

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jana DRNOVŠČEK

**VPLIV SORTE OLJKE (*Olea europaea*) NA
KEMIJSKE IN DIELEKTRIČNE LASTNOSTI
PLODOV IN OLJA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jana DRNOVŠČEK

**VPLIV SORTE OLJKE (*Olea europaea*) NA KEMIJSKE IN DIELEKTRIČNE
LASTNOSTI PLODOV IN OLJA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**THE EFFECT OF OLIVE CULTIVAR (*Olea europaea*) ON CHEMICAL AND
DIELECTRICAL PROPERTIES OF OLIVES AND OLIVE OIL**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science Technology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biokemijo in kemijo živil, Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil ter na Katedri za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Natašo Šegatin, za somentorja prof. dr. Rajka Vidriha in za recenzenta doc. dr. Tomaža Polaka.

Mentorica: doc. dr. Nataša Šegatin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Somentor: prof. dr. Rajko Vidrih
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzent: doc. dr. Tomaž Polak
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jana Drnovšček

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 634.63:664.34:543.2/.9:537.226(043)=163.6
KG oljka/ *Olea europaea*/ plodovi oljke/ oljčno olje/ sestava oljk/ maščobno kislinska sestava/ fenolne spojine/ antioksidativna učinkovitost/ proste maščobne kisline/ peroksidno število/ dielektrične lastnosti
AV DRNOVŠČEK, Jana, dipl. inž. živ. in prehr. (UN)
SA ŠEGATIN, Nataša (mentorica) / VIDRIH, Rajko (somentor) / POLAK, Tomaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2015
IN VPLIV SORTE OLJKE (*Olea europaea*) NA KEMIJSKE IN DIELEKTRIČNE LASTNOSTI PLODOV IN OLJA
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)
OP XII, 57 str., 20 pregl., 20 sl., 4 pril., 53 vir.
IJ sl
Jl sl/en
AI Namen magistrske naloge je primerjava plodov oljke in oljčnega olja iste sorte ter ugotoviti razlike med sortami na Goriškem območju. Pri analizah smo uporabili pet različnih sort: Drobnico, Črnico, Belico, Leccino in Bugo. Plodovom oljke smo določili vsebnost vode in maščobe. Skladno z jesenskim deževjem v letu 2013 smo določili povečano vsebnost vode in posledično nižjo oljevitost. Tako plodovom kot tudi olju smo določili maščobno kislinsko sestavo in po pričakovanjih določili najvišjo vsebnost oleinske kisline. Vzorcem olja smo določili tudi proste maščobne kisline (FFA) in peroksidno število (PŠ) ter potrdili, da je olje kakovostno in da spada v kategorijo ekstra deviško oljčno olje (EDOO). S pomočjo etanolnih ekstraktov oljk in metanolnih ekstraktov olja smo določili fenolne spojine (FS) s Folin-Ciocalteu reagentom (FC) in antioksidativno učinkovitost (AU) z DPPH· metodo. Ugotovili smo, da se vsebnost FS s predelavo za isto sorto oljke in olja spreminja, olja vsebujejo znatno manj FS. Vsem vzorcem smo določili AU, vendar je tudi AU odvisna od sorte. Pri analizi dielektričnih lastnosti oljk smo ugotovili, da plodovi oljke odražajo bolj prevodnost kot dielektričnost in, da je specifična električna prevodnost zmletega mesa plodov odvisna od sorte oljk. Dielektrične konstante mesa plodov z uporabljenno opremo ni bilo mogoče določiti. Dielektrična konstanta oljčnega olja je pri frekvencah do 1000 Hz najvišja in se znižuje z naraščajočo frekvenco, medtem ko specifična električna prevodnost olja z naraščajočo frekvenco narašča. Pri 20 °C smo določili dielektrično konstanto oljčnega olja med 3,0692 in 3,1111 ter prevodnosti pri 400 Hz med 0,034 in 1,700 S/m.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 634.63:664.34:543.2/.9:537.226(043)=163.6
CX olives/ *Olea europaea*/ olive fruit/ olive oil/ olive composition/ fatty acid composition/ phenolics/ antioxidant capacity/ free fatty acid/ peroxide value/ dielectrical properties
AU DRNOVŠČEK, Jana, dipl. inž. živ. in prehr. (UN)
AA ŠEGATIN, Nataša (supervisor)/ VIDRIH, Rajko (co-advisor)/ POLAK, Tomaž (reviewer)
PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2015
TI THE EFFECT OF OLIVE CULTIVAR (*Olea europaea*) ON CHEMICAL AND DIELECTRICAL PROPERTIES OF OLIVES AND OLIVE OIL
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
NO XII, 57 p., 20 tab., 20 fig., 4 ann., 53 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of the master's thesis is to compare olives and olive oil of the same species and to identify the differences between species in the Goriška region. In the analysis we used five different olive species: Drobница, Črnica, Belica, Leccino and Buga. For each olive we determined the content of water and fat. In accordance with the rains in autumn 2013 we defined the increased water and consequently the lower oil content. We also determined fatty acid composition and as expected we established the highest oleic acid content for all olive fruits and olive oil. For various olive oil samples we determined free fatty acids (FFA) and the peroxide value (PV). We confirmed that the oil is of high quality and belongs in the category of extra virgin olive oil (EDOO). With ethanol extracts of olives and methanol extracts of olive oil we determined the total phenols with the Folin-Ciocalteu (FC) reagent and antioxidant capacity (AC) with DPPH· method. We have established that the level of phenols while processing the same species of olive and olive oil, changes, while the oils contain significantly less SF. For each sample we defined the antioxidant level; however the antioxidant capacity depends on the species of olive tree. When analyzing the dielectric properties of olive fruits, we established that olive tree fruits reflect more conductivity than permittivity and that the specific electrical conductivity of the pulverized olive fruits depends on the olive tree species. We could not specify the dielectric constant of pulverized olives with the used equipment. The dielectric constant of olive oil is at its maximum at frequencies up to 1000 Hz and decreases with the increasing frequencies. The specific electrical conductivity of olive oil on the other hand, increases with the increasing frequency. We determined the dielectric constant of olive oil at 20 °C. It was between 3,0692 and 3,1111, while the conductivity was between 0,034 and 1,700 S/m at 400 Hz.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OLJKARSTVO	3
2.1.1 Izvor in razširjenost	4
2.1.2 Vpliv ekoloških dejavnikov na kakovost oljk in oljčnega olja	4
2.1.2.1 Temperatura	4
2.1.2.2 Svetloba	5
2.1.2.3 Voda	5
2.1.2.4 Veter	5
2.1.2.5 Tla	5
2.1.3 Vpliv sorte na kakovost oljk in oljčnega olja	5
2.1.3.1 Belica	6
2.1.3.2 Buga	6
2.1.3.3 Črnica	6
2.1.3.4 Drobica	6
2.1.3.5 Leccino	7
2.1.4 Oljčno olje – zakonske osnove	8
2.2 SESTAVA OLJK IN OLJA	8
2.2.1 Sestava in kakovost oljk	8
2.2.2 Sestava in kakovost oljčnega olja	10
2.2.1 Analiza kakovosti oljk in oljčnega olja	11
2.2.1.1 Analiza kakovosti plodov	11
2.2.1.2 Analiza kakovosti oljčnega olja	12
2.3 DIELEKTRIČNA KONSTANTA IN FAKTOR IZGUB	13
3 MATERIALI IN METODE DELA	15

