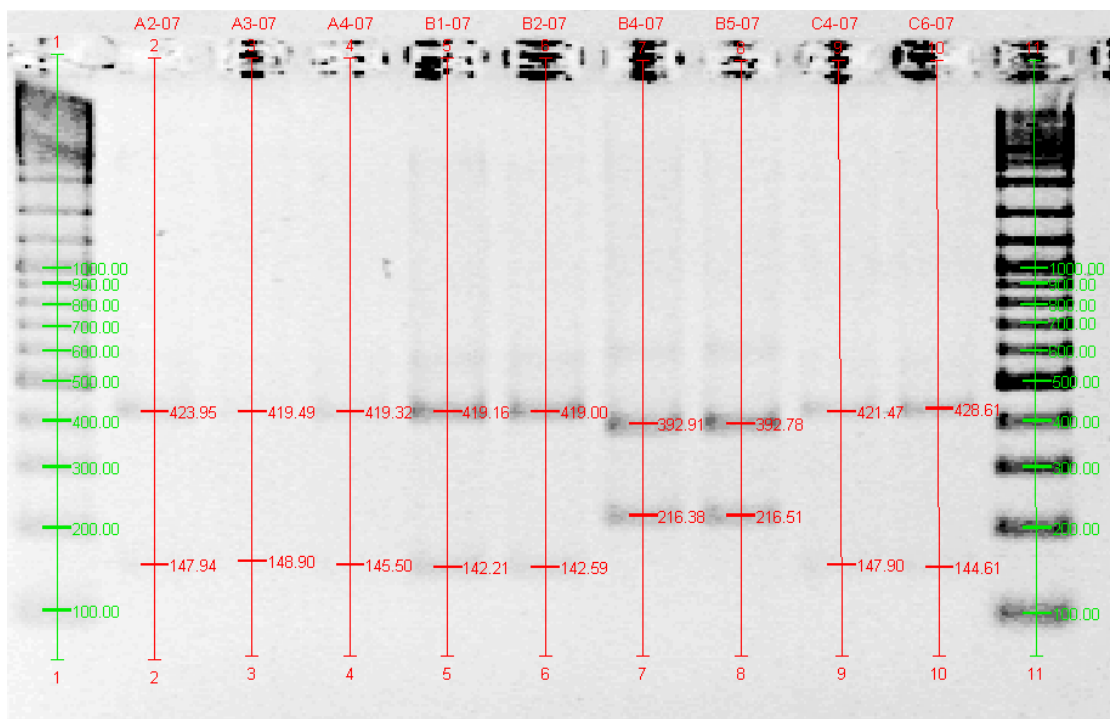
Preglednica 16: Rezultati asimilacije dušikovih spojin, rasti pri različnih temperaturah, rasti v različnih gojiščih in morfološke značilnosti kvasovk

Fig. 16: Results of nitrogen compounds assimilation, growth at different temperatures, growth in different culture medium and morphological characteristics of the yeasts

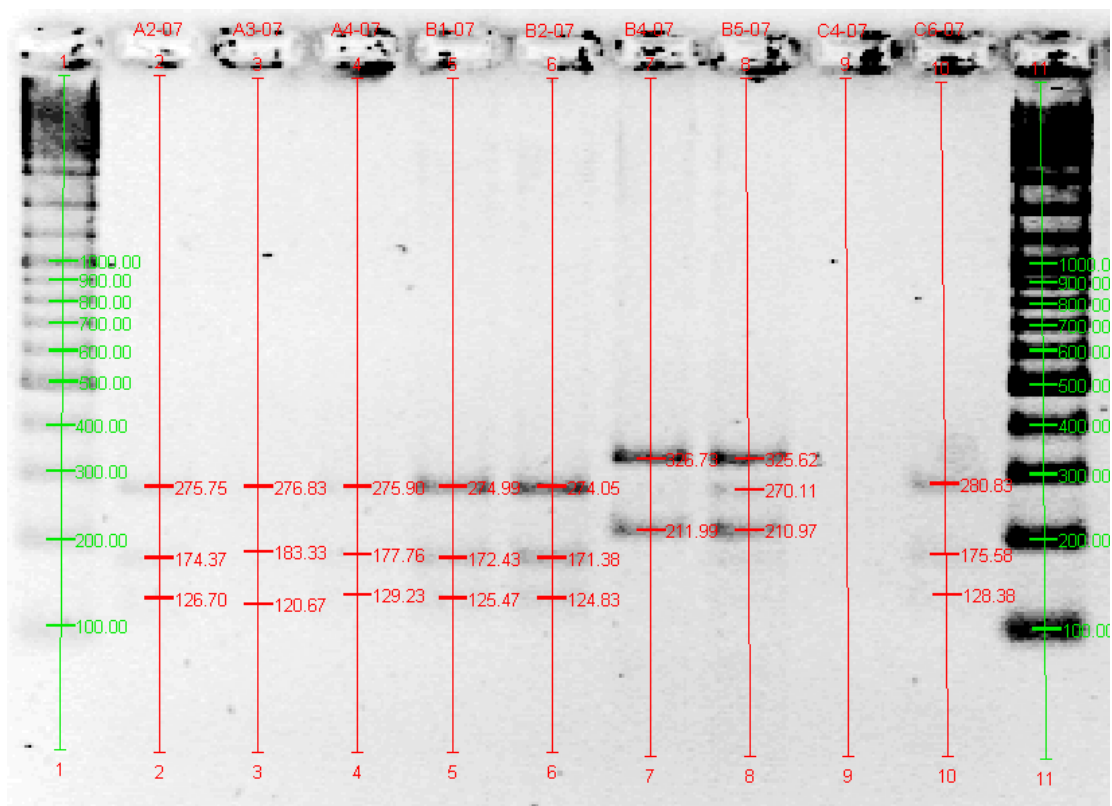
Test		<i>Pichia anomala</i>	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Candida oleophila</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
N1	nitrat	+	+	+	+	-	-
N2	nitrit	+	+	-	-	-	-
N3	etilamin	+	+	+	+	+	+
N4	L-lizin	+	-	+	+	+	+
N5	kadaverin	+	-	+	+	+	+
O1	0,01 % cikloheksimid	-	-	-	-	+	+
O2	0,1 % cikloheksimid	-	-	-	-	+	-
T1	rast pri 25°C	+	+	+	+	+	+
T2	rast pri 30°C	+	-	+	+	+	+
T3	rast pri 35°C	+	-	+	-	-	+
E1	roza obarvnost kolonije	-	-	-	-	-	+
E2	brstenje	+	+	+	+	+	-
E3	limonasta oblika celic	-	-	-	+	-	-
E4	brsti na peclju	-	-	-	-	-	-
E5	cepitvev celic	-	-	-	-	-	-
E6	filamenti	-	-	-	+	-	-
E7	pseudofilamenti	-	-	-	-	+	-
E8	septirane hife	-	-	-	-	-	-
E9	artrokonidiji	-	-	-	-	-	-
E10	balistokonidiji	-	-	-	-	-	-
A1	askospore	-	-	-	-	-	-



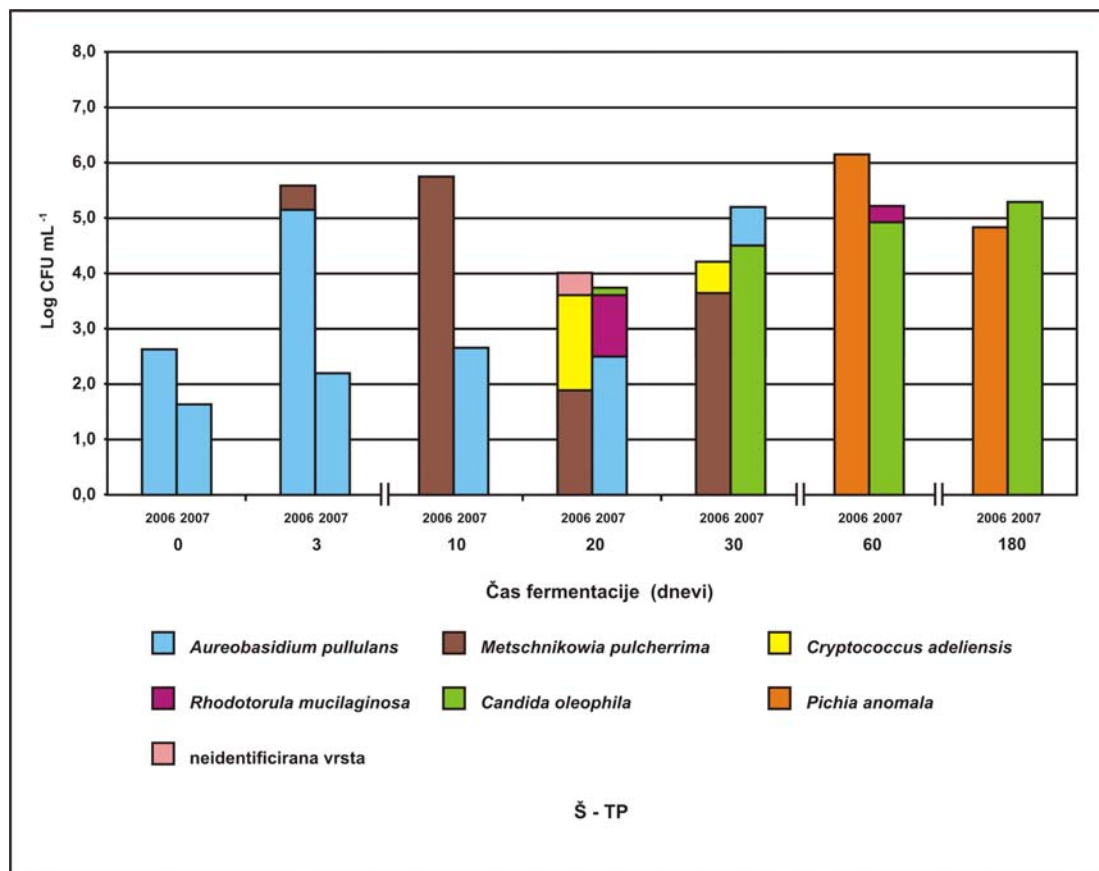
Slika 24: Restriksijski fragmenti *CfoI*
Fig. 24: Restriction fragments *CfoI*



Slika 25: Restriksijski fragmenti *HaeIII*
Fig. 25: Restriction fragments *HaeIII*



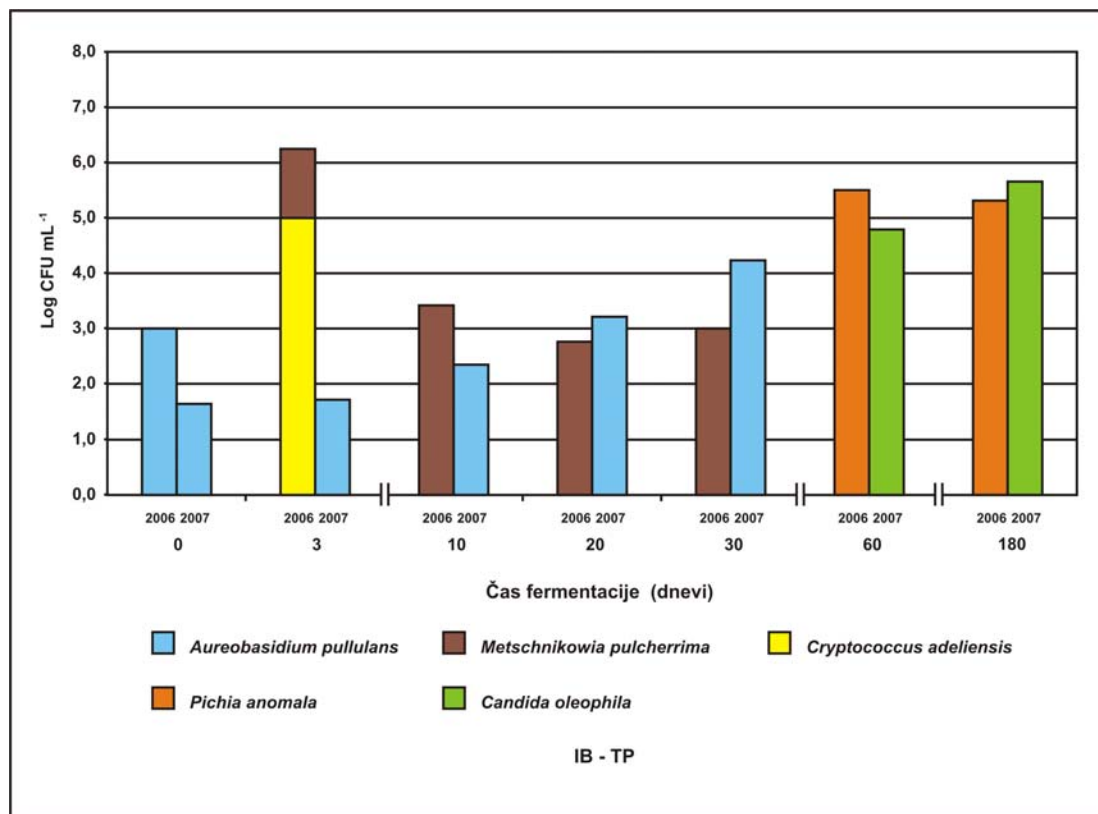
Slika 26: Restriksijski fragmenti *Hin*I
Fig. 26: Restriction fragments *Hin*I



Slika 27: Populacijska dinamika med tradicionalnim načinom fermentacije (TP) namiznih oljk 'Štorta' (Š), letnik 2006 in letnik 2007

Fig. 27: Yeast population dynamics during fermentation of 'Štorta' (Š) table olives, produced with traditional technology (TP), crop years 2006 and 2007

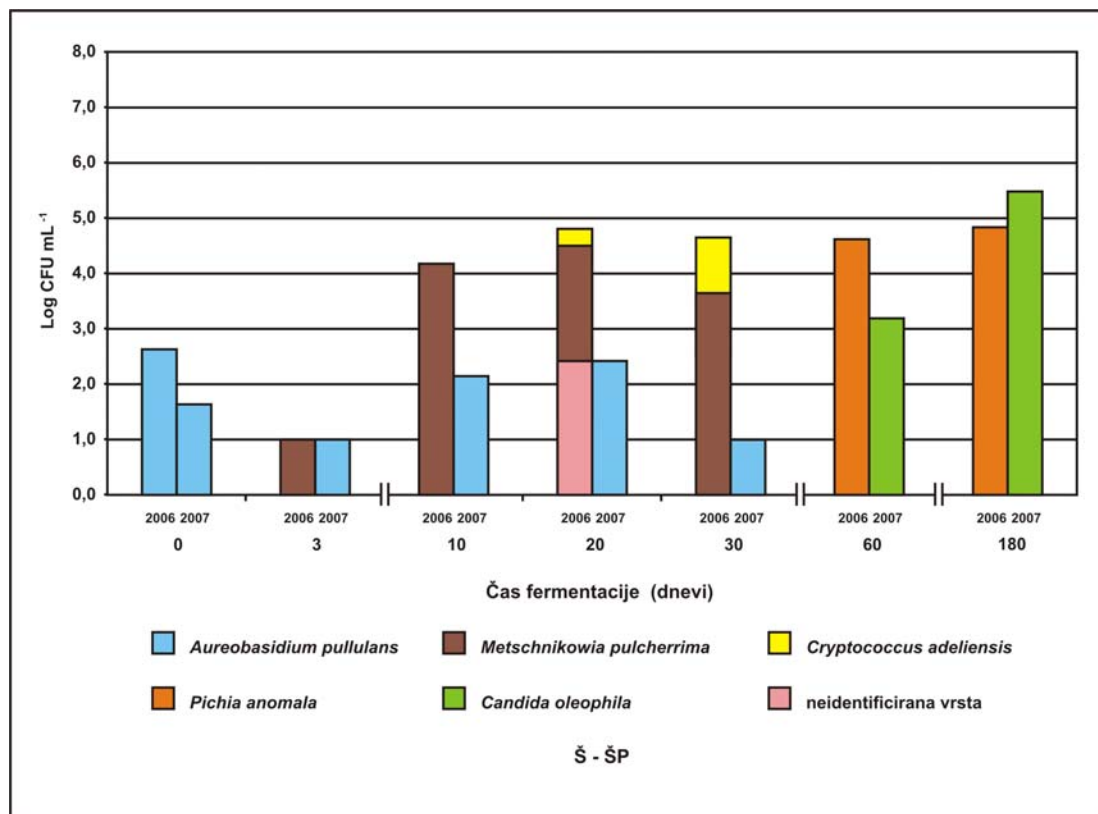
Iz matične raztopine plodov pred predelavo (Š) letnika 2006 in 2007 smo izolirali vrsto *Aureobasidium pullulans*. Kvasovko *Metschnikowia pulcherrima* smo izolirali že po treh dneh fermentacije iz namiznih oljk Š, ki smo jih predelali na TP (letnik 2006). Iz vzorcev letnika 2006 smo po 20-ih dneh fermentacije izolirali tudi vrsto *Cryptococcus adeliensis*, v vzorcih letnika 2007 pa smo v istem obdobju ugotovili prisotnost vrst *Rhodotorula mucilaginosa* in *Candida oleophila*. Po 60-ih dneh fermentacije smo v vzorcih letnika 2006 določili prisotnost kvasovke *Pichia anomala*.



Slika 28: Populacijska dinamika med tradicionalnim načinom fermentacije (TP) namiznih oljk 'Istrska belica' (IB), letnik 2006 in letnik 2007

Fig. 28: Yeast population dynamics during fermentation of 'Istrska belica' (IB) table olives, produced with traditional technology (TP), crop years 2006 and 2007

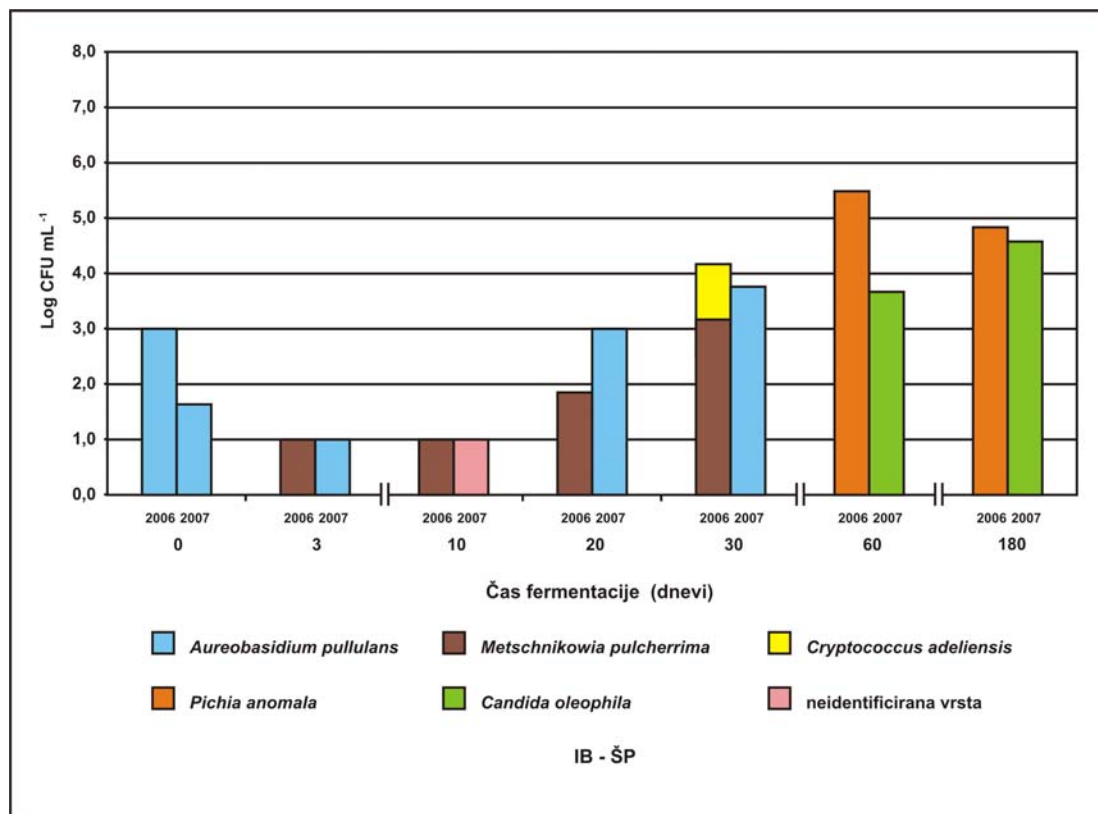
Iz matične raztopine plodov pred predelavo (IB) letnika 2006 in 2007 smo izolirali vrsto *Aureobasidium pullulans*. Po treh dneh fermentacije namiznih oljk IB na TP smo v vzorcih letnika 2006 izolirali kvasovko *Metschnikowia pulcherrima* in *Cryptococcus adeliensis*. Po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije smo v vzorcih letnika 2006 določili prisotnost kvasovke *Pichia anomala*, v vzorcih letnika 2007 pa prisotnost vrste *Candida oleophila*. Iz ostalih vzorcev letnika 2007 pa smo uspeli identificirati le vrsto *Aureobasidium pullulans*.