3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Vzorčenje	15
3.1.2 Reagenti, pribor in aparature	15
3.2 METODE DELA	17
3.2.1 Kemijske analize oljk in olja	17
3.2.1.1 Delež vode v oljках	17
3.2.1.2 Vsebnost maščob v oljках	17
3.2.1.3 Postopek predelave oljčnega olja	18
3.2.1.4 Maščobno kislinska sestava plodov in olja	19
3.2.1.5 Proste maščobne kisline	20
3.2.1.6 Peroksidno število	20
3.2.1.7 Določanje skupnih fenolnih spojin (sFS) v plodovih oljk in olju	21
3.2.1.8 Določitev antioksidativne učinkovitosti (AU) ekstrakta fenolnih spojin z metodo DPPH	23
3.2.1.9 Dielektrična konstanta	24
3.2.2 Statistična analiza	28
4 REZULTATI	29
4.1 SESTAVA OLJK	29
4.2 MAŠČOBNO KISLINSKA SESTAVA OLJK IN OLJA	30
4.3 PROSTE MAŠČOBNE KISLINE (FFA) IN PEROKSIDNO ŠTEVILO (PŠ) OLJA	31
4.4 DOLOČANJE FS V PLODOVIH OLJK IN OLJU	32
4.5 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST OLJK IN OLJA NA OSNOVI EKSTRAKTOV FENOLNIH SPOJIN Z METODO DPPH	35
4.6 DIELEKTRIČNE LASTNOSTI OLJK IN OLJA	40
4.6.1 Dielektrična konstanta in prevodnost strtega mesa oljk	40
4.6.2 Dielektrična konstanta in prevodnost olja	42
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1 RAZPRAVA	48
5.2 SKLEPI	50
6 POVZETEK	51
7 VIRI	53
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mejne vrednosti za kategorizacijo deviškega oljčnega olja (Bešter in sod., 2014)	8
Preglednica 2: Kemijska sestava oljčnega ploda (Merljak in Jakob Merljak, 2014)	9
Preglednica 3: Kemijska sestava oljčnega olja (Merljak in Jakob Merljak, 2014)	10
Preglednica 4: Volumen osnovne raztopine (V), masna koncentracija galne kisline v reakcijski mešanici ($\gamma_{G,K}$) ter pripadajoča absorbanca A_{765}	22
Preglednica 5: Dielektrična konstanta cikloheksana (ϵ_{Cy}) konstanta celice (K_C) in faktor za korekcijo kapacitivnosti (C_C) pri temperaturah od 20 do 50 °C	27
Preglednica 6: Vsebnost vode in vsebnost maščobe za posamezne sorte oljk	29
Preglednica 7: Poglavitne maščobne kisline v oljках izražene kot g maščobne kisline na 100 g maščobnih kislin	30
Preglednica 8: Poglavitne maščobne kisline v oljih izražene kot g maščobne kisline na 100 g maščobnih kislin	30
Preglednica 9: Vsebnost prostih maščobnih kislin (v ut. %; kot oleinska kislina) in PŠ (v mmol O ₂ na kg olja) v vzorcih OO	31
Preglednica 10: Odtehta oljk za pripravo ekstraktov, absorbcije reakcijskih zmesi s FC reagentom pri 765 nm, vsebnost FS v ekstraktu oljk in koncentracije FS v oljках	32
Preglednica 11: Odtehta olja za pripravo ekstraktov, absorbcije reakcijskih zmesi s FC reagentom pri 765 nm, vsebnost FS v ekstraktu olj in koncentracije FS v olju	33
Preglednica 12: Statistična analiza podatkov za vsebnost fenolnih spojin v olju	33
Preglednica 13: Izmerjene vrednosti absorbanc reakcijskih zmesi ekstraktov oljk pri 517 nm po 30 minutah, masna koncentracija FS v reakcijski zmesi, delež DPPH·, ki je preostal v mešanici po 30 minutah, naklon premice (k) ter vrednost ED ₅₀ , ki podaja koncentracijo FS v reakcijski zmesi, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH·	35
Preglednica 14: Izmerjene vrednosti absorbanc reakcijskih zmesi ekstraktov olj pri 517 nm po 30 minutah, masna koncentracija FS v reakcijski zmesi, delež DPPH·, ki je preostal v mešanici po 30 minutah, naklon premice (k) ter	

vrednost ED_{50} , ki podaja koncentracijo FS v reakcijski zmesi, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH·	37
Preglednica 15: Izmerjene vrednosti absorbanc troloksa pri 517 nm po 30 minutah, masna koncentracija FS v reakcijski zmesi, delež DPPH·, ki je preostal v mešanici po 30 minutah, naklon premice (k) ter vrednost ED_{50} , ki podaja koncentracijo FS v reakcijski zmesi, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH·.....	38
Preglednica 16: Povprečna vrednost specifične prevodnosti in dielektrična konstanta določena pri frekvenci 2 MHz za strto meso oljk	41
Preglednica 17: Povprečne vrednosti dielektrične konstante olj v frekvenčnem območju od 500 Hz do 1000 Hz in različnih temperaturah	44
Preglednica 18: Faktor dielektričnih izgub olj pri 2 MHz in različnih temperaturah..	45
Preglednica 19: Specifična električna prevodnost olj pri 400 Hz in različnih temperaturah.....	46
Preglednica 20: Parametri premice za dielektrično konstanto ter parametri polinomske regresije drugega reda za faktor dielektričnih izgub za odvisnost parametra od temperature za vse vzorce olja	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Oljčni nasad v Kromberku (foto: Drnovšček J.)	3
Slika 2: Oljke avtohtone sorte Briška Drobница in Črnica (foto: Drnovšček J.)	7
Slika 3: Oljke sorte Belica, Buga in Leccino (foto: Drnovšček J.)	7
Slika 4: Aparatura Soxcap (levo) in aparatura Soxtec (desno) (foto: Drnovšček J.)...	18
Slika 5: Plinski kromatograf Agilent 6890N (foto: Drnovšček J.)	19
Slika 6: Umeritvena krivulja z galno kislino v odvisnosti absorbanca pri 765 nm od masne koncentracije galne kisline	22
Slika 7: Celica za merjenje dielektričnih lastnosti tekočih in poltekočih vzorcev (Agilent Technologies, 2000)	24
Slika 8: Fotografija sistema celice, merilnika za merjenje impedance, termostata in uporovnega termometra (foto: Drnovšček J.)	25
Slika 9: Vsebnost DPPH [•] v procentih za posamezne sorte oljk v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin, ki je ostala v reakcijski mešanici po 30 minutah	36
Slika 10: Vsebnost DPPH [•] v procentih za posamezne sorte olj v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin, ki je ostala v reakcijski mešanici po 30 minutah	38
Slika 11: Vsebnost DPPH [•] v procentih za troloks v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin, ki je ostala v reakcijski mešanici po 30 minutah	39
Slika 12: Primerjava enakih sort oljk in olja ter troloksa glede na ED ₅₀	39
Slika 13: Odvisnost specifične prevodnosti strtega mesa oljk od frekvence	40
Slika 14: Odvisnost faktorja dielektričnih izgub strtega mesa oljk od frekvence	41
Slika 15: Odvisnost dielektrične konstante strtega mesa oljk od frekvence	42
Slika 16: Odvisnost dielektrične konstante vzorcev olja sort Črnica, Drobница, Leccino in Belica od frekvence pri 25 °C in 50 °C	43
Slika 17: Odvisnost dielektrične konstante vzorca olja sorte Buga od frekvence pri 25 °C in 50 °C	43