Slika 29: Populacijska dinamika med modificiranim španskim načinom fermentacije (ŠP) namiznih oljk 'Štorta' (Š), letnik 2006 in letnik 2007

Fig. 29: Yeast population dynamics during fermentation of 'Štorta' (Š) table olives, produced with modified Spanish style technology (ŠP), crop years 2006 and 2007

Iz matične raztopine plodov pred predelavo (Š) letnika 2006 in 2007 smo izolirali vrsto *Aureobasidium pullulans*. Po treh dneh fermentacije namiznih oljk Š na ŠP smo v vzorcih letnika 2006 izolirali vrsto *Metschnikowia pulcherrima*, po 20-ih dneh pa določili tudi prisotnost vrste *Cryptococcus adeliensis*. Po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije smo v vzorcih letnika 2006 določili prisotnost kvasovke *Pichia anomala*, v vzorcih letnika 2007 pa prisotnost vrste *Candida oleophila*. Iz ostalih vzorcev letnika 2007 smo uspeli izolirati in identificirati le vrsto *Aureobasidium pullulans*.



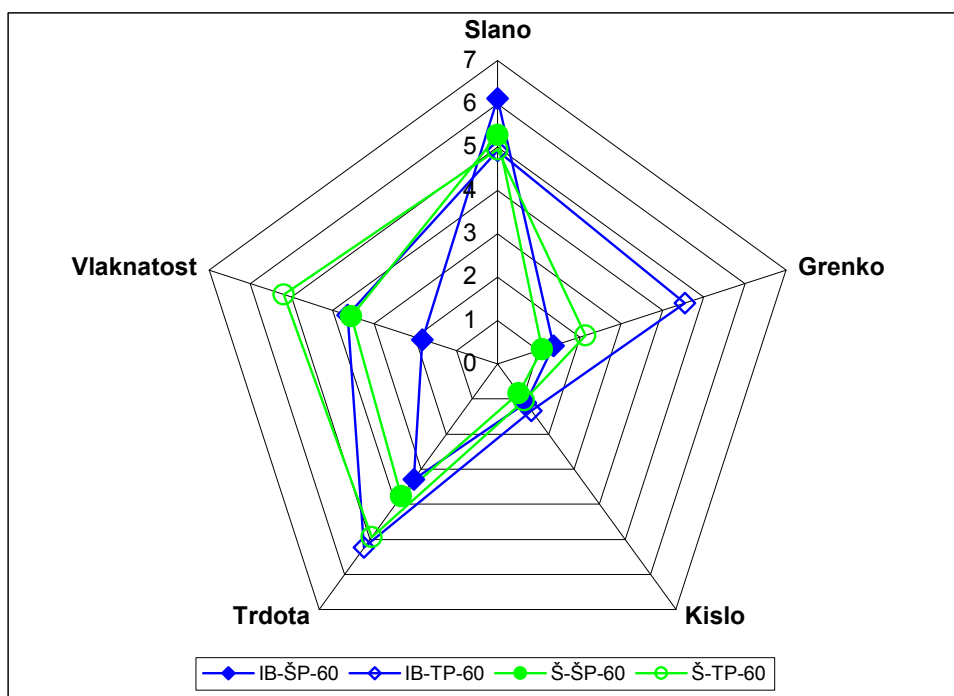
Slika 30: Populacijska dinamika med modificiranim španskim načinom fermentacije (ŠP) namiznih oljk 'Istrska belica' (IB), letnik 2006 in letnik 2007

Fig. 30: Yeast population dynamics during fermentation of 'Istrska belica' (IB) table olives, produced with modified Spanish style technology (ŠP), crop years 2006 and 2007

Iz matične raztopine plodov pred predelavo (IB) letnika 2006 in 2007 smo izolirali vrsto *Aureobasidium pullulans*. Po treh dneh fermentacije namiznih oljk IB na ŠP smo v vzorcih letnika 2006 izolirali vrsto *Metschnikowia pulcherrima*, po 30-ih dneh pa določili tudi prisotnost vrste *Cryptococcus adeliensis*. Po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije smo v vzorcih letnika 2006 določili prisotnost vrste *Pichia anomala*, v vzorcih letnika 2007 pa prisotnost vrste *Candida oleophila*. Iz ostalih vzorcev letnika 2007 smo uspeli izolirati in identificirati le vrsto *Aureobasidium pullulans*.

4.12 REZULTATI SENZORIČNEGA OCENJEVANJA NAMIZNIH OLJK

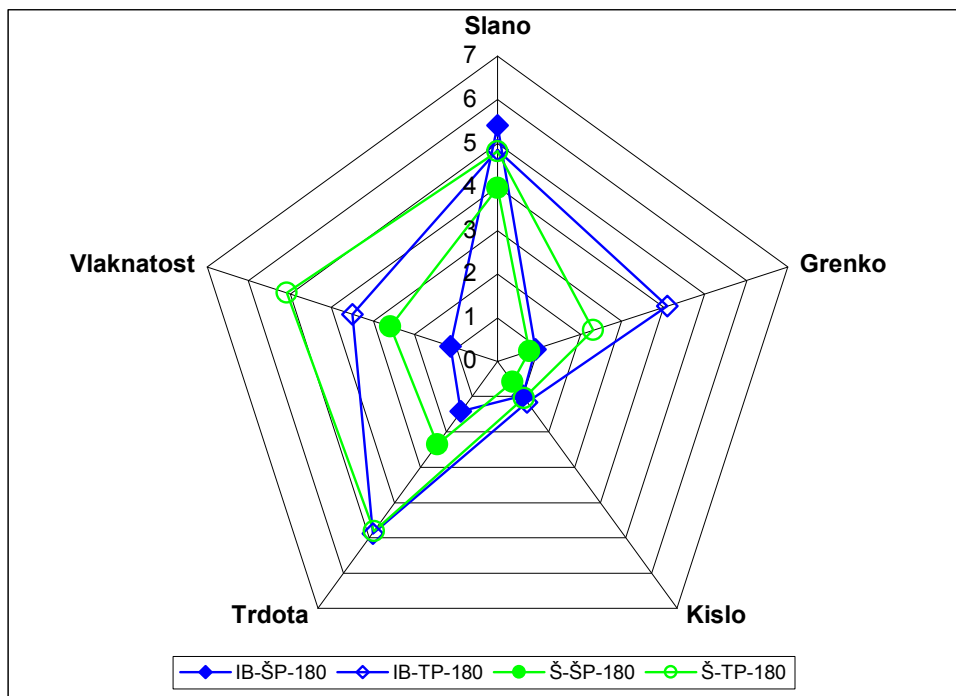
Senzorične značilnosti namiznih oljk smo ovrednotili po 60-ih in 180-ih dneh predelave. Na slikah 31, 32, 33, 34, 35 in 36 so prikazane povprečne vrednosti median dveh letnikov za posamezno senzorično značilnost. Senzorično smo ocenili vzorce namiznih oljk letnika 2006 in 2007. V nekaterih vzorcih oz. paralelkah letnika 2007 smo zaznali negativno senzorično značilnost po plesnivem, vendar je bila izračunana mediana za omenjeno značilnost 0 in zato jo ne podajamo v grafičnem prikazu. Poškodovana je bila tudi tekstura omenjenih vzorcev, zato so bile namizne oljke zelo mehke in s slabše izraženimi pozitivnimi senzoričnimi značilnostmi. Pri namiznih oljkah, predelanih na ŠP in fermentiranih 180 dni, smo opazili veliko razliko v trdoti plodov.



Slika 31: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, po 60-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov

Fig. 31: Graphic representation of the characteristics of 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB) table olives, produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, after 60 days of fermentation; average value of the median of two crop years

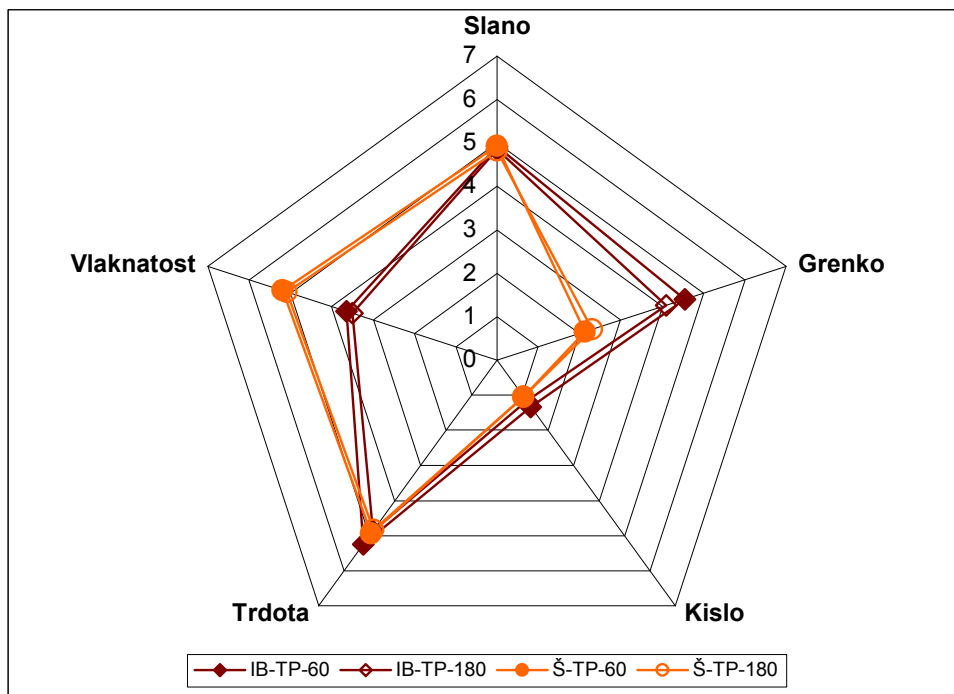
Namizne oljke, predelane na TP, so bile po 60-ih dneh fermentacije bolj grenke, trde in vlaknate v primerjavi z namiznimi oljkami, ki smo jih predelali na ŠP. Namizne oljke sorte 'Štorta' so, ne glede na način predelave, v primerjavi z namiznimi oljkami sorte 'Istrska belica', imele bolj intenzivno zaznano vlaknatost.



Slika 32: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, po 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov

Fig. 32: Graphic representation of the characteristics of 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB) table olives, produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, after 180 days of fermentation; average value of the median of two crop years

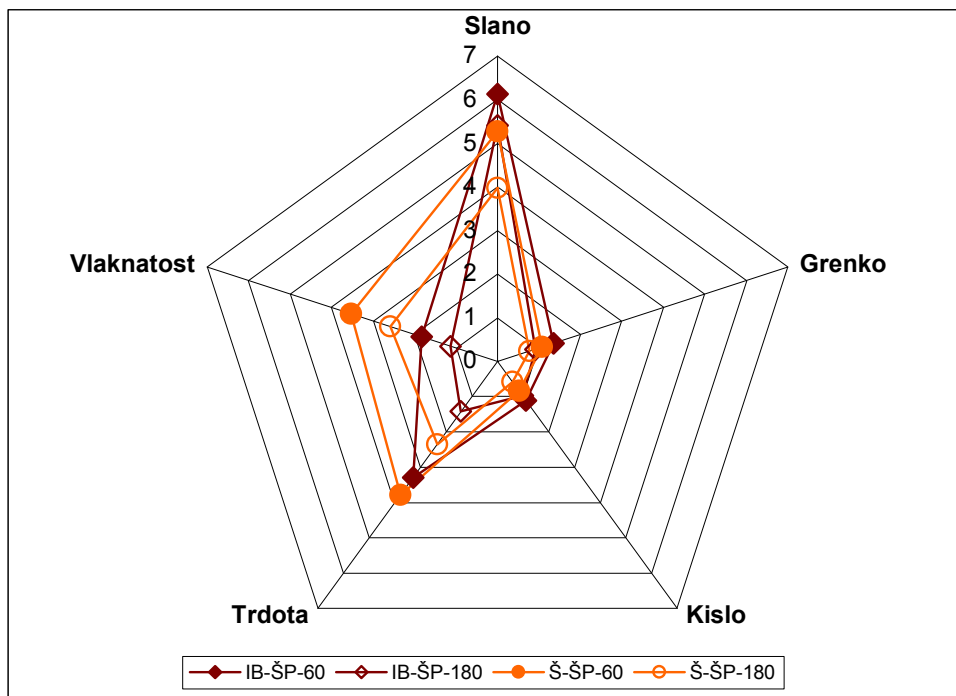
Primerjava senzoričnih značilnosti namiznih oljk po 180-ih dneh fermentacije (slika 32) kaže, da so bile oljke, predelane na TP, bolj grenke, imele večjo trdoto ter bolj intenzivno vlaknatost kot oljke, predelane na ŠP. Prav tako smo ugotovili razliko med sortama, in sicer so bile namizne oljke sorte 'Štorta' bolj vlaknate kot vzorci namiznih oljk 'Istrska belica'.



Slika 33: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni način (TP), po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov

Fig. 33: Graphic representation of the characteristics of 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB) table olives, produced with traditional technology (TP), after 60 and 180 days of fermentation; average value of the median of two crop years

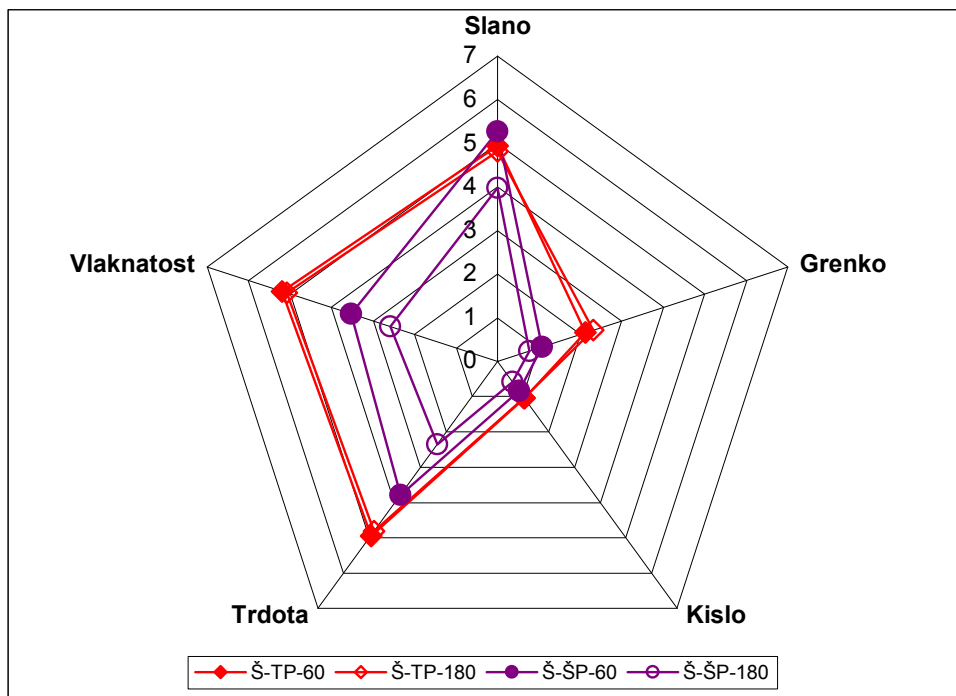
Namizne oljke Š in IB, ki smo jih predelali na TP, so po 180-ih dneh fermentacije ohranile primerno grenkobo, enako trdoto in vlaknatost.



Slika 34: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š) in 'Istrska belica' (IB), predelanih na modificirani španski način (ŠP), po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov

Fig. 34: Graphic representation of the characteristics of 'Štorta' (Š) and 'Istrska belica' (IB) table olives, produced with modified Spanish style technology (ŠP), after 60 and 180 days of fermentation; average value of the median of two crop years

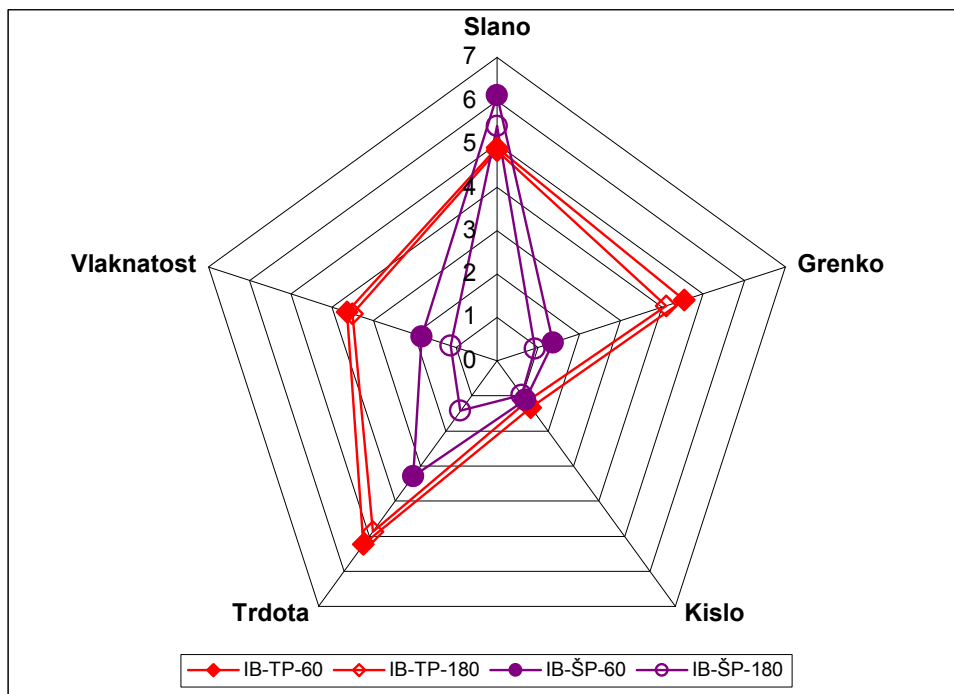
Namizne oljke Š in IB, ki smo jih predelali na ŠP, so po 180-ih dneh fermentacije bile manj trde in vlaknate. Na podlagi senzoričnega ocenjevanja smo ugotovili, da so namizne oljke predelane na ŠP po 180-ih dneh fermentacije zelo mehke in neprimerne teksture.



Slika 35: Aromogram namiznih oljk 'Štorta' (Š), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov

Fig. 35: Graphic representation of the characteristics of 'Štorta' (Š) table olives, produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, after 60 and 180 days of fermentation; average value of the median of two crop years

Namizne oljke sorte 'Štorta', predelane na TP, so po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije ohranile primerne senzorične značilnosti, medtem ko so bili vzorci namiznih oljk, predelanih na ŠP, po 180-ih dneh fermentacije opazno slabše senzorično ocenjeni.



Slika 36: Aromogram namiznih oljk 'Istrska belica' (IB), predelanih na tradicionalni (TP) in modificirani španski (ŠP) način, po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije; povprečne vrednosti median dveh letnikov
Fig. 36: Graphic representation of the characteristics of 'Istrska belica' (IB) table olives, produced with traditional (TP) and modified Spanish style (ŠP) technology, after 60 and 180 days of fermentation; average value of the median of two crop years

Tudi namizne oljke sorte 'Istrska belica', predelane na TP, so po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije ohranile primerne senzorične značilnosti, medtem ko so bili vzorci, predelani na ŠP in fermentirani 180 dni, opazno slabše ocenjeni.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V raziskavi smo proučevali vpliv tehnoloških postopkov na kakovost namiznih oljk Slovenske Istre sort 'Štorta' in 'Istrska belica'. Spremljali smo antioksidativno učinkovitost ter vsebnost in sestavo biofenolov s poudarkom na hidrokstitirosolu in tirosolu, identificirali smo nekatere značilne vrste kvasovk, ki vodijo spontano fermentacijo namiznih oljk in končni izdelek tudi senzorično ovrednotili.