Slika 18: Odvisnost faktorja dielektričnih izgub vzorcev olja od frekvence pri 25 °C in 50 °C	44
Slika 19: Odvisnost specifične električne prevodnosti vzorcev olja od frekvence pri 25 °C in 50 °C	45
Slika 20: Dielektrična konstanta, ϵ' , v frekvenčnem območju od 200 Hz do 2 MHz in faktor dielektričnih izgub, ϵ'' , pri frekvenci 2 MHz za vsa olja v odvisnosti od temperature	46

KAZALO PRILOG

Priloga A: Dielektrične konstante vzorcev olja sorte Črnica, Drobница, Leccino in Belica v odvisnosti od frekvence pri 20 °C in 35 °C

Priloga B: Dielektrične konstante vzorca olja Buga v odvisnosti od frekvence pri 20 °C in 35 °C

Priloga C: Faktor dielektričnih izgub vzorcev olja v odvisnosti od frekvence pri 20 °C in 35 °C

Priloga D: Specifična električna prevodnost vzorcev olja v odvisnosti od frekvence pri 20 °C in 35 °C

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°C	stopinj Celzija
AOP	antioksidativni potencial
AU	antioksidativna učinkovitost
BF ₃	borov trifluorid
DOO	deviško oljčno olje
DPPH·	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDOO	ekstra deviško oljčno olje
EtOH	etanol
FC	Folin-Ciocalteu reagent
FFA	proste maščobne kisline
HCl	klorovodikova kislina
IS	interni standard (C17:0)
MEMK	metilni estri maščobnih kislin
MetOH	metanol
MK	maščobne kisline
NaCl	natrijev klorid
NaOH	natrijev hidroksid
OO	oljčno olje
PŠ	peroksidno število
FS	fenolne spojine
sFS	skupne fenolne spojine
VMK	višje maščobne kisline

1 UVOD

Oljka je tipična sredozemska kultura in ena najstarejših gojenih dreves, ki jo je človek že v antiki skušal podrediti svojim potrebam.

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

Odvisno od sorte so oljke, plodovi oljčnega drevesa, lahko zelene ali črne barve, različnih oblik in velikosti ter okusov. V Goriških Brdih prevladujejo sorte Belica, Leccino, Buga, Gorgazzo, Črnica in Drobница. Drobница in Črnica sta avtohtoni briški sorti.

Divja oljčna drevesa so bila znana že pred približno 12 tisoč leti (Vesel in sod., 2009). Divja oljka *Olea europaea oleaster*, ki ima manjše plodove in liste ter trnaste veje, se razlikuje od nam bolj poznane gojene oljke *Olea europaea sativa*.

Ekstra deviško oljčno olje (EDOO) je olje višje kategorije, pridobljeno neposredno iz zdravih oljk in zgolj z mehanskimi postopki, pri temperaturi pod 27 stopinj Celzija (°C) - hladno stiskano. Takšno olje je primerno za uživanje takoj po predelavi. Uživanje oljčnega olja ima številne pozitivne učinke na človeški organizem, saj omogoča boljšo absorpcijo vitaminov, zlasti vitamina E, je lahko prebavljivo, pospešuje izločanje želodčnih sokov, pomaga vzdrževati zdravje srčno-žilnega sistema, omejuje razvoj ateroskleroze, ohranja elastičnost kože ter izboljša stanje krvnih lipidov. Varovalni učinki so posledica uravnotežene maščobno kislinske sestave in visoke vsebnosti antioksidantov, predvsem biofenolov.

Oljčno olje je sestavljeno predvsem iz triacilglicerolov, spojin med glicerolom in tremi maščobnimi kislinami, ki predstavljajo 98 % delež sestave. Med njimi je najbolj zastopana enkrat nenasičena oleinska kislina. Ostalega 2 % predstavljajo minorne oz. nemaščobne snovi, ki olje ščitijo, mu plemenitijo aromo in barvo ter pozitivno učinkujejo na zdravje našega telesa. Snovi, ki nastanejo v plodu oljke z biosintetskimi reakcijami in se prenesejo v oljčno olje, so med drugim odvisne tudi od sorte oljke.