Predelavo namiznih oljk smo izvedli na tradicionalni in modificirani španski način in med predelavo spremljali fizikalnokemijske parametre kakovosti, ki jih predpisuje Tržni standard o namiznih oljkah (Trade standard applying to table olives, 2004). V okviru tega smo merili vrednost pH in koncentracijo slanice namiznih oljk ter analizirali vsebnost prostih kislin v slanici. Ugotovili smo, da se je vrednost pH slanice s časom fermentacije postopoma znižala, vsebnost prostih kislin pa povečala. Z računalniškim programom SSPS smo izvedli Levenov test in s tem preverili homogenost varianc ter t-test za vrednotenje značilnih statističnih razlik med povprečnimi vrednostmi rezultatov. Ugotovili smo, da se je vrednost pH vzorcev slanice statistično značilno razlikovala (t-test, $\alpha < 0,05$) glede na to ali so bile oljke predelane na tradicionalni ali na modificirani španski način, in sicer je imela slanica namiznih oljk, ki smo jih predelali na tradicionalni način, manjšo vrednost pH. Ugotovili smo tudi, da končne vrednosti preiskovanih parametrov niso skladne z mejnimi vrednostmi, ki jih predpisuje tržni standard, zato je potrebno namizne oljke zakisati in/ali termično obdelati oziroma pasterizirati. Spremljanje koncentracije slanice med fermentacijo je pokazalo, da jo je potrebno dnevno izvajati. Zlasti v prvih dneh fermentacije se je zaradi osmoze koncentracija slanice zmanjševala. Ravnotežje med slanico in plodovi se vzpostavi šele po nekaj dneh fermentacije, in sicer pri modificiranem španskem načinu nekoliko prej kot pri tradicionalnem načinu predelave.

Eden izmed osnovnih ciljev raziskave je bil spremljati vpliv dveh tehnologij predelave na vsebnost skupnih biofenolov, hidrokstitirosola in tirosola ter na antioksidativno učinkovitost namiznih oljk predelanih iz sort 'Štorta' in 'Istrska belica'. Tako vsebnost in sestavo biofenolov kot antioksidativno učinkovitost smo določili v plodovih pred predelavo ter v namiznih oljkah po 60 in 180 dneh fermentacije.

Vsebnost skupnih biofenolov, hidrokstitirosola in tirosola smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) in pri tem uporabili modificirano metodo, ki so jo razvili Cortesi, Rovellini in Fusari (2002). Raziskovalci so metodo razvili za določevanje vsebnosti biofenolov v oljčnem olju in je sprejeta pri Mednarodnem svetu za oljke (IOC). Omogoča določitev vsote naravnih in oksidiranih derivatov oleuropeina in ligstrozida ter lignane, flavonoide in fenolne kisline z UV detekcijo pri 280 nm. Vsebnost skupnih biofenolov smo določili tudi spektrofotometrično s Folin-Ciocalteujevim reagentom oziroma po Gutfingerju (1981). Antioksidativno učinkovitost namiznih oljk smo določili z radikalom DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) po metodi, ki jo opisujejo Brand-Williams, Cuvelier in Berset (1995).

Tako s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti kot s spektrofotometrično analizo smo v plodovih sorte 'Istrska belica' določili večjo vsebnost skupnih biofenolov kot v plodovih sorte 'Štorta'. S HPLC analizo je bil ta delež v 'Istrski belici' za 39 % (v letu 2006) oziroma 34 % (v letu 2007) večji, s spektrofotometrično analizo pa za 36 % (letnik 2006) in za 12 % (letnik 2007). Tudi s statistično obdelavo podatkov smo ugotovili, da so se plodovi obravnavanih sort statistično značilno razlikovali (t-test, $\alpha < 0,05$) v vsebnosti skupnih biofenolov. Pri vrednotenju rezultatov smo izračunali Pearsonov korelacijski koeficient in ugotovili pozitivne zveze med spektrofotometrično določitvijo vsebnosti skupnih biofenolov in HPLC analizo le-teh ($r=0,992$). Marsilio in sod. (2006) poročajo, da se vsebnost skupnih biofenolov bistveno razlikuje med različnimi sortami oljk in da je vsebnost le teh odvisna tudi od letnika pridelave, gnojenja oziroma dostopnosti hranil in vremenskih dejavnikov. V plodovih oljk smo pred predelavo določili tudi vsebnost hidroksitirosola in tirosole in ugotovili, da se sorti statistično ne razlikujeta v vsebnosti omenjenih komponent. Prav tako smo ugotovili, da se plodovi obeh obravnavanih sort razlikujejo tudi v antioksidativni učinkovitosti; večjo antioksidativno učinkovitost so imeli plodovi sorte 'Štorta', med $1,1534 \text{ mg}^{-1}$ in $1,4301 \text{ mg}^{-1}$, medtem ko so bile vrednosti v plodovih 'Istrska belica' med $1,1779 \text{ mg}^{-1}$ in $1,3923 \text{ mg}^{-1}$.

Ob zastavitvi raziskave smo predpostavili, da tehnologija predelave vpliva na vsebnost in sestavo antioksidantov. Ugotovili smo statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) v vsebnosti skupnih biofenolov, določenih s HPLC in spektrofotometrično, ter v antioksidativni učinkovitosti namiznih oljk, predelanih na tradicionalni oziroma modificirani španski način. V vzorcih namiznih oljk, predelanih na tradicionalni način, smo določili večjo vsebnost skupnih biofenolov ($544\text{-}5803 \text{ mg/kg}$ s HPLC in $531\text{-}3649 \text{ mg/kg}$ spektrofotometrično) kot v vzorcih, predelanih na modificirani španski način ($44\text{-}183 \text{ mg/kg}$ s HPLC in $40\text{-}167 \text{ mg/kg}$ spektrofotometrično). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi avtorji. Blekas in sod. (2002) so, na primer, proučevali vsebnost skupnih biofenolov v zelenih namiznih oljkah, ki so jih predelali na španski način, v črnih namiznih oljkah, ki so jih predelali na naravni način in v namiznih oljkah sorte 'Kalamata'. Poročajo, da vzorci, ki so jih predelali iz sorte 'Kalamata' vsebujejo največ biofenolov (1046 mg/kg), sledijo vzorci črnih (708 mg/kg) in zelenih namiznih oljk (632 mg/kg). Razlike v vsebnosti skupnih biofenolov so pripisali vplivu tehnologije predelave.

V opravljeni raziskavi smo ugotovili, da tehnološki način predelave vpliva tudi na sestavo biofenolov. V namiznih oljkah, predelanih na tradicionalni način, smo določili večjo vsebnost hidroksitirosola ($54\text{-}995 \text{ mg/kg}$) in tirosole ($14\text{-}129 \text{ mg/kg}$) kot v namiznih oljkah, predelanih na modificirani španski način ($5\text{-}29 \text{ mg/kg}$ hidroksitirosola in $4\text{-}11 \text{ mg/kg}$ tirosole). Ugotovili smo tudi pozitivno zvezo med vsebnostjo hidroksitirosola in tirosole ($r=0,824$). Podobno raziskavo so izvedli Romero in sod. (2004 b). Proučevali so vpliv naravnega načina fermentacije namiznih oljk na sestavo biofenolov in ugotovili, da se zaradi encimske hidrolize vsebnost oleuropeina in hidroksitirosole-4- β -glukoze zmanjša, medtem ko se vsebnost hidroksitirosola poveča.

Proučevanje vpliva tehnologije predelave na antioksidativno učinkovitost namiznih oljk je pokazalo, da imajo vzorci namiznih oljk, predelani na tradicionalni način, iz sorte 'Štorta', $6,5\text{-}22,2$ -krat večjo antioksidativno učinkovitost, vzorci iz sorte 'Istrska belica' pa $18,5\text{-}41,5$ -krat večjo antioksidativno učinkovitost kot vzorci, ki so jih predelali na modificirani španski način.

Obdelava podatkov je pokazala, da obstaja med obravnavanima sortama namiznih oljk, predelanih na tradicionalni način, statistično značilna razlika (t -test, $\alpha < 0,05$) v vsebnosti skupnih biofenolov in antioksidativni učinkovitosti. Vzorci namiznih oljk 'Istrska belica' so, podobno kot plodovi, imeli v primerjavi z namiznimi oljkami 'Štorta' večjo vsebnost skupnih biofenolov (analiziranih tako s spektrofotometrično analizo kot s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti) ter večjo antioksidativno učinkovitost. S spektrofotometrično analizo smo določili od 531 mg/kg (namizne oljke 'Štorta', letnika 2006, po 180-ih dneh fermentacije) do 3649 mg/kg (namizne oljke 'Istrska belica', letnika 2007, po 60-ih dneh fermentacije) skupnih biofenolov. O vplivu sorte na vsebnost biofenolov v namiznih oljkah poročajo tudi drugi avtorji. Boskou in sod. (2006) so, na primer, analizirali vsebnost skupnih biofenolov v tržnih vzorcih namiznih oljk grškega porekla in ugotovili, da se vzorci različnih sort glede na vsebnost skupnih biofenolov zelo razlikujejo. Vrednosti, ki jih podajajo, se gibljejo med 820 in 1710 mg/kg skupnih biofenolov.

Tudi glede vsebnosti fenolnih spojin hidroksitirosola in tirosola ugotavljamo, da so se namizne oljke obravnavanih sort med seboj razlikovale, vendar le tedaj, ko so bile predelane na tradicionalni način. Vsebnost hidroksitirosola je bila v tako predelanih oljkah v primeru 'Istrske belice' 1,7-2,7-krat večja kot v namiznih oljkah 'Štorta', vsebnost tirosola pa 1,6-2,6-krat večja. Tudi Romero in sod. (2004 a) so proučevali razlike med sortami oljk v vsebnosti hidroksitirosola in tirosola in ugotovili, da obstajajo med sortami razlike tako v vsebnosti hidroksitirosola kot tirosola.

Do popolnoma drugačnih ugotovitev pa smo prišli pri proučevanju vpliva sort oljk, predelanih na modificirani španski način, saj se vsebnost hidroksitirosola in tirosola med sortama ni razlikovala.

V namiznih oljkah 'Istrska belica' smo določili tudi največjo antioksidativno učinkovitost ($0,7049 \text{ mg}^{-1}$), in sicer v vzorcih, predelanih na tradicionalni način, po 60-ih dneh fermentacije, letnika 2006. Antioksidativna učinkovitost omenjenih vzorcev je bila v primerjavi z namiznimi oljkami 'Štorta' 2,9-krat večja. Ugotovili smo pozitivno zvezo med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih biofenolov, ki smo jih določili spektrofotometrično ($r=0,982$) in s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti ($r=0,973$). Pri pregledu podatkov iz literature smo ugotovili, da Bianco in sod. (2006) pripisujejo hidroksitirosolu pomembno antioksidativno delovanje.

Te ugotovitve ne veljajo za vzorce namiznih oljk obravnavanih sort, če so bile predelane na modificirani španski način. Tudi v tem primeru, podobno kot v vsebnosti in sestavi biofenolov, med sortama ni statistično značilnih razlik v antioksidativni učinkovitosti.

V okviru ugotavljanja kakovosti namiznih oljk je naša raziskava poleg vpliva tehnološkega postopka proučevala tudi vpliv časa fermentacije. Analize smo izvajali po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije oljk. Po 60-ih dneh fermentacije se je v namiznih oljkah, predelanih na tradicionalni način, ohranil razmeroma velik delež skupnih biofenolov. V namiznih oljkah 'Istrska belica' se je vsebnost skupnih biofenolov, določenih s HPLC, zmanjšala za 61,6 %, v namiznih oljkah 'Štorta' pa za 84,6 %, medtem ko se je po 180-ih dneh fermentacije vsebnost skupnih biofenolov v namiznih oljkah 'Istrska belica' zmanjšala za 79,9 %, v namiznih oljkah 'Štorta' pa za 90,5 %. Glede zmanjšanja vsebnosti skupnih biofenolov med fermentacijo zasledimo v literaturi precej različne ugotovitve. V raziskavi iz leta 2006 (Marsilio in sod., 2006) poročajo, na primer, da se je v treh mesecih fermentacije vsebnost skupnih biofenolov zmanjšala le za 35-45 %. Medtem ko so izsledki

novejše raziskave avtorjev Ben Othmana in sod. (2009) precej podobni našim ugotovitvam. Proučevali so namizne oljke sorte 'Chétoui', predelane na naravni način, in ugotovili, da se je v prvih 67-ih dneh fermentacije vsebnost skupnih biofenolov v zelenih namiznih oljkah zmanjšala za 58 %, v delno obarvanih namiznih oljkah pa za 55 %.

Tudi s spektrofotometrično metodo smo prišli do podobnih ugotovitev. V vzorcih namiznih oljk 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način (60 dni fermentacije), smo ugotovili, da se je vsebnost skupnih biofenolov, zmanjšala za 57 % (letnik 2006) in za 49 % (letnik 2007). Do bistveno večjega zmanjšanja vsebnosti skupnih biofenolov pa je prišlo v vzorcih namiznih oljk 'Štorta', in sicer 81 % v vzorcih letnika 2006 in 70 % v vzorcih letnika 2007. Popolnoma drugače je čas fermentacije vplival na vsebnost skupnih biofenolov v namiznih oljkah, predelanih na modificirani španski način, saj se je njihova vsebnost že v 60-ih dneh fermentacije drastično zmanjšala.

Primerjava vsebnosti hidroksitirosola in tirosola v plodovih oljk pred predelavo in v namiznih oljkah po predelavi je pokazala, da slednje vsebujejo več omenjenih komponent. Iz tega smo sklepali, da na vsebnost hidroksitirosola in tirosola vpliva čas fermentacije. Namizne oljke, predelane na tradicionalni način, so po 60-ih dneh fermentacije vsebovale 2,0-17,2-krat več hidroksitirosola in 0,7-3,3-krat več tirosola kot plodovi pred predelavo. Največjo vsebnost hidroksitirosola in tirosola smo določili v namiznih oljkah 'Istrska belica' po 60-ih dneh fermentacije in ob uporabi tradicionalnega načina predelave. Najmanjšo vsebnost hidroksitirosola in tirosola pa smo določili po 180-ih dneh fermentacije, in sicer v vzorcih, predelanih na modificirani španski način. Dobljene rezultate smo primerjali s podatki iz literature in prišli do podobnih ugotovitev kot Ben Othman in sod. (2009), ki so proučevali antioksidante v namiznih oljkah sorte 'Chétoui'. Ugotovili so, da je bila večja vsebnost hidroksitirosola v zaključni fazi fermentacije posledica encimske hidrolize oleuropeina. Arroyo López in sod. (2005) so spremljali vsebnost antioksidantov v plodovih pred predelavo in v namiznih oljkah, ki so jih zarezali. Ugotovili so, da se tudi v zarezanih namiznih oljkah vsebnost tirosola in hidroksitirosola s trajanjem fermentacije povečuje. Ravno tako so Marsilio in sod. (2001) po 4 mesecih hranjenja plodov v 8 % slanici ugotovili, da se je vsebnost oleuropeina znatno zmanjšala, hkrati pa so določili večjo koncentracijo aglikonov oleuropeina in hidroksitirosola.

Pri spremljanju antioksidativne učinkovitosti namiznih oljk smo ugotovili, da so največjo vrednost ($0,7049 \text{ mg}^{-1}$) imeli vzorci namiznih oljk 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način, letnika 2006 po 60-ih dneh fermentacije, najmanjšo vrednost ($0,0100 \text{ mg}^{-1}$) pa so imeli vzorci namiznih oljk 'Štorta', predelani na modificirani španski način po 180-ih dneh fermentacije. Rezultati raziskave, ki so jo nedavno opravili Ben Othman in sod. (2009), potrjujejo, da je antioksidativna učinkovitost namiznih oljk sorazmerna vsebnosti biofenolov. Z njihovimi ugotovitvami, da se vsebnost le-teh s časom fermentacije zmanjšuje, se ujemajo tudi naši rezultati. Pri proučevanju vpliva časa fermentacije na vsebnost in sestavo biofenolov ter na antioksidativno učinkovitost namiznih oljk, predelanih na modificirani španski način, smo ugotovili znatno zmanjšanje obravnavanih parametrov že po 60-ih dneh fermentacije, najmanjše vrednosti pa smo določili po 180-ih dneh fermentacije na omenjen način predelave. Ugotovili smo, da čas fermentacije pomembno vpliva na vsebnost in sestavo biofenolov ter na antioksidativno učinkovitost namiznih oljk, in sicer se vrednosti proučevanih parametrov s časom fermentacije zmanjšujejo.

Rezultati mikrobiološke raziskave in identifikacije mikroorganizmov so pokazali, da kvasovke vodijo fermentacijo namiznih oljk Slovenske Istre. Arroyo López in sod. (2006) poročajo, da so kvasovke ključnega pomena pri naravnem načinu fermentacije zelenih in črnih oljk v slanici, saj vodijo fermentacijo namiznih oljk v prisotnosti biofenolov, ki inhibirajo rast in delujejo toksično na mlečnokislinske bakterije. S statistično obdelavo podatkov smo, ne glede na tehnologijo predelave, ugotovili statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) v številu kvasovk med namiznimi oljkami 'Štorta' in 'Istrska belica'. V vzorcih namiznih oljk 'Štorta' smo določili večje število kvasovk. S statističnimi testi smo ovrednotili tudi vpliv letnika in ugotovili statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$), saj smo v vzorcih letnika 2006 določili večje število kvasovk kot v vzorcih letnika 2007. Uspešno smo izolirali in z analizo restriksijskih fragmentov regije ITS ribosomske DNA ter s fiziološkimi testi identificirali naslednje vrste kvasovk: *Pichia anomala*, *Cryptococcus adeliensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila* in *Rhodotorula mucilaginosa*. Nisiotou in sod. (2009) so v vzorcih grške sorte 'Conservolea', z restriksijsko analizo, poleg vrst *A. pullulans*, *R. mucilaginosa*, *Metschnikowia pulcherrima* in *P. anomala* identificirali še vrste *P. guilliermondi*, *P. kluyveri*, *P. membranifaciens*, *Candida aaseri*, *C. boidinii*, *Debaryomyces hansenii*, in *Saccharomyces cerevisiae*.

Pri raziskovanju populacijske dinamike kvasovk smo ugotovili, da je vrsta *Aureobasidium pullulans* domnevno prisotna na plodovih pred predelavo, saj smo obravnavano vrsto izolirali iz matične raztopine, ki smo jo pripravili iz sort 'Štorta' in 'Istrska belica' ($1-3 \log \text{CFU mL}^{-1}$). Vrsta *Aureobasidium pullulans* je dimorfna hifomiceta, ki raste na površini rastlin. Drugi avtorji (Arroyo López in sod., 2008) poročajo, da so v treh zaporednih letih na površini plodov nepredelanih oljk španskega porekla, sorte Manzanilla-Aloreña, ugotovili manjšo populacijo kvasovk ($< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$). Tudi Hernández in sod. (2007) poročajo, da so kvasovke prisotne na površini plodov v koncentraciji $3 \log \text{CFU mL}^{-1}$ in da so identificirali rod *Cryptococcus*. V vzorcih slanice namiznih oljk španskega porekla so določili najmanj $4,9 \log \text{CFU mL}^{-1}$ kolonij in ugotovili, da prevladujejo *Pichia anomala*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* in *Candida maris*. Pereira in sod. (2008) pa so v plodovih portugalskega porekla izolirali vrsto *Candida boidinii*. Pri proučevanju populacijske dinamike namiznih oljk Slovenske Istre smo v namiznih oljkah 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način, določili največjo rast kvasovk po treh dneh fermentacije ($5,95 \log \text{CFU mL}^{-1}$), medtem ko smo v vzorcih namiznih oljk 'Štorta', predelanih po isti tehnologiji določili največje število kvasovk po 60-ih dneh fermentacije ($5,87 \log \text{CFU mL}^{-1}$), čeprav se je populacija kvasovk že po treh dneh fermentacije namnožila do $5,31 \log \text{CFU mL}^{-1}$. Značilnosti populacijske dinamike namiznih oljk Slovenske Istre smo primerjali s podatki iz literature. Ugotovili smo, da so ne glede na različno geografsko okolje naši podatki primerljivi z rezultati tujih raziskav. Arroyo López in sod. (2006) poročajo, da se je populacija kvasovk v zelenih namiznih oljkah španskega porekla sorte 'Aloreña' po petih dneh fermentacije namnožila do koncentracije $6 \log \text{CFU mL}^{-1}$, v črnih namiznih oljkah 'Hojiblanca' pa so določili $4 \log \text{CFU mL}^{-1}$. Avtorji so tudi v novejši raziskavi (Arroyo López in sod., 2008) ugotovili, da se populacija kvasovk med fermentacijo namnoži od 4 do $7 \log \text{CFU mL}^{-1}$.