Oljčno olje se uporablja tudi v kozmetiki za nego las, kože in mišic. Najdemo ga v milih, različnih kremah, iz oljčnih listov se pripravlja čaj, ki pomaga pri povišanem krvnem tlaku. Les oljke lahko služi za kurjavo in izdelavo raznih lesenih izdelkov.

Na območju Goriških Brd predstavlja tudi oljkarstvo pomembno kmetijsko panogo, ki poleg vinogradništva in sadjarstva skrbi za prepoznavnost pokrajine. Na tem območju smo ustanovili Društvo oljkarjev Brda, ki stremi k poenotenju blagovne znamke »Uelije« za boljšo prepoznavnost produkta v širši okolici. Naš cilj je, da bi tudi briško olje slovelo kot oljčno olje vrhunske kakovosti in zelo polnega okusa, kar nam pridelovanje oljk na manjših površinah in tradicionalni postopki predelave vsekakor omogočajo.

1.1 CILJI NALOGE

V magistrski nalogi smo iz 5 različnih sort oljk Belica, Leccino, Buga, Črnica in Drobna in iz njih iztisnjenega olja analizirali kemijsko sestavo plodov in ekstra deviškega oljčnega olja. V plodovih smo ugotavljali delež vode in maščobe. V oljčnem olju smo kot ene izmed pokazateljev kakovosti določali peroksidno število in proste maščobne kisline. Posameznim sortam sadežev in olja smo določili maščobno kislinsko sestavo, vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost, ter dielektrično konstanto in električno prevodnost. Cilji naloge so ovrednotiti razlike med plodovi in olji različnih sort ter razlike med plodom in oljem iste sorte.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da plodovi različnih sort oljk variirajo v deležu vode, maščobe in maščobno kislinski sestavi. Olja različnih sort imajo različno kislinsko število in vsebnost prostih maščobnih kislin, vendar še vedno v mejah pravilnika za ekstra deviško oljčno olje. Pričakujemo razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin in antioksidativni učinkovitosti med različnimi sortami oljk in njihovimi olji, ter znotraj iste sorte med plodovi in oljem. V olju sorte Belica pričakujemo najvišjo vsebnost skupnih fenolov. Predpostavljamo, da sta dielektrična konstanta in električna prevodnost v oljih različnih sort različna in odvisna od maščobno kislinske sestave.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OLJKARSTVO

Panoga oljkarstvo se je ponovno precej razširila na območju Primorske. Oljkarstvo poleg gospodarskih opravlja tudi temeljne krajinsko-okoljske, socialne in kulturne funkcije. Kar zadeva okoljsko-krajinske funkcije, velja poudariti, da se oljke nahajajo v predelih, kjer je možnost drugačne uporabe zemljišča močno omejena. S tem predstavljajo možnost izrabe težko dostopnih zemljišč, ohranjajo okolje ter obenem poskrbijo za estetsko-vizualno funkcijo. Oljka je poleg estetskega dopolnila krajine, element hidrološkega uvrščanja pobočij, kot tudi ohranitve tal. Oljčniki tako prispevajo k ohranjanju biotske raznolikosti rastlinskih vrst in avtohtonih živalskih vrst. Pomemben je tudi prispevek oljkarstva s svojimi sekundarnimi produkti, ki prispevajo k proizvodnji bioenergije, kompostiranju suhih tropin, vlažne tropine pa služijo kot gnojilo na kmetijskih zemljiščih (Marangon in sod., 2007).

V preteklosti je bila za oljkarstvo značilna razpršena zasaditev kot dopolnilo k bolj dobičkonosnim rastlinam, v današnjem času so pričeli saditi intenzivne nasade z urejenimi vrstami in takimi oblikami gojenja, ki olajšajo obdelovanje (Podbersič, 2004).



Slika 1: Oljčni nasad v Kromberku (foto: Drnovšek J.)

2.1.1 Izvor in razširjenost

Prva oljna drevesa v danes nam znani obliki so uspevala že približno šest do sedem tisoč let pred našim štetjem v zemljepisnem loku med Malo Azijo, Bližnjim vzhodom in severovzhodnim delom Afrike (Vesel in sod., 2009).

V Goriškem prostoru sta se oljka in oljno olje pojavila že v rimskih časih. O tem pričajo najdene številne rimske amfore iz različnih arheoloških najdišč: Bilje, Ajdovščina, Loke in Neblo v Brdih. Iz rimskega pristanišča Oglej je proti vzhodu vodila pomembna trgovska pot, po kateri je potovalo tudi oljno olje. Prvi zapisi o oljkah v Brdih se omenjajo v poznosrednjeveških notarskih zapisih v Čedadu in Vidmu (Podbersič, 2004). Od takrat dalje lahko zasledimo številne zapise o oljkah, dajatvah z oljčnim oljem, o oljarnah itd. V začetku prejšnjega stoletja so za oljke in kmete prišli težki časi. OO ni prinašalo dovolj zaslužka za preživetje in nasadi so se pričeli krčiti. Oljčnike je delno uničila prva svetovna vojna, saj so številne bitke na tem ozemlju uničile nasade. Dokončno uničenje oljke je prinesla huda pozeba leta 1929 s temperaturami do $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki so trajale skoraj dva meseca. Po premoru skoraj 50 let je kultura sajenja oljk spet zaživela leta 1978 v Gradnem v Goriških Brdih in oljke so hitro dosegle ponovni razcvet. V Sloveniji do danes lahko zabeležimo 1968 ha oljčnikov, katerih 3,5 % zavzema Goriška, medtem ko ostalih 96,5 % predstavlja Slovenska Istra (Oljno olje, 2015).

2.1.2 Vpliv ekoloških dejavnikov na kakovost oljk in oljnega olja

Ugodne klimatske razmere, predvsem mile zime in topla poletja so kot nalašč za gojenje različnih sredozemskih kultur. Hribi na severu Brd nudijo zavetje pred hladnim alpskim zrakom. Lapornata in topla zemlja odlično ustreza oljki, različnim sadnim vrstam in seveda vinski trti. Skupek vseh teh naravnih pogojev priroji značilnosti in odličnost OO, poleg vsega velja omeniti, da so Brda ena izmed najbolj severnih leg, kjer še uspevajo oljke (Parmegiani in Scarbolo, 2007).

2.1.2.1 Temperatura

Oljka najbolje uspeva v zmerno toplem pasu oz. tam, kjer ni prenizkih zimskih temperatur. Rodne veje lahko pozebejo že pri $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, glavne veje in deblo pri $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seveda je odpornost na mraz odvisna predvsem od sorte, starosti in prehranjenosti rastline (Sancin, 1990). Na nizke temperature so najbolj občutljivi listi, brsti in plodovi, ki v primeru dolgotrajnejšega mraza utrpijo poškodbe. Tudi če nadzemni del v celoti pomrzne, lahko ostane koreninski sistem nepoškodovan. Vesel in sod. (2009) navajajo, če poškodbe niso prevelike, lahko iz teh štorov poženejo novi poganjki. Oljka dobro prenaša visoke poletne temperature, tudi 40 do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najbolj občutljiva je v času vegetacije, takrat so za rastlino lahko usodne že temperature od $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.2.2 Svetloba

Oljka je heliofilna rastlina, kar pomeni, da potrebuje veliko svetlobe za dobro rast in plodnost, zato moramo biti pozorni na lego, gojitveno obliko in sadilne razdalje (Vrhovnik in Prgommet, 2011). Vesel in sod. (2009) navajajo, da z dobro izpostavljenostjo oljke sončni svetlobi dosežemo višjo kakovost OO in hkrati tudi večji pridelek. Takšne oljke imajo več plodov, ki so večji ter z višjo vsebnostjo olja.

2.1.2.3 Voda

Oljka je prilagojena na podnebje z malo padavinami in sušnimi poletji. Uspeva tudi na območjih, kjer pade manj kot 300 milimetrov padavin letno. Faze, v katerih oljka najbolj potrebuje vodo so: spomladi pred in po cvetenju do tvorbe koščic in pred zorenjem v jeseni. Zastoji vode v tleh oljki ne ustrezajo, saj je zelo občutljiva na pomanjkanje zraka v tleh. Kjer je slaba odvodnja, oljke zelo slabo rodijo, drevesa celo hirajo. Visoka relativna zračna vlaga ni zaželena, ker pospešuje razvoj bolezni v oljčniku (Vesel in sod., 2009).

2.1.2.4 Veter

Zračne lege z blagimi vetrovi so najprimernejše, ker je tak oljčnik manj izpostavljen težavam z raznimi boleznimi, v času cvetenja veter omogoča dobro oploditev, saj je oljka vetrocvetka. Lege z močnimi vetrovi niso primerne, ker ti preoblikujejo krošnje in posledično gojitveno obliko, lahko tudi lomijo veje ter izsušujejo cvetove (Vesel in sod., 2009).

2.1.2.5 Tla

Oljka je glede tal prilagodljiva in uspeva tudi v zelo kamnitih tleh. Najbolje uspeva v zračnih, rahlih in nevtralnih do slabo alkalnih tleh. Pomembno vlogo ima apneno vezivo oz. kalcijev karbonat, ki pomembno vpliva na odpornost oljke proti nizkim temperaturam in tudi na kakovost olja (Vesel in sod., 2009). Kalcij je nujen za trdnost mesa in zdrav plod, s tem pa tudi za olje najvišje kakovosti (Bratović in sod., 2012).