Po treh dneh fermentacije namiznih oljk 'Štorta' in 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni in modificirani španski način, smo v vzorcih letnika 2006 izolirali vrsto *Metschnikowia pulcherrima*. Na podlagi opravljenih fermentacijskih testov smo ugotovili, da ima vrsta sposobnost fermentacije D-glukoze iz česar sklepamo, da vrsta aktivno

sodeluje pri fermentaciji namiznih oljk. V vzorcih namiznih oljk 'Štorta', predelanih na tradicionalni način, smo poleg omenjene vrste določili prisotnost vrste *Aureobasidium pullulans*, medtem ko smo v namiznih oljkah 'Istrska belica' določili tudi nefermentabilno vrsto *Cryptococcus adeliensis*, pogosto izolirano iz površine grozdne jagode (Raspor, 2001). V istem obdobju fermentacije letnika 2007 smo izolirali le vrsto *Aureobasidium pullulans*. Drugi avtorji (Nisiotou in sod., 2009) poročajo, da vrsta *Metschnikowia pulcherrima* prevladuje v začetnih dneh fermentacije in je prisotna v 36-56 %. Nisiotou in sod. (2009) navajajo, da je na začetku fermentacije prisotna vrsta *Aureobasidium pullulans* (3-10 %) in vrsta *Rhodotorula mucilaginosa* (4-9 %).

Vrsto *Metschnikowia pulcherrima* smo izolirali tudi od 10. do 30. dneva fermentacije in sicer v vzorcih namiznih oljk, letnika 2006. V letu 2007 pa smo od 10. do 30. dneva fermentacije določili le prisotnost vrste *Aureobasidium pullulans*.

Po 20-ih dneh fermentacije namiznih oljk 'Štorta', predelanih na tradicionalni način, letnika 2006, smo izolirali vrsto *Cryptococcus adeliensis*, v vzorcih letnika 2007 pa v istem obdobju ugotovili prisotnost vrst *Rhodotorula mucilaginosa* in *Candida oleophila*. Vrsto *Cryptococcus adeliensis* smo izolirali tudi v vzorcih omenjene sorte, ki smo jih predelali z modificiranim španskim načinom, letnika 2006. Rodova *Cryptococcus* in *Candida* so iz namiznih oljk španskega porekla izolirali tudi Hurtado in sod. (2009). Nisiotou in sod. (2009) poročajo, da se heterogenost populacije spreminja s časom fermentacije, saj so ugotovili, da med 17. in 35. dnevom fermentacije prevladujejo fermentativne kvasovke *Pichia anomala*, *Pichia membranifaciens* in *Candida boidinii*.

Vrsti *Candida oleophila* in *Aureobasidium pullulans* smo določili po 30-ih dneh fermentacije namiznih oljk 'Štorta', predelanih na tradicionalni način, letnika 2007. Iz rezultatov raziskave smo ugotovili, da je bila vrsta *Candida oleophila* prisotna v predelanih vzorcih od 30. do 180. dneva fermentacije. S fermentacijskimi testi smo ugotovili, da vrsta *Candida oleophila* fermentira D-glukozo in D-galaktozo. Obravnavano vrsto smo določili tudi v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na modificirani španski način, in v namiznih oljkah 'Istrska belica' po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije. Tudi Pereira in sod. (2008) so iz namiznih oljk iz Portugalske izolirali rod *Candida* in identificirali so 5 vrst kvasovk, poleg teh pa še vrsto *Geotrichum penicillatum* in rod *Kloeckera* spp. Ugotovili so, da v slanici namiznih oljk prevladuje *Candida krusei*. Pereira in sod. (2008) navajajo, da so številni avtorji na podlagi kliničnih raziskav ugotovili, da sta *C. glabrata* in *C. krusei* kvasovki, ki ju pogosto izoliramo iz kliničnih vzorcev in da je prisotnost le-teh v slanici ali v namiznih oljkah povezana s kontaminacijo med predelavo in pakiranjem namiznih oljk predvsem zaradi pomanjkljive higiene. Avtorji navajajo, da je s stališča dobre proizvodne prakse in varnosti živil potrebno izboljšati in optimizirati predelavo namiznih oljk, ki jih na Portugalskem predelajo na tradicionalni način.

V zadnji fazi fermentacije namiznih oljk Slovenske Istre, letnika 2006, smo izolirali vrsto *Pichia anomala*. Dokazali smo, da vrsta *Pichia anomala* fermentira D-glukozo, D-galaktozo in saharozo in da je pomembna za fermentacijo namiznih oljk. Obravnavano vrsto smo določili po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije. Hurtado in sod. (2009) so pri predelavi španskih namiznih oljk 'Arbequina' izolirali rod *Pichia*. Coton in sod. (2006) so v črnih namiznih oljkah francoskega porekla poleg vrste *Pichia anomala* določili prisotnost vrst *Candida boidinii* in *Debaryomyces etchellsii*. Tudi Hernández in sod. (2007) poročajo, da so pri predelavi zelenih namiznih oljk portugalskega porekla izolirali vrsto *Pichia anomala*, tako kot so jo González Cancho in sod. (1975, cit. po Arroyo López in sod., 2008) izolirali v črnih oljkah španskega porekla, fermentiranih na naravni način.

V okviru raziskave smo proučili tudi rast mlečnokislinskih bakterij in ugotovili, da mlečnokislinske bakterije ne vodijo fermentacije namiznih oljk Slovenske Istre, saj smo pri odčitavanju rezultatov po inkubaciji ugotovili, da so bile plošče gojišča MRS negativne. Glede na podatke iz literature smo pričakovali, da se bodo poleg kvasovk razvile tudi mlečnokislinske bakterije, saj so Pereira in sod. (2008) ugotovili, da v delno obarvanih namiznih oljkah, ki so jih predelali po tradicionalnem postopku, vodijo fermentacijo kvasovke in mlečnokislinske bakterije. V preiskovanih vzorcih so določili večje število kvasovk, saj so v primerjavi z mlečnokislinskimi bakterijami bolj prilagodljive na stresno okolje oziroma na neugodne pogoje rasti kot sta povečana koncentracija soli in biofenolov. Tudi Panagou in sod. (2008) poročajo, da kvasovke vodijo fermentacijo črnih namiznih oljk, ki jih predelujejo ob povečani koncentraciji soli (10-14 %), medtem ko so Hurtado in sod. (2009) ugotovili, da zeleni plodovi sorte 'Arbequina' vsebujejo večjo količino biofenolov, ki inhibirajo rast mlečnokislinskih bakterij. Rezultati določanja vsebnosti biofenolov v plodovih in v namiznih oljkah Slovenske Istre so pokazali, da je vsebnost biofenolov zelo visoka. Domnevamo, da je povečana vsebnost skupnih biofenolov in hidroksitirosole negativno vplivala na rast mlečnokislinskih bakterij. Postavlja se problem bakteriostatičnega vpliva olevropeina in njegovih razgradnih produktov na mlečnokislinske bakterije (Brighigna, 1998), čeprav nekateri sevi vrste *Lactobacillus plantarum* lahko izkoristijo olevropein kot vir ogljika za rast. Prva stopnja biološke razgradnje olevropeina poteka zaradi delovanja β -glukozidaze. Nato pa se olevropein aglikon zaradi delovanja esteraz hidrolizira do elenolne kisline in hidroksitirosole. Brighigna (1998) poroča, da se heterofermentativne mlečnokislinske bakterije rodov *Leuconostoc* in *Pediococcus* pojavijo bolj poredko, le pri predelavi zelo zrelih plodov oziroma v namiznih oljkah, ki so jih predelali v manj koncentrirani slanici (pod 8 %) ob prisotnosti vrste *Lactobacillus plantarum*. Tudi Sánchez in sod. (2001) poročajo, da biofenoli inhibirajo rast mlečnokislinskih bakterij, vendar, v primerjavi z naravnim načinom predelave zelenih oljk, razgrenjevanje plodov z alkalijami lahko izboljša pogoje za potek fermentacije. Z drugega vidika pa visoke vrednosti pH upočasnijo rast in razvoj mlečnokislinskih bakterij. Medina in sod. (2007, 2008) so proučili antimikrobno delovanje naravno prisotnih antioksidantov v vzorcih namiznih oljk španskega porekla, ki so jih predelali iz sorte 'Manzanilla' in 'Gordal', na mlečnokislinske bakterije, ki vodijo fermentacijo obravnavanih oljk. Največjo antimikrobno delovanje so pripisali dialdehidni obliki dekarboksimetilelenolne kisline, ki je vezana na hidroksitirozol. Tudi dialdehidna oblika dekarboksimetilelenolne kisline in oleozid-11-metilni ester delujeta antimikrobno na vrsto *Lactobacillus pentosus*. Raziskovalci so poudarili, da so omenjene tri nove spojine, ki so jih identificirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z masnim detektorjem, antimikrobno bolj učinkovite v primerjavi z olevropeinom in hidroksitirosolom.

V okviru raziskave smo ugotovili pomembno vlogo kvasovk pri fermentacij namiznih oljk Slovenske Istre in potrdili prisotnost nekaterih vrst kvasovk, kot jih navajajo različni sodobni viri literature. Nekateri avtorji (Hernández in sod., 2007; Panagou in sod., 2008; Pereira in sod., 2008) poročajo, da fermentativne kvasovke pozitivno vplivajo na izoblikovanje senzoričnih značilnosti namiznih oljk in se lahko uporabijo tudi kot starterske kulture, saj imajo zelo nizko polisaharolitično aktivnost in s tem ne povzročajo mehčanja plodov oziroma sprememb v teksturi namiznih oljk. Istočasno pa lahko nekateri sevi kvasovk z encimsko razgradnjo polisaharidov celične stene namiznih oljk povzročajo

razkroj le-te in negativno vplivajo na kakovost končnega izdelka. Hernández in sod. (2007) so, na primer, identificirali nekatere seve kvasovk *Rhodotorula minuta* in *D. hansenii* v zelenih namiznih oljkah s polisaharolitično aktivnostjo. Drugi avtorji (Vaughn in sod., 1969, cit. po Arroyo López in sod., 2008) poročajo, da vrste *R. glutinis*, *R. minuta* in *R. rubra* lahko povzročajo filme oziroma opno na površini slanice in da lahko sintetizirajo poligalakturonaze, ki povzročajo mehčanje pri shranjevanju plodov. Pereira in sod. (2008) navajajo, da oksidativne kvasovke in plesni, ki rastejo na površini slanice, lahko porabijo oziroma oksidirajo nastalo mlečno kislino in zvišujejo pH slanice, kar negativno vpliva na stabilnost in na senzorične značilnosti namiznih oljk.

V okviru disertacije smo vpliv tehnoloških postopkov na kakovost namiznih oljk spremljali tudi s senzorično analizo. Senzorično ocenjevanje smo izvedli po smernicah Mednarodnega sveta za oljke (IOC). Ocenjevali smo tri definirane značilnosti: intenzivnost negativnih značilnosti, intenzivnost slanega, grenkega in kislega okusa ter intenzivnost kinestetičnih zaznav: trdoto in vlaknatost. Ocenjevanje je izvedel devetčlanski panel. Vsak preskuševalec je delal individualno in svoje ocene vnašal v ocenjevalni list. Rezultate smo obdelali tako, da smo izračunali mediano za posamezno senzorično značilnost. V senzorično ocenjevanje so bili vključeni vzorci namiznih oljk, predelanih po obeh postopkih (tradicionalnem in modificiranem španskem), po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije.

Ugotovili smo, da so namizne oljke, predelane s tradicionalnim načinom, tako po 60-ih kot 180-ih dneh fermentacije, bolj grenke, trde in vlaknate v primerjavi z namiznimi oljkami, predelanimi z modificiranim španskim načinom.

Statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) smo ugotovili za zaznavo grenkega, kislega in slanega okusa ter za oceno trdote namiznih oljk. Zaznava grenka, kislega in slanega okusa je bila bolj intenzivna v vzorcih namiznih oljk, predelanih na tradicionalni način. Statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) smo ugotovili tudi za oceno trdote predelanih namiznih oljk. Ugotovili smo, da so namizne oljke 'Istrska belica' bolj grenke in slane (t-test, $\alpha < 0,05$) v primerjavi z namiznimi oljkami 'Štorta' in da je bila trdota namiznih oljk, ki smo jih fermentirali 60 dni, v primerjavi z vzorci po 180-ih dneh fermentacije, bolj intenzivna. Ugotovili smo tudi pozitivno zvezo med zaznavo grenkega okusa namiznih oljk in vsebnostjo skupnih biofenolov, ki smo jih določili spektrofotometrično ($r=0,919$) in s HPLC ($r=0,890$), z vsebnostjo hidroksitirosola ($r=0,852$) in tirosola ($r=0,853$) ter z antioksidativno učinkovitostjo ($r=0,915$) namiznih oljk.

Na podlagi rezultatov senzorične analize smo ugotovili, da so bile namizne oljke 'Štorta', ne glede na uporabljeno tehnologijo predelave, v primerjavi z namiznimi oljkami 'Istrska belica' bolj vlaknate. Zaznava vlaknatosti je bila srednje intenzivna in nemoteča. Za namizne oljke 'Štorta' je bilo značilno, da se je mezokarp zlahka ločil od endokarpa oziroma koščice, kar je zaželeno. Ugotovili smo tudi, da vlaknatost vzorcev pozitivno korelira s trdoto ($r=0,873$) namiznih oljk.

Ugotovili smo, da je za obravnavani sorti tradicionalni način predelave bolj primeren, saj so namizne oljke tudi po 180-ih dneh fermentacije ohranile primerno grenkobo, trdoto in vlaknatost. Modificirani španski način predelave, ki vključuje začetno razgrenjevanje plodov v alkalnem mediju, ni najbolj primeren za predelavo lokalnih sort oljk, ker po 180-ih dneh fermentacije postanejo plodovi mehki in imajo manj intenzivno izražene senzorične značilnosti. Menimo, da bi morali pri predelavi lokalnih sort modificirati koncentracijo luga oziroma čas razgrenjevanja.

5.2 ZAKLJUČNE UGOTOVITVE

V raziskavi smo proučevali vpliv tradicionalnega in modificiranega španskega načina predelave na fizikalnokemijske, mikrobiološke in senzorične parametre namiznih oljk sort 'Štorta' in 'Istrska belica'. Na osnovi opravljenih poskusov in analiz smo prišli do pomembnih ugotovitev, s katerimi poskušamo potrditi postavljene hipoteze:

- pravilno smo predpostavljali, da način predelave oziroma uporabljeni tehnološki postopek vpliva na kakovost namiznih oljk oziroma na fizikalnokemijske, mikrobiološke in senzorične značilnosti;
- predvidevali smo, da tehnologija predelave vpliva na antioksidativno učinkovitost ter na vsebnost skupnih biofenolov, hidroksitirosola in tirosola. V namiznih oljkah, predelanih na tradicionalni način, smo ugotovili višje vrednosti obravnavanih parametrov;
- po pričakovanjih so značilnosti namiznih oljk odvisne od sorte. Raziskavo smo izvedli na dveh, za Slovensko Istro značilnih sortah oljk, 'Štorta' in 'Istrska belica'. Na osnovi poznavanja vsebnosti in sestave biofenolov ter značilnosti plodov obeh sort smo pravilno predvidevali, da bodo tudi vzorci namiznih oljk sorte 'Istrska belica' vsebovali več skupnih biofenolov, hidroksitirosola in tirosola;
- potrdimo lahko tudi hipotezo o vplivu vsebnosti biofenolov na intenzivnost grenkega okusa, saj smo ugotovili, da so bile namizne oljke, predelane na tradicionalni način, v primerjavi z oljkami, predelanimi na modificirani španski način, bolj grenke in so vsebovale več skupnih biofenolov;
- predvidevali smo, da tehnologija predelave vpliva na rast mikroorganizmov. Spremljali smo rast kvasovk in pri tem ugotovili, da je v prvih dneh fermentacije oljk, predelanih na modificiran španski način, prišlo do znatnega zmanjšanja števila kvasovk;
- prav tako smo pravilno predvidevali vpliv časa fermentacije na senzorične značilnosti namiznih oljk. Rezultati raziskave kažejo, da so namizne oljke, predelane na modificirani španski način, po 180 dneh fermentacije zelo mehke in neprimerne teksture.

Zavedati se moramo, da je tehnologija predelave namiznih oljk tesno povezana s tradicijo, kulturo, z lokalnimi običaji, z ozemljem oziroma teritorijem in, nenazadnje, s sortami oljk, ki uspevajo na določenem območju. Z upoštevanjem sortnih značilnosti oziroma barve, teksture, trdote in velikosti plodov lahko, s predhodnim znanjem, predvidimo smer in možnosti razvoja ter optimizacije predelave namiznih oljk. Sodobne analitske metode določanja fizikalnokemijskih parametrov in znanja mikrobiologije ter biotehnologije pripomorejo k boljšemu poznavanju značilnosti namiznih oljk in k izbiri ustrezne tehnologije za pripravo končnega izdelka.

Sorte oljk se razlikujejo tudi po vsebnosti sekoiridoidnih antioksidantov. Na podlagi razlik v vsebnosti skupnih biofenolov lahko planiramo in prilagodimo način izluževanja grenkih spojin. Na primer, sorta 'Istrska belica' vsebuje več skupnih biofenolov kot sorta 'Štorta'. Zato bo potrebno tehnologijo predelave prirediti sortnim značilnostim in s tem zagotoviti kakovost predelanih namiznih oljk.

5.3 SKLEPI

V disertaciji smo proučevali vpliv tradicionalnega in modificiranega španskega načina predelave na kakovost namiznih oljk Slovenske Istre, sort 'Štorta' in 'Istrska belica'. Na podlagi rezultatov fizikalnokemijskih, mikrobioloških in senzoričnih analiz ter statistične obdelave podatkov lahko podamo naslednje sklepe:

Tehnologija predelave vpliva na kakovost namiznih oljk. Pri obravnavi vpliva predelave smo ugotovili, da je tradicionalni način primernejši za predelavo lokalnih sort, saj se je v tako predelanih vzorcih namiznih oljk ohranila večja vsebnost naravno prisotnih antioksidantov.

Tehnologija predelave vpliva na vsebnost hidroksitirosola, tirosola in na antioksidativno učinkovitost namiznih oljk. V primerjavi z modificiranim španskim načinom predelave smo v namiznih oljkah, predelanih na tradicionalni način, ugotovili večjo vsebnost hidroksitirosola in tirosola ter večjo antioksidativno učinkovitost.

Tehnologija predelave vpliva na potek fermentacije namiznih oljk. Pri predelavi namiznih oljk na modificirani španski način smo v prvih dneh fermentacije ugotovili znatno zmanjšanje števila kvasovk v primerjavi s tradicionalnim načinom predelave.

Tehnologija predelave vpliva na senzorične značilnosti namiznih oljk. Namizne oljke, predelane na tradicionalni način, so imele v primerjavi z namiznimi oljkami, predelanimi na modificirani španski način, ne glede na čas fermentacije, bolj ocenjene pozitivne senzorične značilnosti oziroma zaznave grenkega, kislega in slanega okusa so bile bolj intenzivne. Ne glede na način predelave so se senzorične značilnosti namiznih oljk s časom fermentacije poslabšale.

Proučevani sorti oljk sta se razlikovali po vsebnosti skupnih biofenolov, in sicer je imela sorta 'Istrska belica' tako v plodovih kot v predelanih namiznih oljkah več skupnih biofenolov. Ugotovili smo pozitivno zvezo med vsebnostjo skupnih biofenolov in zaznavo grenkega okusa namiznih oljk.

Fermentacijo namiznih oljk sort 'Štorta' in 'Istrska belica' vodijo kvasovke. Z analizo restrikcijских fragmentov regije ITS ribosomske DNA ter s fiziološkimi testi smo identificirali naslednje vrste kvasovk: *Pichia anomala*, *Cryptococcus adeliensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila* in *Rhodotorula mucilaginosa*. Predvidevamo, da relativno visoke vsebnosti skupnih biofenolov inhibirajo rast mlečnokislinskih bakterij.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

V raziskavi smo ovrednotili kakovost plodov in namiznih oljk sorte 'Štorta' in 'Istrska belica' in proučili vpliv tehnoloških postopkov na antioksidativno učinkovitost ter na vsebnost in sestavo naravnih antioksidanov s poudarkom na analizi vsebnosti hidroksitirosola in tirosola. Identificirali smo določene vrste kvasovk, ki vodijo spontano fermentacijo namiznih oljk in oljke tudi senzorično ovrednotili. Namizne oljke smo predelali na tradicionalni način predelave in modificirani španski način predelave.