2.1.3 Vpliv sorte na kakovost oljk in oljčnega olja

Po svetu se razprostira velik sortni izbor oljk. Za glavne proizvajalke so značilne naslednje sorte: v Španiji prevladujejo Arbequina, Picual, Hojiblanca, v Italiji Frantoio, Leccino, Maurino in Pendolino, ter v Kaliforniji Mission, Manzanillo, Sevillano in Ascolano. Značilne sorte, ki na območju Goriških Brd najbolj uspevajo so Črnica, Drobница, Belica in Gorgazzo.

Vse karakteristike sortnega izbora oljk na območju Brd in vzhodnega gričevja Furlanije Julijske krajine so Pandolfi in sodelavci (2007) opisali v zaključnem poročilu

meddržavnega projekta, od koder smo tudi sami uporabili podatke, razen za sorto Leccino, kjer smo podatke povzeli po Vesel in sod. (2009).

2.1.3.1 Belica

Plodovi so jajčaste oblike, srednje debeli s povprečno težo od 2 do 3 grame. Ob obiranju so običajno svetlo zelene do rumenkasto zelene barve, ki pozneje prehaja do temno rdečkaste barve. Obdobje največje oljevitosti nastopi pozno, v prvi polovici novembra, in ima srednji donos olja, 18,9 % na svežo snov. Sorta je odporna na nizke temperature, ima povečano občutljivost na bolezni, še posebej na oljčno muho in pavje oko. Pavje oko je bolezen, kjer so napadeni predvsem listi, lahko pa se razširi tudi na peclje in plodove. V oljčniku se posledice močne okužbe kažejo v obliki manjšega pridelka v naslednjih letih. Belico označuje dobra rodnost, uravnotežena vsebnost višjih maščobnih kislin (VMK), vedno visoka vsebnost skupnih fenolov (FS). Panel je s senzoričnim ocenjevanjem olje označil z visoko stopnjo sadežnosti, z vonjem po zeleni travi, grenkim in pikantnim pookusom.

2.1.3.2 Buga

Plodovi so okrogle oblike, srednje debeli s povprečno težo od 2 do 3 grame. Plodovi zorijo proti koncu oktobra in se v polni zrelosti obarvajo v temno modro-vijolično barvo. Občutljivost na zimske pozebe je srednja, zato zahteva previdnost pri gnojenju z gnojili na osnovi dušika. Označuje jo srednja občutljivost na oljčno muho in pavje oko. Za Bugo velja dobra rodnost z nizko donosnostjo olja, 10-12,5 % na svežo snov, uravnotežena vsebnost VMK, zmerna vsebnost FS, ki med dozorevanjem upada. Panel je olje ocenil za boljše v zgodnejšem obdobju obiranja, s srednjo sadežnostjo in precej grenkim in rahlo pikantnim priokusom.

2.1.3.3 Črnica

Plodovi so jajčaste oblike, srednje debeli s težo okoli 2 grama. V obdobju zrelosti, ki pri Črnici nastopi zgodaj, postanejo plodovi temne, skoraj črne barve. Sorta ima značilno srednjo rodnost in srednji donos olja, 18 %. Je dobro odporna na nizke temperature in na bolezen oljk. Delež VMK se z dozorevanjem izboljšuje, obratno se dogaja z deležem FS. Strokovnjaki so na podlagi opazovanih kvalitativnih značilnosti ocenili, da Črnica proizvaja olje visoke kakovosti le v prvem obdobju obiranja. Olje označuje srednja sadežnost ob prevladi grenkega okusa in odločnega priokusa po zrelem sadju.

2.1.3.4 Drobica

Plodovi so jajčaste oblike, srednje debelosti s težo od 1,5 do 2 grama. Dozorevanje nastopi sorazmerno zgodaj, plodovi se obarvajo od zelenkaste do temno vijoličaste barve. Občutljivost na zimsko zmrzal in oljčno muho je srednje nizka. Sorta je srednje bujna, z visokim donosom olja, 20,8 % na svežo snov. Vsebnost VMK je optimalna, vsebnost FS se

z dozorevanjem zmanjšuje, vendar se ohrani na visoki stopnji. Senzorična ocena označuje olje s srednjo močno stopnjo sadežnosti, izrazitim okusom po dišavnicah in priokusom po zrelem sadju.

2.1.3.5 Leccino

Plodovi so jajčaste oblike, srednje debeli s težo od 2 do 4 grame. Zoriijo proti koncu oktobra, plodovi se obarvajo od temno vijoličaste do črne barve. Sorta je odporna proti nizkim temperaturam in velja za eno najrodovitnejših sort. Donosnost olja je srednja, okoli 18 % na svežo snov. Olje vsebuje manj FS kot Belica, vendar je s senzoričnega vidika običajno bolj sladko in harmonično.



Slika 2: Oljke avtohtone sorte Briška Drobna in Črnica (foto: Drnovšček J.)



Slika 3: Oljke sorte Belica, Buga in Leccino (foto: Drnovšček J.)