Kakovost smo spremljali s fizikalnokemijskimi ter senzoričnimi analizami, ki jih predpisuje Tržni standard o namiznih oljkah (Trade standard..., 2004), sprejet leta 2004 pri Mednarodnem svetu za oljke (IOC). Merili smo vrednost pH slanice namiznih oljk, določili vsebnost prostih kislin in koncentracijo slanice. Ugotovili smo, da se vrednost pH slanice s časom fermentacije postopoma znižuje, vsebnost prostih kislin pa povečuje. Ugotovili smo, da se vrednost pH vzorcev slanice statistično značilno razlikuje (t-test, $\alpha < 0,05$) glede na to ali so bile oljke predelane na tradicionalni ali na modificirani španski način. V vzorcih namiznih oljk, ki smo jih predelali na tradicionalni način, smo določili manjšo vrednost pH. Ugotovili smo tudi, da končne vrednosti pH preiskovanih vzorcev niso skladne z mejnimi vrednostmi, ki jih predpisuje tržni standard, zato je potrebno namizne oljke zakisati in/ali termično obdelati oz. pasterizirati. Spremljanje koncentracije slanice med fermentacijo je pokazalo, da jo je potrebno dnevno izvajati. Zlasti v prvih dneh fermentacije se je zaradi osmoze koncentracija slanice zmanjševala. Ravnotežje med slanico in plodovi se vzpostavi šele po nekaj dneh fermentacije, in sicer pri modificiranem španskem načinu nekoliko prej kot pri tradicionalnem načinu predelave.

Ob zastavitvi raziskave smo predpostavili, da tehnologija predelave vpliva na vsebnost biofenolov in na antioksidativno učinkovitost namiznih oljk obeh obravnavanih sort 'Štorta' in 'Istrska belica'. Vsebnost biofenolov in antioksidativno učinkovitost smo določali v plodovih pred predelavo in v namiznih oljkah po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije. Za določanje vsebnosti skupnih biofenolov, hidroksitirosola in tirosola smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z UV detekcijo pri 280 nm.

S statistično obdelavo podatkov smo ugotovili, da so se plodovi obravnavanih sort statistično značilno razlikovali (t-test, $\alpha < 0,05$) v vsebnosti skupnih biofenolov. Rezultati določitve vsebnosti skupnih biofenolov in statistična obdelava podatkov so potrdili postavljene raziskovalne hipoteze. Ugotovili smo, da so ne glede na leto predelave statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) med tradicionalnim in modificiranim španskim načinom predelave v vsebnosti skupnih biofenolov (HPLC), in sicer so vzorci namiznih oljk, predelanih na tradicionalni način, vsebovali več hidroksitirosola, tirosola in skupnih biofenolov.

Največjo vsebnost skupnih biofenolov smo določili v namiznih oljkah sorte 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način po 60-ih dneh fermentacije, medtem ko smo najmanj biofenolov določili v namiznih oljkah sorte 'Štorta', predelanih na modificirani španski način po 180-ih dneh fermentacije.

Največjo vsebnost hidroksitirosola in tirosola smo določili v namiznih oljkah sorte 'Istrska belica' po 60-ih dneh fermentacije in uporabi tradicionalnega načina predelave. Najmanjšo vsebnost hidroksitirosola smo določili v namiznih oljkah obeh sort, predelanih na modificirani španski način po 180-ih dneh fermentacije. Najmanjšo vsebnost tirosola pa smo določili v vzorcih sorte 'Istrska belica', ravno tako predelanih na modificirani španski način po 180-ih dneh fermentacije.

Ugotovili smo, da namizne oljke, v primerjavi s plodovi pred predelavo, vsebujejo več hidroksitirosola in tirosola. Vzorci, ki smo jih predelali z modificiranim španskim načinom predelave, so ne glede na čas fermentacije vsebovali najmanj hidroksitirosola in tirosola.

Vsebnost skupnih biofenolov smo določili tudi spektrofotometrično s Folin-Ciocalteujevim reagentom. Rezultati raziskave kažejo, da je bila vsebnost skupnih biofenolov v plodovih sorte 'Istrska belica' večja v primerjavi s plodovi sorte 'Štorta'.

Ugotovili smo statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) med tradicionalnim in modificiranim španskim načinom predelave. Večje vsebnosti skupnih biofenolov smo določili v vzorcih namiznih oljk, ki smo jih predelali na tradicionalni način.

Največjo vsebnost skupnih biofenolov smo določili v vzorcih namiznih oljk 'Istrska belica', predelanih na tradicionalni način in fermentiranih 60 dni. Podobno kot HPLC metoda je tudi spektrofotometrijska pokazala, da se je najmanj skupnih biofenolov ohranilo v namiznih oljkah sorte 'Štorta', predelanih na modificirani španski način po 180-ih dneh fermentacije.

Proučili smo tudi antioksidativno učinkovitost namiznih oljk po metodi, ki jo opisujejo Brand-Williams, Cuvelier in Berset (1995). Ugotovili smo, da se tradicionalni način predelave in modificirani španski način predelave statistično značilno razlikujeta (t-test, $\alpha < 0,05$). Največjo antioksidativno učinkovitost smo določili v vzorcih namiznih oljk, ki smo jih predelali na tradicionalni način.

Največjo antioksidativno učinkovitost smo določili v vzorcih namiznih oljk 'Istrska belica', letnika 2006, po 60-ih dneh fermentacije, predelanih na tradicionalni način. Najmanjšo antioksidativno učinkovitost smo določili v vzorcih namiznih oljk sorte 'Štorta', predelanih na modificirani španski način in fermentiranih 180 dni.

Rezultati mikrobiološke raziskave in identifikacije mikroorganizmov, so pokazali, da kvasovke vodijo fermentacijo namiznih oljk Slovenske Istre. Uspešno smo izolirali in z analizo restrikcijskih fragmentov regije ITS ribosomske DNA ter s fiziološkimi testi identificirali naslednje vrste kvasovk: *Pichia anomala*, *Cryptococcus adeliensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila* in *Rhodotorula mucilaginosa*. Proučili smo tudi rast mlečnokislinskih bakterij in ugotovili, da mlečnokislinske bakterije ne vodijo fermentacije namiznih oljk Slovenske Istre, saj smo pri odčitavanju rezultatov po inkubaciji ugotovili, da so bile plošče MRS agarja negativne. Ugotovili smo statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) v številu kvasovk med namiznimi oljkami iz sorte 'Štorta' in 'Istrska belica'. V vzorcih namiznih oljk, ki smo jih predelali iz sorte 'Štorta', smo določili večje število kvasovk. Ovrednotili smo tudi vpliv letnika in ugotovili, da smo v vzorcih letnika 2006 določili večje število kvasovk (t-test, $\alpha < 0,05$).

Iz matične raztopine plodov oljk 'Štorta' in 'Istrska belica' smo pred predelavo izolirali kvasovko *Aureobasidium pullulans*. Vrsto *Metschnikowia pulcherrima* pa smo izolirali že po treh dneh fermentacije iz namiznih oljk iz sorte 'Štorta' in 'Istrska belica', ki smo jih

fermentirali na tradicionalni način predelave. Iz vzorcev namiznih oljk 'Štorta', letnika 2006 smo po 20-ih dneh fermentacije izolirali vrsto *Cryptococcus adeliensis*, v vzorcih letnika 2007 pa v istem obdobju ugotovili prisotnost vrst *Rhodotorula mucilaginosa* in *Candida oleophila*. *Cryptococcus adeliensis* smo izolirali tudi iz vzorcev namiznih oljk po treh dneh fermentacije na tradicionalni način iz sorte 'Istrska belica'. Po 60-ih dneh fermentacije smo v vzorcih letnika 2006 določili prisotnost kvasovke *Pichia anomala*.

V okviru disertacije smo vpliv tehnoloških postopkov na kakovost namiznih oljk spremljali tudi s senzorično analizo. V senzorično ocenjevanje so bili vključeni vzorci namiznih oljk, predelanih po obeh postopkih (tradicionalnem in modificiranem španskem), po 60-ih in 180-ih dneh fermentacije.

Ugotovili smo, da so namizne oljke, predelane s tradicionalnim načinom tako po 60-ih kot 180-ih dneh fermentacije bolj grenke, trde in vlaknate v primerjavi z namiznimi oljkami, predelanimi z modificiranim španskim načinom. Ugotovili smo tudi, da so namizne oljke sorte 'Štorta', ne glede na uporabljeno tehnologijo, v primerjavi z namiznimi oljkami sorte 'Istrska belica' bolj vlaknate. Tudi mezokarp se je pri tej sorti zlahka ločil od endokarpa oziroma koščice. Statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) smo določili pri zaznavi grenkega in kislega okusa. Zaznava grenka in kislega okusa je bila bolj intenzivna v vzorcih namiznih oljk, predelanih na tradicionalni način. Statistično značilne razlike (t-test, $\alpha < 0,05$) smo ugotovili za zaznavo slanega okusa in oceno trdote namiznih oljk. Senzorične značilnosti namiznih oljk, ki smo jih fermentirali 60 dni, so bile v primerjavi z vzorci, ki smo jih senzorično ocenili po 180-ih dneh fermentacije, bolj intenzivne. S statistično analizo smo prav tako ugotovili, da so namizne oljke sorte 'Istrska belica' bolj slane (t-test, $\alpha < 0,05$) v primerjavi z namiznimi oljkami sorte 'Štorta'.

Na podlagi senzoričnega ocenjevanja smo ugotovili, da je za obravnavani sorti tradicionalni način predelave namiznih oljk bolj primeren, saj so oljke tudi po 180-ih dneh fermentacije ohranile primerno grenkobo, trdoto in vlaknatost. Ugotovili smo, da modificirani španski način predelave, ki vključuje začetno razgrenjevanje plodov v alkalnem mediju, ni najbolj primeren za predelavo lokalnih sort oljk, ker po 180-ih dneh fermentacije postanejo plodovi mehki z manj intenzivno izraženimi senzoričnimi značilnostmi.

V okviru statistične obdelave podatkov smo med obravnavanimi parametri poiskali tudi korelacije (Pearsonov korelacijski koeficient). Ugotovili smo pozitivne korelacije med spektrofotometrično določitvijo vsebnosti skupnih biofenolov in HPLC analizo le-teh, med vsebnostjo hidroksitirosola in tirosola, med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih biofenolov. Grenek okus namiznih oljk pozitivno korelira z vsebnostjo skupnih biofenolov, z vsebnostjo hidroksitirosola in tirosola ter z antioksidativno učinkovitostjo namiznih oljk. Prav tako smo ugotovili tudi pozitivno zvezo med vlaknatostjo in trdoto namiznih oljk.

6.2 SUMMARY

The influence of two production technologies on table olives quality and on the amount of biophenols, hydroxytyrosol, tyrosol, and antioxidant activity produced from two local olive varieties, "Štorta" and "Istrska belica" was studied. Spontaneous fermentation of table

olives was carried out with yeast; some species of yeast were isolated and identified. The quality evaluation of physico-chemical parameters in accordance with the Trade standard applying to table olives (2004) and sensory assessment of Slovenian table olives were studied. The olive varieties were processed using Slovenian traditional production technology and a modified Spanish style technology.

pH value, free acidity and brine concentration were determined. It was found out that pH value of brine gradually decreased while free acidity increased. Statistically significant differences (t-test, $\alpha < 0.05$) between the two technologies in pH values were determined. pH values determined in table olives produced with traditional technology were lower than in table olives produced with the modified Spanish style technology. The results showed that the final values of the examined parameters did not comply with minimum requirements specified by the Trade standard. Therefore, to assure stability and safety of the product, table olives have to be acidified and/or pasteurized. Brine concentration was daily monitored until the equilibrium (because of osmosis) between olives and the brine was reached.

The influence of production technology on biophenol composition was studied. The amount of total biophenols, hydroxytyrosol and tyrosol were determined in olive fruits before processing and in table olives after 60 and 180 days of fermentation. The determination was performed by HPLC analysis at 280 nm.

Statistically significant differences (t-test, $\alpha < 0.05$) between olive cultivars in biophenol content were determined. The amount of total biophenols in "Istrska belica" olive fruits was higher than in "Štorta" olive fruits.

Statistically significant differences (t-test, $\alpha < 0.05$) between the two technologies regarding biophenol content in table olives were determined, regardless of crop year. Values of biophenol content determined in table olives of both varieties produced with traditional technology were higher than in table olives produced with the modified Spanish style technology.

The highest amount of HPLC biophenols was determined in "Istrska belica" after 60 days of processing with traditional technology while the lowest content of HPLC biophenols was determined in "Štorta" table olives after 180 days of processing with the modified Spanish style.

The highest contents of hydroxytyrosol and tyrosol were determined in "Istrska belica" table olives after 60 days of processing with traditional technology. After 180 days of processing with the modified Spanish style, the lowest content of hydroxytyrosol was determined in table olives of both varieties while the lowest content of tyrosol was determined in "Istrska belica" table olives. Comparing to olive fruits before fermentation, we found out that hydroxytyrosol content increased after fermentation.

Total biophenol content was determined spectrophotometrically with Folin-Ciocalteu reagent. It is evident that "Istrska belica" olive fruits contained more total biophenols than "Štorta" olive fruits.

Statistically significant differences (t-test, $\alpha < 0.05$) between traditional processing technology and the modified Spanish style in biophenol content were determined. Values of total biophenols determined in table olives produced with traditional technology were higher than in table olives produced with the modified Spanish style technology. The highest amount of total biophenol content was determined in "Istrska belica" table olives

after 60 days of fermentation with traditional technology. The lowest amount of total biophenol content was determined in "Štorta" table olives after 180 days of processing with the modified Spanish style.

Antioxidant activity was determined using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging assay according to the procedure described by Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995). Statistically significant differences (t-test, $\alpha < 0.05$) in antioxidant activity of table olives between the two processing technologies were determined. The highest antioxidant activity was determined in table olives processed with traditional technology. The highest antioxidant activity was determined in "Istrska belica" table olives after 60 days of fermentation with traditional technology, while the lowest antioxidant activity was determined in "Štorta" table olives after 180 days of processing with the modified Spanish style.

The results of this work showed that only yeast play an essential role in fermentation of table olives from Slovenian Istria. *Pichia anomala*, *Cryptococcus adeliensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila* and *Rhodotorula mucilaginosa* were isolated and identified according to restriction fragments of the 5.8S ITS region of rDNA and biochemical tests. The presence of lactic acid bacteria was studied. It was found out that the lactic acid bacteria did not grow and did not cause the fermentation of table olives. Statistically significant differences (t-test, $\alpha < 0.05$) between the two olive varieties in yeast population were determined. The number of yeasts was higher in "Štorta" table olives than in "Istrska belica" table olives. The influence of crop year was ascertained, in crop year 2006 more yeasts were determined (t-test, $\alpha < 0.05$). *Aureobasidium pullulans* was isolated from the surface of fresh olive fruits before production from the two studied varieties "Istrska belica" and "Štorta". *Metschnikowia pulcherrima* was determined from both olive varieties after 3 days of fermentation using the traditional production technology. In "Štorta" table olives (crop year 2006) *Cryptococcus adeliensis* was isolated after 20 days of fermentation, while in the same period but in the samples of crop year 2007 *Rhodotorula mucilaginosa* and *Candida oleophila* were determined. *Cryptococcus adeliensis* was also determined after 3 days of traditional production in "Istrska belica" table olives. After 60 days of fermentation *Pichia anomala* was identified in table olives' samples of crop year 2006.

To evaluate the influence of production technology on the quality of table olives sensory assessment was performed. Sensory assessment of the characteristics of table olives was evaluated after 60 and 180 days of production. The median of the intensities for each sensory attributes was calculated. The bitterness, hardness and fibrousness of table olives that were produced using the traditional production technology, were more intensive compared to the intensities of samples produced with the modified Spanish style. We found out that "Štorta" table olives, regardless of production technology, were more fibrous than "Istrska belica" table olives. Statistically significant differences (t-test, $\alpha < 0.05$) in the perceived saltiness and hardness were determined. The sensory characteristics of table olives that were processed 60 days were more intensive compared to table olives after 180 days of processing.

According to the results of our research, the traditional production technology was better for processing the two local olive varieties, because even after 180 days they preserved

appropriate bitterness, hardness and fibrousness that made them suitable for consumption. It was found out that the modified Spanish style production technology, which involves initial alkaline treatment, was not suitable for retaining the characteristics of the two local olive varieties. The results of the research showed that table olives after 180 days of processing with the modified Spanish production technology were very mollified and the intensities of the sensory attributes were less expressed.

The correlation between the examined parameters was studied (Pearson's correlation coefficient). Positive correlations between spectrophotometrical and HPLC determination of total biophenols, the amount of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant activity and total biophenols were determined. The bitter taste of table olives is positively correlated to the amount of total biophenols, hydroxytyrosol and tyrosol and to the antioxidant activity. A positive correlation between fibrousness and hardness was determined.

7 VIRI

- Abbas C. A. 2006. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. V: Yeasts in food and beverages. Querol A., Fleet H. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 285-334
- Arneborg N., Karskov M., Jacobsem M. 1995. The effect of acetic acid on the specific growth rate on acetic acid tolerance and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, 17: 1299-1304.
- Arroyo López F. N., Romero C., Del Carmen Durán Quintana M., López López A., García García P., Garrido Fernández A. 2005. Kinetic study of the physicochemical and microbiological changes in "seasoned" olives during shelf-life period. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 5285-5292
- Arroyo López F. N., Durán-Quintana M. C., Ruiz-Barba J. L., Querol A., Garrido-Fernández A. 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. Food Microbiology, 23: 791-796
- Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. International Journal of Food Microbiology, 128: 189-196
- Balatsouras G. D. 1967. Processing the naturally ripe black olives. V: Proceedings of the International Olive Oil Seminar. International Olive Oil Council, Perugia-Spolete, Italy: 491-510. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. International Journal of Food Microbiology, 128: 189-196
- Bandelj Mavsar D., Bučar-Miklavčič M., Mihelič R., Podgornik M., Raffin G., Režek Donev N., Valenčič V. 2008. Sonaravno ravnanje z ostanki predelave oljk. Koper, Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Založba Annales, Zgodovinsko društvo za južno Primorsko: 11-26
- Barrio E., González S. S., Arias A., Belloch C., Querol A. 2006. Molecular mechanisms involved in the adaptive evolution of industrial yeasts. V: Yeasts in food and beverages. Querol A., Fleet H. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 153-174
- Ben Othman N., Roblain D., Chammen N., Thonar, P., Hamdi M. 2009. Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. Food Chemistry, 116, 3: 662-696
- Betts G. D., Linton P., Betteridge R. J. 1999. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl, and temperature on growth. Food Control, 10: 27-33.

- Bianco A., Uccella N. 2000. Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33: 475-485
- Bianco A., Buiarelli F., Cartoni G., Coccioli F., Jasionowska R., Margherita P. 2003. Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, part I. *Journal of Separation Science*, 26: 409-416
- Bianco A., Chiacchio M. A., Grassi G., Iannazzo D., Piperno A., Romeo R. 2006. Phenolic components of *Olea europaea*: Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, 95: 562-565
- Blekas G., Vassilakis C., Harizanis C., Tsimidou M., Boskou D. G. 2002. Biophenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3688-3692
- Borcakli M., Ozay G., Alperden I., Ozsan E., Erdek Y. 1993. Changes in the chemical and microbiological composition of two varieties of olive during fermentation. *Grasas y Aceites*, 44: 253-258.
- Bouaziz M., Chamkha M., Sayadi S. 2004. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5476-5481
- Boskou D. 2008. Phenolic compounds in olives and olive oil. V: *Olive oil: Minor constituents and health*. Boskou D. (ed.). New York, CRC Press, Taylor & Francis group: 11-45
- Boskou G., Salta F. N., Chrysostomou S., Mylona A., Chiou A., Andrikopoulos N. K. 2006. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, 94: 558-564
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30
- Brighigna A. 1998. *Le olive da tavola: Varietà, lavorazioni, legislazione, impiantistica e analitica di controllo*. Bologna, Edagricole: 205 str.
- Codex standard for table olives. Codex stan 66-1981 (Rev. 1-1987). 1994. V: *Codex Alimentarius*. Vol. 5A. Processed and quick frozen fruits and vegetables. Roma, FAO: 127-144
- Cortesi N., Rovellini P., Fusari P. 2002. Determination of biophenols minor polar compounds in virgin olive oil. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79, 5: 145-150
- Coton E., Coton M., Levert D., Casaregola S., Sohier D. 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 130-135

- Damak N., Bouaziz M., Ayadi M., Sayadi S., Damak M. 2008. Effect of maturation process on the phenolic fractions, fatty acids and antioxidant activity of the Chétoui olive fruit cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 1560-1566
- Durán Quintana M. C., González F., Garrido A. 1979. Aceitunas negras al antural en salmuera. Ensayos de producción de alambrado. Inoculación de diversos microorganismos aislados de salmueras de fermentación. *Grasas y Aceites*, 30: 361-367
- Durán Quintana M. C., García García P., Garrido Fernández A. 1986. Fermentación en medio aeróbico de aceitunas negras maduras en salmuera con inyección alternante de aire. *Grasas y Aceites*, 37: 242-249
- Durán Quintana M. C., García García P., Garrido Fernández A. 2003. Characteristics of table olive growth at low temperature. *Grasas y Aceites*, 54: 264-271
- Fernández M., Castro A., Garrido A., Gonzáles F., Nosti M., Heredia A., Minués M. I., Rejano L., Sánchez F., Garcia P., Castro A. 1985. Biotecnología de la aceituna de mesa. V: Tecnología di produzione dell'olio di oliva e delle olive da tavola. Sevilla, Instituto de la Grasas: 25 str.
<http://ww.tdcolive.net> (25.8.2008)
- Fernández Díez M. J., Castro y Ramos R., Garrido Fernández A., González Cancho F., González Pellisó F., Nosti Vega M., Heredia Moreno A., Mínguez Mosquera M. J., Rejano Navarro L., Durán Quintana M. C., Sánchez Roldán F., García García P., Castro Gómez-Millán A. 1985. Biotecnología de la Aceituna de Mesa. Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas: 475 str.
- Garrido A., García P., Brenes M. 1995. Olive fermentation: V: Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise. Rem H. J., Reed G. (eds.). Weinheim, VCH, 9: 593-627
- Garrido Fernández A., Fernández Díaz M. J., Adams R. M. 1997. Table olives. Production and processing. London, Chapman & Hall: 495 str.
- Garrido Fernández A. 2005. Naturally black ripe olives. V: International course on table olive processing. Damascus, Syria, 20-27 november 2005. Presentations. Damascus, International Olive Council: 10 str.
- Glass for oil testing. 2007. International Olive Council, COI/T.20/Doc. no. 5/Rev. 1. September 2007: 5 str.
<http://www.internationaloliveoil.org/downloads/orga2.pdf> (5. november 2009)
- Gomez-Rico A., Fregapane G., Desamparados Salvador M. 2008. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41: 433-440

- González Cancho F. 1965. Yeast ecology in french cider and black olive natural fermentation. *Grasas y Aceites*, 16: 230-234. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189-196
- González Cancho F. 1966. Levaduras en la fermentación de aceitunas verdes estilo español (I). *Revista de Ciencia Aplicada*, 108: 24-31. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189-196
- González Cancho F. 1966. Levaduras en la fermentación de aceitunas verdes estilo español (II). *Revista de Ciencia Aplicada*, 109: 125-133. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189-196
- González Cancho F., Nosti Vega M., Durán Quintana M. C., Garrido-Fernández A., Fernández Díez M. J. 1975. El proceso fermentativo de las aceitunas negras maduras en salmuera. *Grasas y Aceites*, 26: 297-309. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189-196
- Guide for the installation of a test room. 2007. International Olive Council, COI/T.20/Doc. no. 6/Rev. 1. September 2007: 8 str.
<http://www.internationaloliveoil.org/downloads/orga3.pdf> (5. november 2009)
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58: 966–968.
- Hernández A., Martín A., Aranda E., Pérez-Nevado F., Córdoba M. G. 2007. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24: 346-351
- Hernández A., Martín A., Córdoba M. G., José Benito M., Aranda E., Pérez-Nevado F. 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 178–188
- Hočevar J. 2005. Piranske oljke. Piran, Oljkarsko društvo Štorta: 35-42
- Hurtado A., Reguant C., Bordons A., Rozès N. 2009. Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives. *Food Microbiology*, 26, 8: 827-833
- Hurtado A., Reguant C., Esteve-Zarzoso B., Bordons A., Rozès N. 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International*, 41: 738-744

- Jensen S. R., Franzyk H., Wallander E. 2002. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*, 60: 213-231
- Kalua C. M., Allen M. S., Bedgood D. R. Jr., Bishop A. G., Prenzler P. D. 2005. Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8054-8062
- Kotzekidou P. 1997. Identification of yeast from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology*, 14: 609-616
- Leal-Sánchez M. V., Ruiz-Barba J. L., Sánchez A. H., Rejano L., Jiménez-Díaz R., Garrido A. 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*, 20: 421-430
- Luque de Castro M. D., Japón-Luján R. 2006. State-of-the-art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 5: 501-510
- Malik N. S. A., Bradford J. M. 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae*, 110: 274-278
- Marquina D., Peres C., Caldas F. V., Marques J. F., Peinado M. J., Spencer Martin J. 1992. Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*, 14: 279-283
- Marquina D., Toufani S., Llorente P., Santos A., Peinado J. M. 1997. Killer activity in yeast isolated from olive brines. *Advances in Food Science*, 19: 41-46
- Marsilio V., Campestre C., Lanza B. 2001. Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, 74: 55-60
- Marsilio V., Seghetti L., Iannucci E., Russi F., Lanza B., Felicioni M. 2005. Use of lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L. cv. Ascolana tenera) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1084-1090
- Marsilio V., d'Andria R., Lanza B., Russi F., Iannucci E., Lavini A., Morrelli G. 2006. Effect of irrigation and lactic acid bacteria inoculants on the phenolic fraction, fermentation and sensory characteristics of olive (*Olea europaea* L. cv. Ascolana tenera) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1005-1013
- Marsilio V. 2008. Le olive da tavola nel mondo. V: L'extravergine 2008, guida ai migliori oli del mondo di qualità accertata. Oreggia M. (ed.). Roma, Cucina & Vini editrice S.r.l.: 207-208

- McDonald S., Prenzler P. D., Antolovich M., Robards K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73: 73-84
- Medina E., Brenes M., Romero C., García A., de Castro A. 2007. Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9817-9823
- Medina E., Romero C., de Castro A, Brenes M., García A. 2008. Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety. *Food Chemistry*, 110: 932-937
- Montaño A., Sánchez A. H., Casado F. J., de Castro A., Rejano L. 2003. Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, 82: 297-302
- Morelló J.-R., Romero M.-P., Ramo T., Motilva M.J. 2005. Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Science*, 168: 65-72
- Mrak E. M., Vaughn R. H., Millar M. W., Phaff H. J. 1956. Yeasts occurring in brines during the fermentation and storage of green olives. *Food technology*, 10: 416-419. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189-196
- Nisiotou A. A., Chorianopoulos N., Nychas G. – J. E., Panagou E. Z. 2009. Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04424.x
- Nout M. J. R. 1994. Fermented foods and food safety. *Food research International*, 27: 291-298. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189-196
- Obied H. K., Bedgood D. R. Jr., Prenzler P. D., Robards K. 2007. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 603: 176-189
- Panagou E. Z., Tassou C. C., Katsaboxakis K. Z. 2002. Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 635-641
- Panagou E. Z. 2006. Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20 °C. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39: 322-329

- Panagou E. Z., Schillinger U., Franz C. M. A. P., Nychas G. J. E. 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25: 348-358
- Pelegatti O. 1978. Sulla microflora lattica e blastomicetica associata alle drupe di alcune cultivars di *Olea europaea* L. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Elaiotecnica*, 7: 177-192. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189-196
- Pereira J. A., Pereira A. P. G., Ferreira I. C. F. R., Valentão P., Andrade P. B., Seabra R., Estevinho L., Bento A. 2006. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potencial and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8425-8431
- Pereira A. P., Pereira J. A., Bento A., Estevinho M. L. 2008. Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safty aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2895-2902
- Ricci A. 2007. Olive da mensa. Coltivazione, lavorazione, commercializzazione. Bologna, Edagricole: 100-113
- Raspor P., Smole Možina S., Čadež N. 2001. Identification of yeasts from grape/musts/wine system. V: *Methods in Biotechnology*. Spencer J. F. T., Ragout de Spencer A. L. (eds.). Totowa, Humana Press, 14: 243-251
- Romero C., Brenes M., Yousfi K., García P., García A., Garrido, A. 2004. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 479-484
- Romero C., Brenes M., García P., García A., Garrido A. 2004. Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1973-1979
- Ruiz Cruz J, González Cancho F. 1969. Methabolism of yeasts isolated from brines of Spanish-style table olives. The assimilation of lactic, acetic and citric acid. *Grasas y Aceites*, 20: 6-11. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189-196
- Ryan D., Robards K., Lavee S. 1999. Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832: 87-96
- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176

- Sakouhi F., Harrabi S., Absalon C., Sbei K., Sadok B., Kallel H. 2008. α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europaea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*, 108: 833-839
- Sánchez A. H., de Castro A., Rejano L., Montaña A. 2000. Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5975-5980
- Sánchez A. H., Rejano L., Montaña A., de Castro A. 2001. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 115-122
- Savarese M., De Marco E., Sacchi R. 2007. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105: 761-770
- Segovia Bravo K. A., Arroyo López F. N., García García P., Durán Quintana M. C., Garrido Fernández A. 2007. Treatment of green table olive solutions with ozone. Effect on their polyphenol content and on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 60-68
- Sensory analysis of table olives. 2008. International olive council, COI/OT/MO no. 1. October 2008: 12 str.
<http://www.internationaloliveoil.org/downloads/quimica/MET-OT-org-eng.pdf>
(5. november 2009)
- Santos A., Marquina D., Leal J. A., Peinado J. M. 2000. (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1809-1813
- Silva S., Gomes L., Leitão F., Coelho A. V., Vilas Boas L. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 12: 385-396
- Sousa A., Ferreira I. C. F. R., Calhella R., Andrade P. B., Valentão P., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J. A. 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 8533-8538
- Stratford M. 2006. Food and beverage spoilage yeasts. V: Yeasts in food and beverages. Querol A., Fleet H. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 335-379
- Tassou C. C., Panagou E. Z., Katsaboxakis K. Z. 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19: 605-615

- Trade standard applying to table olives. 2004. International Olive Council, COI/OT/NC no. 1. December 2004: 17 str.
<http://www.internationaloliveoil.org/downloads/Normoteng.pdf> (5. november 2009)
- Tsapatsaris S., Kotzekidou P. 2004. Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. International Journal of Food Microbiology, 95: 157-168
- Vaughn R. H., Jakubczyk T., MacMillan J. D., Higgins T. E., Dave B. A., Crampton V. M. 1969. Some pink yeast associated with softening of olives. Applied Microbiology, 18: 771-775. Cit. po: Arroyo López F. N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. 2008. Role of yeasts in table olive production. International Journal of Food Microbiology, 128: 189-196
- Vinha A. L., Ferreres F., Silva B. M., Valentão P., Gonçalves A., Pereira, J. A., Oliveira M. B., Seabra R. M., Andrade P. B. 2005. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. Food Chemistry, 89: 561-568
- Viljoen B. C. 2006. Yeast ecological interactions: Yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. V: Yeasts in food and beverages. Querol A., Fleet H. (eds). Berlin, Springer-Verlag: 83-110

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tereziji Golob in somentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za vse koristne nasvete pri oblikovanju doktorske disertacije.

Doktorska disertacija je zaključno delo usposabljanja mladega raziskovalca iz gospodarstva. Za uspešno sodelovanje pri izvajanju vseh aktivnosti se zahvaljujem raziskovalni mentorici doc. dr. Dunji Bandelj Mavsar.

Zahvaljujem se prof. dr. Petru Rasporju, ker mi je omogočil delo v genskem laboratoriju katedre za biotehnologijo, ravno tako se zahvaljujem doc. dr. Neži Čadež za delovno mentorstvo.

Zahvaljujem se Mileni Bučar-Miklavčič, direktorici Inštituta za ekologijo, oljčno olje in kontrolo LABS d.o.o. iz Izole, da mi je omogočila raziskovalno delo na področju vrednotenja kakovosti namiznih oljk.

Zahvaljujem se asistentki Mojci Korošec in doc. dr. Lei Gašperlin za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se sodelavcem dr. Eriki Bešter, Bojanu Butinarju, Darinki Čalija in Saši Volk za pomoč pri izvajanju določenih aktivnosti pri raziskovalnem delu.

Zahvaljujem se preskuševalcem ocenjevalne komisije Mileni Bučar-Miklavčič, Petru Deržku, Leni Dujc, Aleksandru Jevnikarju, Giglioli Lisjak, Nedi Milkovič, Aleksandri Ožbolt in mag. Viljanki Vesel za kritično delo pri senzoričnem ocenjevanju namiznih oljk.

Zahvaljujem se Angelu Hlaju in Petru Deržku za dostop do njihovih oljčnih nasadov.

PRILOGE

Priloga A: Karakterizacija plodov pred predelavo. Rezultati določitve vsebnosti biofenolov in mikrobiološke analize plodov

Letnik	Sorta	Oznaka vzorca	Vsebnost skupnih biofenolov		TyrOH (mg/kg)	Tyr (mg/kg)	ARP (mg ⁻¹)	Skupno število mikroorganizmov (log CFU/mL)	Število kvasovk (log CFU/mL)
			FC (mg/kg)	HPLC (mg/kg)					
2006	IB	V1a	7581	14583	59,8	15,2	1,1786	0,0	3,0
2006	IB	V1b	7599	14506	62,5	15,9	1,1772	0,0	3,0
2006	Š	V2a	5596	10559	89,4	38,2	1,1531	0,0	2,6
2006	Š	V2b	5591	10406	90,6	35,9	1,1536	0,0	2,6
2007	IB	V20a	7120	14844	56,2	76,8	1,3825	2,8	0,0
2007	IB	V20b	7115	14821	59,1	76,4	1,4021	2,8	0,0
2007	Š	V21a	6361	10963	58,3	66,3	1,4301	1,5	1,7
2007	Š	V21b	6347	11252	61,5	66,8	1,4301	1,5	1,7

Priloga B: Rezultati fizikalnokemijskih in mikrobioloških analiz namiznih oljk

Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	pH	Proste kisline (g/100 mL)	Skupno število mikroorganizmov (log CFU/mL)	Število kvasovk (log CFU/mL)
2006	3	ŠP	IB	M1a	7,98	0,0000	0,5	0,0
2006	3	ŠP	IB	M1b	7,99	0,0000	0,5	0,0
2006	3	ŠP	IB	M2a	8,20	0,0000	1,2	0,0
2006	3	ŠP	IB	M2b	8,21	0,0000	1,2	0,0
2006	3	ŠP	Š	M5a	7,31	0,0000	2,0	0,8
2006	3	ŠP	Š	M5b	7,33	0,0000	2,0	0,8
2006	3	ŠP	Š	M6a	7,68	0,0000	2,8	0,8
2006	3	ŠP	Š	M6b	7,69	0,0000	2,8	0,8
2006	3	TP	IB	M3a	6,19	0,0086	4,4	6,3
2006	3	TP	IB	M3b	6,20	0,0086	4,4	6,3
2006	3	TP	IB	M4a	6,15	0,0086	3,1	6,2
2006	3	TP	IB	M4b	6,15	0,0086	3,1	6,2
2006	3	TP	Š	M7a	5,99	0,0103	3,3	5,7
2006	3	TP	Š	M7b	5,98	0,0086	3,3	5,7
2006	3	TP	Š	M8a	5,84	0,0103	4,4	5,5
2006	3	TP	Š	M8b	5,83	0,0103	4,4	5,5
2006	10	ŠP	IB	M11a	7,45	0,0017	1,2	0,7
2006	10	ŠP	IB	M11b	7,48	0,0017	1,2	0,7
2006	10	ŠP	IB	M12a	7,63	0,0017	1,6	0,8
2006	10	ŠP	IB	M12b	7,62	0,0017	1,6	0,8
2006	10	ŠP	Š	M15a	6,53	0,0068	5,2	4,1
2006	10	ŠP	Š	M15b	6,54	0,0068	5,2	4,1
2006	10	ŠP	Š	M16a	6,23	0,0068	5,1	4,2
2006	10	ŠP	Š	M16b	6,22	0,0068	5,1	4,2
2006	10	TP	IB	M13a	6,06	0,0086	6,8	3,7
2006	10	TP	IB	M13b	6,04	0,0086	6,8	3,7
2006	10	TP	IB	M14a	6,05	0,0086	6,8	3,3
2006	10	TP	IB	M14b	6,04	0,0086	6,8	3,3
2006	10	TP	Š	M17a	5,27	0,0103	6,2	4,3
2006	10	TP	Š	M17b	5,28	0,0103	6,2	4,3
2006	10	TP	Š	M18a	5,46	0,0103	5,8	6,0
2006	10	TP	Š	M18b	5,44	0,0103	5,8	6,0
2006	20	ŠP	IB	M21a	6,83	0,0068	5,3	1,2
2006	20	ŠP	IB	M21b	6,82	0,0068	5,3	1,2
2006	20	ŠP	IB	M22a	7,26	0,0034	4,8	2,1
2006	20	ŠP	IB	M22b	7,26	0,0034	4,8	2,1
2006	20	ŠP	Š	M25a	6,17	0,0086	7,2	4,7
2006	20	ŠP	Š	M25b	6,18	0,0086	7,2	4,7
2006	20	ŠP	Š	M26a	5,98	0,0086	6,9	4,7
2006	20	ŠP	Š	M26b	5,97	0,0086	6,9	4,7
2006	20	TP	IB	M23a	5,82	0,0154	6,1	3,1
2006	20	TP	IB	M23b	5,82	0,0154	6,1	3,1

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B: Rezultati fizikalnokemijskih in mikrobioloških analiz namiznih oljk

Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	pH	Proste kisline (g/100 mL)	Skupno število mikroorganizmov (log CFU/mL)	Število kvasovk (log CFU/mL)
2006	20	TP	IB	M24a	5,90	0,0171	5,8	2,6
2006	20	TP	IB	M24b	5,90	0,0171	5,8	2,6
2006	20	TP	Š	M27a	5,44	0,0359	7,0	3,9
2006	20	TP	Š	M27b	5,44	0,0359	7,0	3,9
2006	20	TP	Š	M28a	5,42	0,0479	6,9	4,1
2006	20	TP	Š	M28b	5,42	0,0479	6,9	4,1
2006	30	ŠP	IB	M31a	5,99	0,0120	5,9	4,1
2006	30	ŠP	IB	M31b	5,99	0,0120	5,9	4,1
2006	30	ŠP	IB	M32a	6,14	0,0103	5,5	4,0
2006	30	ŠP	IB	M32b	6,14	0,0103	5,5	4,0
2006	30	ŠP	Š	M35a	5,95	0,0154	6,1	4,8
2006	30	ŠP	Š	M35b	5,95	0,0154	6,1	4,8
2006	30	ŠP	Š	M36a	5,55	0,0154	5,8	4,6
2006	30	ŠP	Š	M36b	5,54	0,0154	5,8	4,6
2006	30	TP	IB	M33a	5,85	0,0188	7,2	2,2
2006	30	TP	IB	M33b	5,85	0,0188	7,2	2,2
2006	30	TP	IB	M34a	5,80	0,0171	7,1	3,3
2006	30	TP	IB	M34b	5,81	0,0171	7,1	3,3
2006	30	TP	Š	M37a	5,14	0,0428	7,3	4,1
2006	30	TP	Š	M37b	5,14	0,0428	7,3	4,1
2006	30	TP	Š	M38a	5,08	0,0531	7,3	4,2
2006	30	TP	Š	M38b	5,08	0,0531	7,3	4,2
2006	60	ŠP	IB	V3a	6,30	0,0086	6,8	5,7
2006	60	ŠP	IB	V3b	6,30	0,0086	6,8	5,7
2006	60	ŠP	IB	V4a	6,35	0,0086	6,5	5,3
2006	60	ŠP	IB	V4b	6,35	0,0086	6,5	5,3
2006	60	ŠP	Š	V7a	6,37	0,0086	6,0	4,3
2006	60	ŠP	Š	V7b	6,37	0,0086	6,0	4,3
2006	60	ŠP	Š	V8a	6,37	0,0086	6,9	4,8
2006	60	ŠP	Š	V8b	6,37	0,0086	6,9	4,8
2006	60	TP	IB	V5a	5,26	0,0222	6,6	5,2
2006	60	TP	IB	V5b	5,26	0,0222	6,6	5,2
2006	60	TP	IB	V6a	5,11	0,0240	7,0	5,7
2006	60	TP	IB	V6b	5,11	0,0240	7,0	5,7
2006	60	TP	Š	V9a	5,22	0,0188	6,7	6,2
2006	60	TP	Š	V9b	5,22	0,0188	6,7	6,2
2006	60	TP	Š	V10a	5,24	0,0188	6,7	6,0
2006	60	TP	Š	V10b	5,24	0,0188	6,7	6,0
2006	180	ŠP	IB	V11a	6,38	0,0086	5,6	4,8
2006	180	ŠP	IB	V11b	6,38	0,0086	5,6	4,8
2006	180	ŠP	IB	V12a	6,40	0,0068	5,5	4,7
2006	180	ŠP	IB	V12b	6,40	0,0068	5,5	4,7

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B: Rezultati fizikalnokemijskih in mikrobioloških analiz namiznih oljk

Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	pH	Proste kisline (g/100 mL)	Skupno število mikroorganizmov (log CFU/mL)	Število kvasovk (log CFU/mL)
2006	180	ŠP	Š	V15a	6,18	0,0086	4,9	4,9
2006	180	ŠP	Š	V15b	6,18	0,0086	4,9	4,9
2006	180	ŠP	Š	V16a	6,20	0,0086	5,3	4,5
2006	180	ŠP	Š	V16b	6,20	0,0086	5,3	4,5
2006	180	TP	IB	V13a	6,42	0,0086	6,0	5,1
2006	180	TP	IB	V13b	6,42	0,0086	6,0	5,1
2006	180	TP	IB	V14a	6,43	0,0086	5,6	5,6
2006	180	TP	IB	V14b	6,43	0,0086	5,6	5,6
2006	180	TP	Š	V17a	6,34	0,0068	6,2	4,8
2006	180	TP	Š	V17b	6,34	0,0068	6,2	4,8
2006	180	TP	Š	V18a	6,28	0,0068	6,3	4,8
2006	180	TP	Š	V18b	6,28	0,0068	6,3	4,8
2007	3	ŠP	IB	M41a	7,25	0,0000	3,6	0,0
2007	3	ŠP	IB	M41b	7,26	0,0000	3,6	0,0
2007	3	ŠP	IB	M42a	6,45	0,0137	3,8	0,0
2007	3	ŠP	IB	M42b	6,45	0,0137	3,8	0,0
2007	3	ŠP	Š	M45a	7,38	0,0000	2,5	0,0
2007	3	ŠP	Š	M45b	7,36	0,0000	2,5	0,0
2007	3	ŠP	Š	M46a	7,40	0,0000	2,7	0,0
2007	3	ŠP	Š	M46b	7,40	0,0000	2,7	0,0
2007	3	TP	IB	M43a	5,75	0,0240	3,2	1,7
2007	3	TP	IB	M43b	5,78	0,0240	3,2	1,7
2007	3	TP	IB	M44a	5,56	0,0291	3,6	1,7
2007	3	TP	IB	M44b	5,57	0,0291	3,6	1,7
2007	3	TP	Š	M47a	5,56	0,0222	3,8	2,2
2007	3	TP	Š	M47b	5,56	0,0222	3,8	2,2
2007	3	TP	Š	M48a	5,55	0,0222	3,3	2,2
2007	3	TP	Š	M48b	5,54	0,0222	3,3	2,2
2007	10	ŠP	IB	M51a	6,96	0,0068	0,0	0,0
2007	10	ŠP	IB	M51b	6,97	0,0068	0,0	0,0
2007	10	ŠP	IB	M52a	6,87	0,0068	0,0	0,0
2007	10	ŠP	IB	M52b	6,87	0,0068	0,0	0,0
2007	10	ŠP	Š	M55a	7,04	0,0000	5,1	0,0
2007	10	ŠP	Š	M55b	7,02	0,0000	5,1	0,0
2007	10	ŠP	Š	M56a	7,01	0,0000	5,0	2,4
2007	10	ŠP	Š	M56b	7,02	0,0000	5,0	2,4
2007	10	TP	IB	M53a	5,06	0,0342	5,5	2,7
2007	10	TP	IB	M53b	5,07	0,0342	5,5	2,7
2007	10	TP	IB	M54a	5,11	0,0325	5,5	2,0
2007	10	TP	IB	M54b	5,11	0,0325	5,5	2,0
2007	10	TP	Š	M57a	4,91	0,0342	5,3	2,5
2007	10	TP	Š	M57b	4,93	0,0342	5,3	2,5

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B: Rezultati fizikalnokemijskih in mikrobioloških analiz namiznih oljk

Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	pH	Proste kisline (g/100 mL)	Skupno število mikroorganizmov (log CFU/mL)	Število kvasovk (log CFU/mL)
2007	10	TP	Š	M58a	4,94	0,0342	5,4	2,7
2007	10	TP	Š	M58b	4,96	0,0342	5,4	2,7
2007	20	ŠP	IB	M61a	6,94	0,0000	5,8	2,5
2007	20	ŠP	IB	M61b	6,95	0,0000	5,8	2,5
2007	20	ŠP	IB	M62a	6,90	0,0000	6,2	3,2
2007	20	ŠP	IB	M62b	6,90	0,0000	6,2	3,2
2007	20	ŠP	Š	M65a	7,10	0,0000	5,7	2,3
2007	20	ŠP	Š	M65b	7,12	0,0000	5,7	2,3
2007	20	ŠP	Š	M66a	7,11	0,0000	4,5	2,5
2007	20	ŠP	Š	M66b	7,10	0,0000	4,5	2,5
2007	20	TP	IB	M63a	5,33	0,0171	5,9	3,0
2007	20	TP	IB	M63b	5,32	0,0171	5,9	3,0
2007	20	TP	IB	M64a	5,15	0,0171	6,2	3,2
2007	20	TP	IB	M64b	5,17	0,0171	6,2	3,2
2007	20	TP	Š	M67a	5,32	0,0137	5,5	3,4
2007	20	TP	Š	M67b	5,32	0,0137	5,5	3,4
2007	20	TP	Š	M68a	5,05	0,0137	6,1	3,9
2007	20	TP	Š	M68b	5,07	0,0137	6,1	3,9
2007	30	ŠP	IB	M71a	6,80	0,0068	5,3	4,1
2007	30	ŠP	IB	M71b	6,81	0,0068	5,3	4,1
2007	30	ŠP	IB	M72a	6,82	0,0068	5,0	3,5
2007	30	ŠP	IB	M72b	6,81	0,0068	5,0	3,5
2007	30	ŠP	Š	M75a	6,82	0,0068	6,1	1,0
2007	30	ŠP	Š	M75b	6,82	0,0068	6,1	1,0
2007	30	ŠP	Š	M76a	6,84	0,0068	7,0	1,5
2007	30	ŠP	Š	M76b	6,86	0,0068	7,0	1,5
2007	30	TP	IB	M73a	5,22	0,0205	5,3	4,2
2007	30	TP	IB	M73b	5,23	0,0205	5,3	4,2
2007	30	TP	IB	M74a	5,14	0,0222	5,8	4,1
2007	30	TP	IB	M74b	5,14	0,0222	5,8	4,1
2007	30	TP	Š	M77a	5,28	0,0325	5,7	4,0
2007	30	TP	Š	M77b	5,28	0,0325	5,7	4,0
2007	30	TP	Š	M78a	4,98	0,0342	6,1	5,4
2007	30	TP	Š	M78b	5,00	0,0342	6,1	5,4
2007	60	ŠP	IB	V22a	6,72	0,0205	6,4	3,7
2007	60	ŠP	IB	V22b	6,71	0,0205	6,4	3,7
2007	60	ŠP	IB	V23a	6,41	0,0282	7,2	3,7
2007	60	ŠP	IB	V23b	6,43	0,0257	7,2	3,7
2007	60	ŠP	Š	V26a	6,48	0,0188	7,0	3,2
2007	60	ŠP	Š	V26b	6,49	0,0188	7,0	3,2
2007	60	ŠP	Š	V27a	6,30	0,0171	7,1	3,2
2007	60	ŠP	Š	V27b	6,29	0,0171	7,1	3,2

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B: Rezultati fizikalnokemijskih in mikrobioloških analiz namiznih oljk

Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	pH	Proste kisline (g/100 mL)	Skupno število mikroorganizmov (log CFU/mL)	Število kvasovk (log CFU/mL)
2007	60	TP	IB	V24a	4,91	0,0599	5,2	4,9
2007	60	TP	IB	V24b	4,95	0,0599	5,2	4,9
2007	60	TP	IB	V25a	5,16	0,0462	6,0	4,9
2007	60	TP	IB	V25b	5,13	0,0462	6,0	4,9
2007	60	TP	Š	V28a	5,10	0,0257	5,9	5,1
2007	60	TP	Š	V28b	5,11	0,0257	5,9	5,1
2007	60	TP	Š	V29a	4,70	0,0411	6,0	5,2
2007	60	TP	Š	V29b	4,70	0,0411	6,0	5,2
2007	180	ŠP	IB	V30a	6,05	0,0086	6,2	4,9
2007	180	ŠP	IB	V30b	6,06	0,0086	6,2	4,9
2007	180	ŠP	IB	V31a	6,24	0,0068	7,3	3,7
2007	180	ŠP	IB	V31b	6,24	0,0068	7,3	3,7
2007	180	ŠP	Š	V34a	5,36	0,0068	6,3	5,4
2007	180	ŠP	Š	V34b	5,37	0,0068	6,3	5,4
2007	180	ŠP	Š	V35a	5,58	0,0051	6,6	5,7
2007	180	ŠP	Š	V35b	5,58	0,0051	6,6	5,7
2007	180	TP	IB	V32a	4,42	0,2105	5,4	5,9
2007	180	TP	IB	V32b	4,42	0,2105	5,4	5,9
2007	180	TP	IB	V33a	4,14	0,2345	5,5	5,3
2007	180	TP	IB	V33b	4,15	0,2345	5,5	5,3
2007	180	TP	Š	V36a	4,63	0,0804	4,6	5,5
2007	180	TP	Š	V36b	4,62	0,0804	4,6	5,5
2007	180	TP	Š	V37a	4,55	0,0787	6,6	5,1
2007	180	TP	Š	V37b	4,53	0,0787	6,6	5,1

Priloga C: Rezultati vsebnosti biofenolov in antioksidativna učinkovitost namiznih oljk

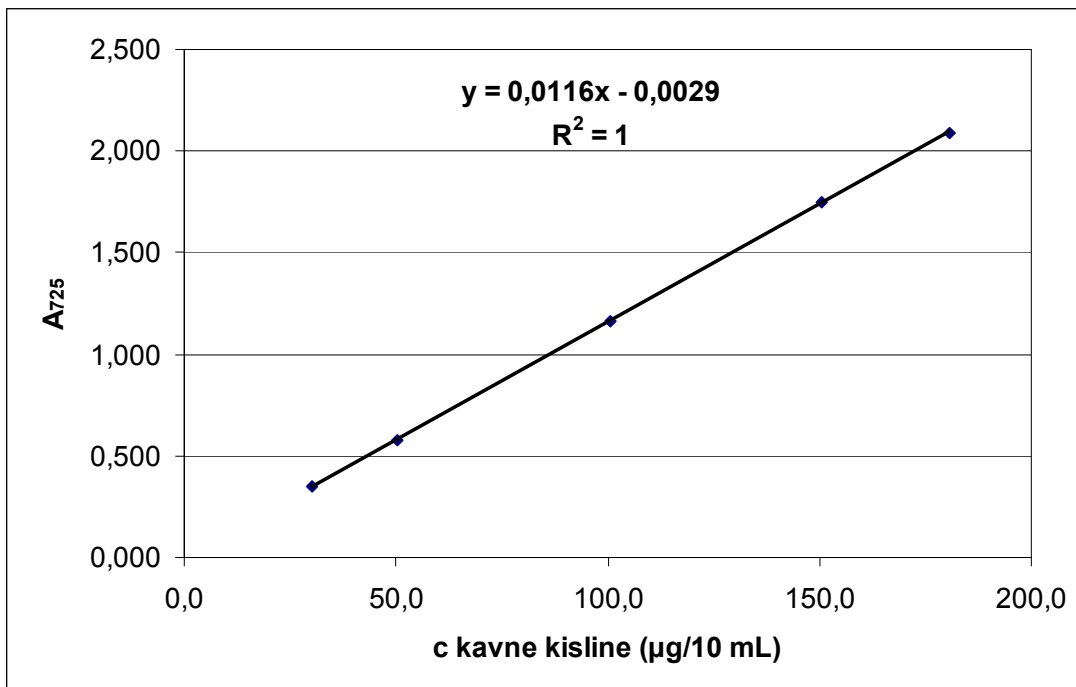
Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	Vsebnost skupnih biofenolov		TyrOH (mg/kg)	Tyr (mg/kg)	ARP (mg ⁻¹)
					FC (mg/kg)	HPLC (mg/kg)			
2006	60	ŠP	IB	V3a	179	196	8,5	9,4	0,0344
2006	60	ŠP	IB	V3b	198	190	8,1	10,8	0,0372
2006	60	ŠP	IB	V4a	120	165	8,5	10,7	0,0322
2006	60	ŠP	IB	V4b	113	156	8,9	11,4	0,0328
2006	60	ŠP	Š	V7a	172	235	37,1	8,1	0,0584
2006	60	ŠP	Š	V7b	180	237	38,2	6,6	0,0585
2006	60	ŠP	Š	V8a	160	133	22,0	6,9	0,0177
2006	60	ŠP	Š	V8b	154	128	18,6	6,1	0,0177
2006	60	TP	IB	V5a	3084	5695	445,7	50,9	0,6509
2006	60	TP	IB	V5b	3072	5919	454,9	51,1	0,6383
2006	60	TP	IB	V6a	3460	5834	493,6	55,8	0,7740
2006	60	TP	IB	V6b	3437	5765	488,7	55,4	0,7564
2006	60	TP	Š	V9a	1085	1368	191,7	28,0	0,2717
2006	60	TP	Š	V9b	1090	976	186,1	31,7	0,2717
2006	60	TP	Š	V10a	1094	1014	160,5	18,7	0,2186
2006	60	TP	Š	V10b	1045	1076	164,9	20,4	0,2215
2006	180	ŠP	IB	V11a	165	83	5,7	5,0	0,0187
2006	180	ŠP	IB	V11b	160	86	10,8	6,3	0,0187
2006	180	ŠP	IB	V12a	100	65	5,1	6,8	0,0139
2006	180	ŠP	IB	V12b	112	66	5,8	5,1	0,0139
2006	180	ŠP	Š	V15a	49	50	6,4	7,7	0,0090
2006	180	ŠP	Š	V15b	45	49	6,6	7,1	0,0090
2006	180	ŠP	Š	V16a	28	40	7,5	6,3	0,0110
2006	180	ŠP	Š	V16b	38	35	4,8	6,1	0,0110
2006	180	TP	IB	V13a	1210	1356	136,1	24,6	0,3086
2006	180	TP	IB	V13b	1234	1391	139,5	24,7	0,3096
2006	180	TP	IB	V14a	1300	1414	135,8	21,7	0,2916
2006	180	TP	IB	V14b	1279	1485	134,4	21,4	0,2942
2006	180	TP	Š	V17a	403	534	50,5	13,9	0,1159
2006	180	TP	Š	V17b	401	521	51,6	13,7	0,1157
2006	180	TP	Š	V18a	678	526	57,0	15,3	0,1070
2006	180	TP	Š	V18b	640	593	57,4	14,8	0,1074
2007	60	ŠP	IB	V22a	111	98	7,7	9,9	0,0130
2007	60	ŠP	IB	V22b	125	94	8,2	9,3	0,0130
2007	60	ŠP	IB	V23a	104	84	10,6	11,6	0,0201
2007	60	ŠP	IB	V23b	101	81	10,7	12,1	0,0201
2007	60	ŠP	Š	V26a	93	89	7,8	5,5	0,0222
2007	60	ŠP	Š	V26b	95	91	7,1	6,2	0,0222
2007	60	ŠP	Š	V27a	102	96	7,4	6,8	0,0261
2007	60	ŠP	Š	V27b	102	99	7,8	6,8	0,0261
2007	60	TP	IB	V24a	3716	5581	1016,9	124,4	0,6314
2007	60	TP	IB	V24b	3704	5721	995,4	132,1	0,6395

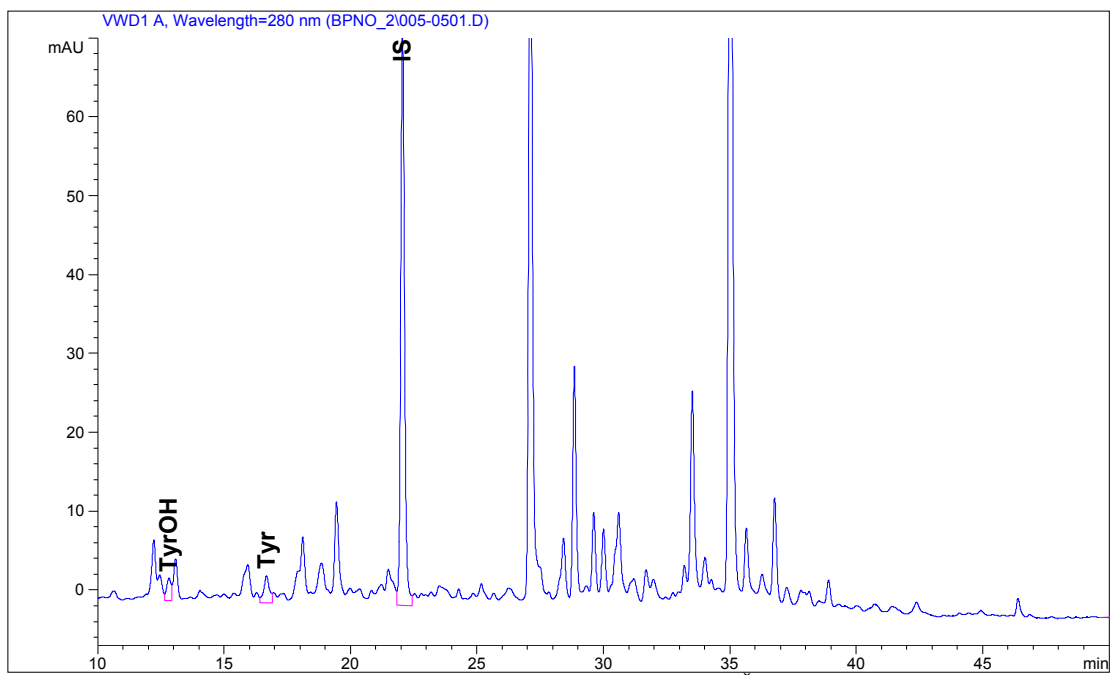
Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: Rezultati vsebnosti biofenolov in antioksidativna učinkovitost namiznih oljk

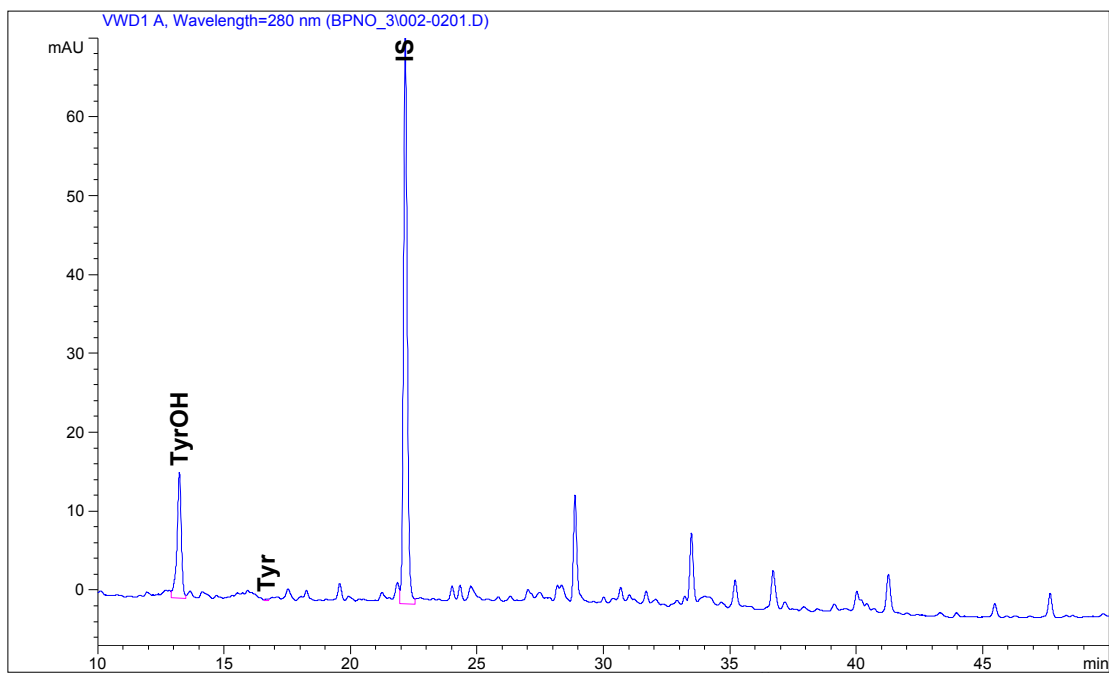
Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	Vsebnost skupnih biofenolov		TyrOH (mg/kg)	Tyr (mg/kg)	ARP (mg ⁻¹)
					FC (mg/kg)	HPLC (mg/kg)			
2007	60	TP	IB	V25a	3597	5302	985,3	129,9	0,6480
2007	60	TP	IB	V25b	3579	5302	981,0	129,2	0,6480
2007	60	TP	Š	V28a	1890	2244	576,3	48,1	0,3472
2007	60	TP	Š	V28b	1878	2232	574,3	47,4	0,3472
2007	60	TP	Š	V29a	1918	2288	595,0	51,7	0,3098
2007	60	TP	Š	V29b	1912	2219	594,6	53,2	0,3098
2007	180	ŠP	IB	V30a	100	55	4,1	4,1	0,0100
2007	180	ŠP	IB	V30b	94	55	4,2	4,6	0,0100
2007	180	ŠP	IB	V31a	94	49	6,2	3,2	0,0169
2007	180	ŠP	IB	V31b	92	47	6,4	2,7	0,0169
2007	180	ŠP	Š	V34a	63	74	4,3	4,3	0,0126
2007	180	ŠP	Š	V34b	59	74	3,9	3,9	0,0126
2007	180	ŠP	Š	V35a	64	69	4,5	4,6	0,0115
2007	180	ŠP	Š	V35b	66	65	6,3	4,6	0,0115
2007	180	TP	IB	V32a	3098	4872	807,3	99,8	0,6261
2007	180	TP	IB	V32b	3102	4767	823,0	97,5	0,6340
2007	180	TP	IB	V33a	3111	4231	752,3	91,7	0,4913
2007	180	TP	IB	V33b	3103	4262	758,4	89,3	0,4889
2007	180	TP	Š	V36a	1370	1578	478,3	40,1	0,2927
2007	180	TP	Š	V36b	1354	1600	487,4	41,4	0,2927
2007	180	TP	Š	V37a	1320	1487	430,3	43,4	0,2436
2007	180	TP	Š	V37b	1314	1515	429,5	45,7	0,2448

Priloga D: Umeritvena krivulja za spektrofotometrično določevanje vsebnosti skupnih biofenolov

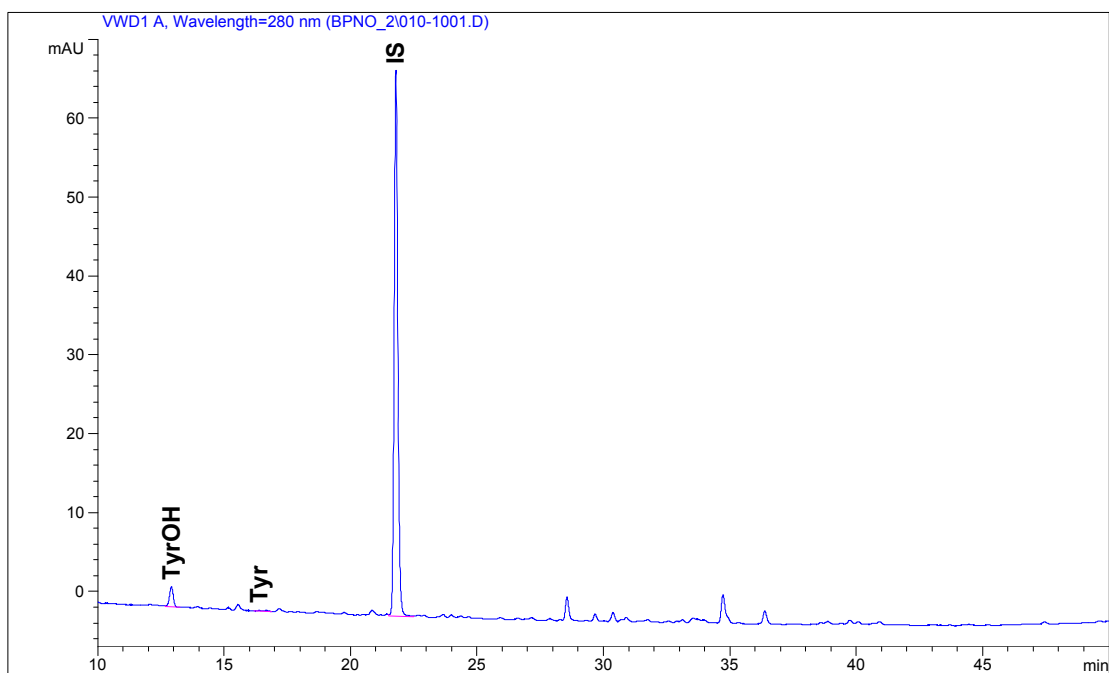




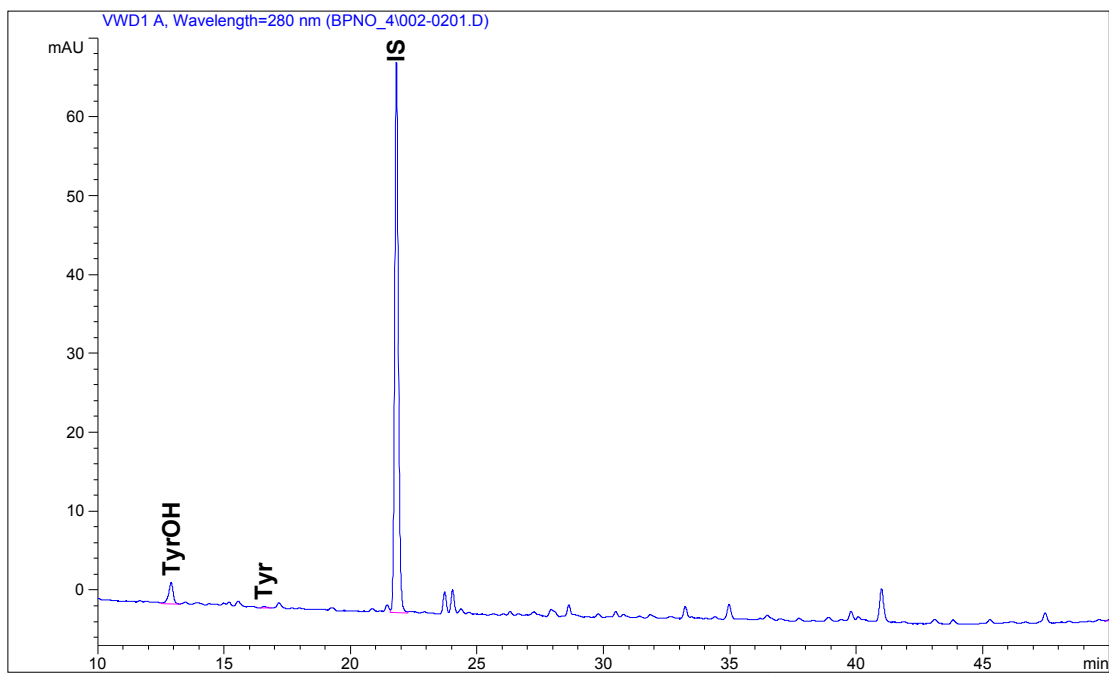
Priloga E1: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v plodovih sorte 'Štorta' pred predelavo, letnik 2006



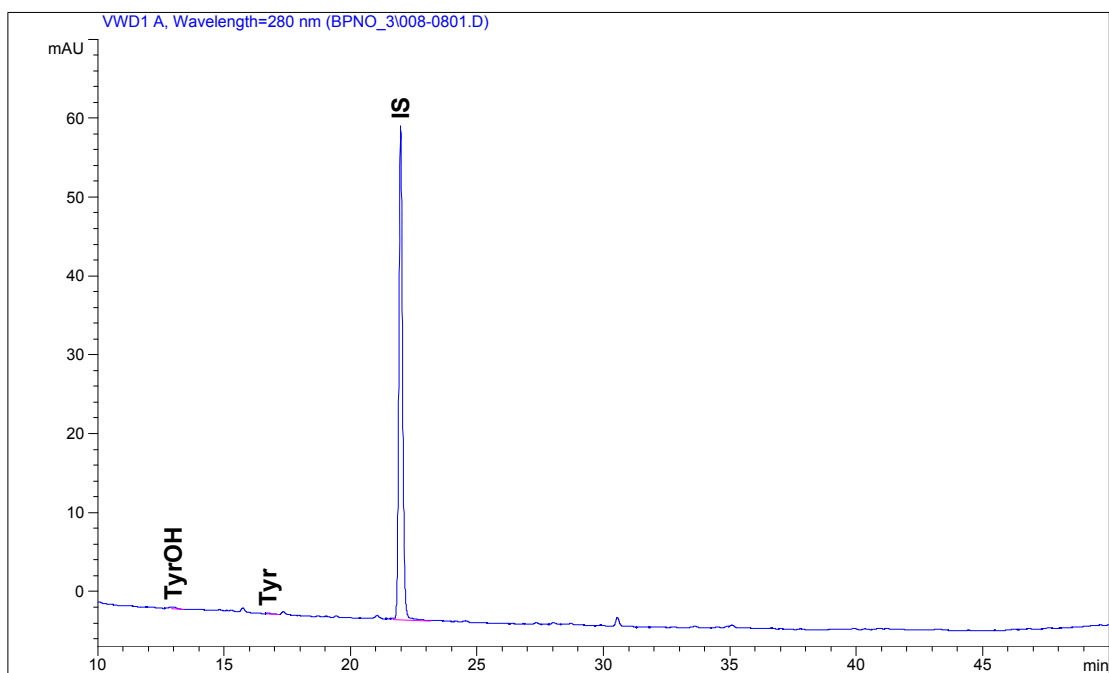
Priloga E2: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na tradicionalni način, po 60-ih dneh fermentacije, letnik 2006



Priloga E3: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na modificirani španski način, po 60-ih dneh fermentacije, letnik 2006



Priloga E4: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na tradicionalni način, po 180-ih dneh fermentacije, letnik 2006



Priloga E5: Kromatogram HPLC določitve biofenolov v namiznih oljkah 'Štorta', predelanih na modificirani španski način, po 180-ih dneh fermentacije, letnik 2006

Priloga F: Restriksijski fragmenti

Oznaka vzorca	Restriksijski fragmenti		
	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinFI</i>
BA-06	700	640	310 + 310
FA-06	580	600	320
D1-06	330	510 + 70	360 + 290
D2-06	330	510	320 + 260
A2-06	200 + 100	280 + 110	210 + 180
A1-06	200 + 90	270 + 110	210 + 170
H2-06	190 + 90	280 + 110	210 + 180
Š1-06	210 + 90	300 + 120	210 + 170
S1-06	210 + 100	300 + 130	200 + 160
O1-06	210 + 100	290 + 120	180 + 150
E1-06	210 + 100	290 + 110	180 + 150
S2-06	210 + 100	310 + 120	200 + 170
O2-06	200 + 100	290 + 110	180 + 150
T2-06	200 + 100	300 + 120	200 + 170
G2-06	200 + 90	280 + 110	210 + 180
V1-06	200 + 100	290 + 120	210 + 180
R2-06	200 + 90	290 + 120	210 + 180
E2-06	200 + 90	290 + 120	180 + 160
Z1-06	200 + 90	290 + 130	210 + 180
G1-06	200 + 90	280 + 110	210 + 180
H1-06	190 + 90	280 + 110	210 + 180
A2-07	180 + 100	420 + 150	280 + 170 + 130
A3-07	180 + 90	420 + 150	280 + 180 + 120
A4-07	180 + 100	420 + 150	280 + 180 + 130
B1-07	180 + 100	420 + 140	270 + 170 + 130
B2-07	180 + 100	420 + 140	270 + 170 + 120
B4-07	300 + 220 + 100	390 + 220	330 + 210
B5-07	300 + 230 + 100	390 + 220	330 + 210
C4-07	180 + 100	420 + 150	280 + 170 + 130
C6-07	180 + 90	430 + 140	280 + 180 + 130

Priloga G: Rezultati senzoričnega ocenjevanja namiznih oljk

Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	Slano	Grenko	Kislo	Trdota	Vlaknatost	Plesnivo
2006	60	ŠP	IB	V3a	6,0	1,0	0,3	4,9	2,2	0,0
2006	60	ŠP	IB	V3b	5,9	1,1	0,3	5,0	2,4	0,0
2006	60	ŠP	IB	V4a	6,8	1,0	0,6	4,7	2,5	0,0
2006	60	ŠP	IB	V4b	6,5	1,0	0,5	4,8	2,5	0,0
2006	60	ŠP	Š	V7a	6,0	1,0	0,6	6,1	6,0	0,0
2006	60	ŠP	Š	V7b	6,1	1,1	0,7	6,2	6,2	0,0
2006	60	ŠP	Š	V8a	5,8	1,0	0,5	6,3	6,1	0,0
2006	60	ŠP	Š	V8b	5,9	1,0	0,4	6,5	6,0	0,0
2006	60	TP	IB	V5a	5,5	4,0	1,0	6,0	4,0	0,0
2006	60	TP	IB	V5b	5,4	4,3	0,9	5,8	4,1	0,0
2006	60	TP	IB	V6a	5,1	4,3	0,5	5,9	3,6	0,0
2006	60	TP	IB	V6b	5,2	4,2	0,8	6,0	4,0	0,0
2006	60	TP	Š	V9a	5,7	1,6	0,8	5,3	6,0	0,0
2006	60	TP	Š	V9b	5,8	1,5	1,0	5,4	6,4	0,0
2006	60	TP	Š	V10a	5,8	1,5	0,5	5,5	6,3	0,0
2006	60	TP	Š	V10b	5,8	1,5	1,0	5,3	6,2	0,0
2006	180	ŠP	IB	V11a	5,0	0,5	0,5	2,1	1,5	0,0
2006	180	ŠP	IB	V11b	4,8	0,8	0,7	2,0	1,3	0,0
2006	180	ŠP	IB	V12a	5,6	0,5	0,5	1,5	1,0	0,0
2006	180	ŠP	IB	V12b	5,0	0,5	0,4	1,8	1,2	0,0
2006	180	ŠP	Š	V15a	5,5	0,9	0,5	4,3	4,5	0,0
2006	180	ŠP	Š	V15b	5,4	1,0	0,6	4,2	4,4	0,0
2006	180	ŠP	Š	V16a	5,5	0,9	0,8	4,0	4,8	0,0
2006	180	ŠP	Š	V16b	5,5	1,1	0,7	4,0	4,7	0,0
2006	180	TP	IB	V13a	5,0	3,7	1,0	5,0	3,5	0,0
2006	180	TP	IB	V13b	5,1	3,9	0,8	5,1	3,9	0,0
2006	180	TP	IB	V14a	5,4	4,0	0,6	5,0	4,2	0,0
2006	180	TP	IB	V14b	5,2	3,8	0,9	4,9	4,0	0,0
2006	180	TP	Š	V17a	5,0	1,5	0,5	5,0	5,6	0,0
2006	180	TP	Š	V17b	4,8	1,6	0,5	5,0	5,9	0,0
2006	180	TP	Š	V18a	5,4	2,0	0,9	5,0	5,7	0,0
2006	180	TP	Š	V18b	5,2	1,8	0,8	5,0	5,7	0,0
2007	60	ŠP	IB	V22a	6,0	1,0	2,0	1,5	1,0	2,0
2007	60	ŠP	IB	V22b	5,9	1,1	1,9	1,8	1,2	1,8
2007	60	ŠP	IB	V23a	5,9	2,2	1,5	1,9	1,5	0,0
2007	60	ŠP	IB	V23b	6,0	2,5	1,8	1,7	1,3	0,0
2007	60	ŠP	Š	V26a	4,5	1,0	1,0	1,4	1,0	5,5
2007	60	ŠP	Š	V26b	4,6	1,0	1,2	1,4	1,0	5,3
2007	60	ŠP	Š	V27a	4,7	1,2	1,2	1,0	1,0	0,0
2007	60	ŠP	Š	V27b	4,6	1,3	1,1	1,3	1,0	0,0
2007	60	TP	IB	V24a	4,5	5,0	1,8	4,5	3,0	0,0
2007	60	TP	IB	V24b	4,4	4,9	2,0	4,6	3,4	0,0

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge G: Rezultati senzoričnega ocenjevanja namiznih oljk

Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	Slano	Grenko	Kislo	Trdota	Vlaknatost	Plesnivo
2007	60	TP	IB	V25a	4,6	4,8	1,7	4,5	3,5	0,0
2007	60	TP	IB	V25b	4,6	4,8	1,9	4,5	3,5	0,0
2007	60	TP	Š	V28a	4,0	3,0	1,2	4,5	4,0	0,0
2007	60	TP	Š	V28b	3,9	2,8	1,3	4,4	4,1	0,0
2007	60	TP	Š	V29a	4,4	2,5	1,3	4,5	4,2	0,0
2007	60	TP	Š	V29b	4,1	2,6	1,3	4,6	4,2	0,0
2007	180	ŠP	IB	V30a	5,9	1,2	1,5	1,0	0,9	0,0
2007	180	ŠP	IB	V30b	5,8	1,1	1,6	1,1	1,0	0,0
2007	180	ŠP	IB	V31a	5,6	1,2	1,4	1,0	1,0	0,0
2007	180	ŠP	IB	V31b	5,5	1,5	1,2	0,9	1,1	0,0
2007	180	ŠP	Š	V34a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0
2007	180	ŠP	Š	V34b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1
2007	180	ŠP	Š	V35a	5,0	1,1	1,0	1,0	1,0	0,0
2007	180	ŠP	Š	V35b	4,9	1,2	1,0	1,2	1,2	0,0
2007	180	TP	IB	V32a	4,5	4,0	1,4	4,5	3,0	0,0
2007	180	TP	IB	V32b	4,4	4,3	1,5	4,8	3,2	0,0
2007	180	TP	IB	V33a	4,5	4,5	1,5	4,9	3,0	1,5
2007	180	TP	IB	V33b	4,6	4,5	1,6	4,7	3,1	1,2
2007	180	TP	Š	V36a	4,5	3,0	1,5	4,5	4,2	0,0
2007	180	TP	Š	V36b	4,6	3,1	1,5	4,8	4,4	0,0
2007	180	TP	Š	V37a	4,5	2,5	1,2	4,6	4,5	0,0
2007	180	TP	Š	V37b	4,5	2,9	1,4	4,6	4,6	0,0

SENZORIČNO OCENJEVANJE NAMIZNIH OLJK

OCENJEVALNI LIST

INTENZIVNOST NEGATIVNIH ZNAČILNOSTI

Nepravilna fermentacija _____
(tip)

Druge napake _____

INTENZIVNOST ZAZNANIH OKUSOV

Slano _____

Grenko _____

Kislo _____

INTENZIVNOST KINESTETIČNIH ZAZNAV

Trdota _____

Vlaknatost _____

Hrustljivost _____

Oznaka vzorca: Priimek in ime preskuševalca:

Datum:

Priloga H: Ocenjevalni list (Sensory analysis of table olives, 2008)

Priloga I: Suha snov v vzorcih plodov in namiznih oljk

Letnik	Dnevi	Tehnologija	Sorta	Oznaka vzorca	Suha snov (%)
2006	0	-	IB	V1	36,31
2006	0	-	Š	V2	39,27
2006	60	ŠP	IB	V3	33,88
2006	60	ŠP	IB	V4	32,43
2006	60	TP	IB	V5	35,61
2006	60	TP	IB	V6	34,76
2006	60	ŠP	Š	V7	33,13
2006	60	ŠP	Š	V8	31,85
2006	60	TP	Š	V9	31,67
2006	60	TP	Š	V10	32,36
2006	180	ŠP	IB	V11	32,92
2006	180	ŠP	IB	V12	32,53
2006	180	TP	IB	V13	33,94
2006	180	TP	IB	V14	34,55
2006	180	ŠP	Š	V15	31,46
2006	180	ŠP	Š	V16	31,28
2006	180	TP	Š	V17	32,05
2006	180	TP	Š	V18	33,76
2007	0	-	IB	V20	33,27
2007	0	-	Š	V21	31,84
2007	60	ŠP	IB	V22	30,78
2007	60	ŠP	IB	V23	29,08
2007	60	TP	IB	V24	32,97
2007	60	TP	IB	V25	32,47
2007	60	ŠP	Š	V26	28,05
2007	60	ŠP	Š	V27	27,90
2007	60	TP	Š	V28	32,55
2007	60	TP	Š	V29	33,60
2007	180	ŠP	IB	V30	26,97
2007	180	ŠP	IB	V31	27,45
2007	180	TP	IB	V32	33,10
2007	180	TP	IB	V33	33,24
2007	180	ŠP	Š	V34	28,77
2007	180	ŠP	Š	V35	29,05
2007	180	TP	Š	V36	31,18
2007	180	TP	Š	V37	31,76