2.1.4 Oljčno olje – zakonske osnove

Oljčno olje ima med vsemi jedilnimi olji posebno mesto zaradi načina pridobivanja in načina uživanja. Zaradi višje prodajne cene, se ga pogosto ponareja, tako da EDOO dodajajo cenejša olja. Prav zato so tržni normativi za OO v primerjavi z ostalimi olji zelo strogi in tudi strokovno preverjanje skladnosti je zelo zahtevno.

Kot opisuje Pravilnik o oljčnem olju (1999), kakovost deviških oljčnih olj (DOO) določajo senzorične in kemijske značilnosti in se deli v tri kakovostne razrede:

- ekstra deviško oljčno olje,
- deviško oljčno olje,
- lampante oljčno olje, ki ni primerno za prehrano.

V preglednici 1 so navedene mejne vrednosti za nekatere parametre kakovosti za posamezno kategorijo oljčnega olja. Velja poudariti, da oljčno olje za uvrstitev v kategorijo Ekstra deviško oljčno olje ne sme imeti senzoričnih napak.

Preglednica 1: Meje vrednosti za kategorizacijo deviškega oljčnega olja (Bešter in sod., 2014)

		MEJNE VREDNOSTI		
		Kategorija oljčnega olja		
		Ekstra deviško	Deviško	Lampante
Kemijski parametri	Kislost kot % oleinske k.	$\leq 0,8$	$\leq 2,0$	$\square 2$
	Peroksidno število (mmol O_2 /kg olja)	≤ 10	≤ 10	-
	K_{232}^*	$\leq 2,5$	$\leq 2,60$	-
	K_{268}^{**} ali K_{270}^{**}	$\leq 0,22$	$\leq 0,25$	-
	ΔK	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	-
	Etilni estri MK EEMK (mg/kg)	$EEMK \leq 40$	-	-
Senzorično ocenjevanje	Mediana napak Mn	$Mn = 0$	$Mn \leq 3,5$	$Mn \square 3,5$
	Mediana sadežnosti Ms	$Ms \square 0$	$Mn \square 3,5$	-

*- UV absorbanca pri valovni dolžini 232 nm.

** - UV absorbanca pri valovni dolžini 268 nm ali 270 nm; ugotavljamo ali je olje staro in ali mu je bilo primešano neoljčno olje.

2.2 SESTAVA OLJK IN OLJA

2.2.1 Sestava in kakovost oljk

Plodovi oljke so lahko zelo različnih dimenzij, razlikujejo se po vsebnosti olja, po konsistenci mesa in kemijski sestavi ter po različnem razmerju med mesom in koščico (Vesel, 2012). Plod oljke se po končani fazi cvetenja razvije v štirih tednih. Med rastjo ploda v celicah mesnatega dela pridobivajo velikost vakuole na račun akumulacije olja.

Najintenzivnejša sinteza olja je od 60 do 120 dni po polnem cvetenju, pri nas je ta čas nekje od konca julija do konca septembra. Razmere v tem obdobju zelo pomembno vplivajo na razvoj plodov in akumulacijo olja (Vesel, 2012). Za začetek dozorevanja smatramo čas, ko začne padati vsebnost klorofila v plodovih, kmalu zatem se začne kopičenje antocianov in temnejše barvanje plodov, odvisno od sorte (Vesel in Markočič, 2012). V polni zrelosti zavzema meso 60-90 % plodu, koščica 10-40 %, seme pa 1-2 %. V preglednici 2 je podana kemijska sestava plodu oljke.

Preglednica 2: Kemijska sestava oljčnega ploda (Merljak in Jakob Merljak, 2014)

Hranilne snovi	Količina % ali mg/100 g	Hranilne snovi	Količina % ali mg/100 g
voda	54-84 %	beljakovine	1-2 %
skupne maščobe	10-40 %	ogljikovi hidrati	2,6 %
vlaknina	1,4 %	provitamin A	0,03-0,18 mg
vitamin E	13 mg	vitamini skupine B	sledovi
vitamin D	sledovi	kalij	800-1000 mg
natrij	30-90 mg	kalcij	80-90 mg
magnezij	2 mg	železo	1,6-1,8 mg
fosfor	9-21 mg	fluor	0,3 mg

Z dozorevanjem plodu se triacilgliceroli z lipazo razgrajujejo v diacilglicerole, monoacilglicerole in proste maščobne kisline. Na hitrost razgrajevanja vplivajo predvsem povišana temperatura, poškodovana celična sestava plodov in voda v fazi predelave. Z določitvijo vsebnosti prostih maščobnih kislin lahko preverimo kakovost OO. Podatek o vsebnosti prostih maščobnih kislin pokaže kakovost oljk pred stiskanjem - zrelost plodov in kakovost skladiščenja plodov do predelave (Bučar-Miklavčič in sod., 1997).

Poznavanje kemijskih, fizioloških in morfoloških procesov v oljki med dozorevanjem nam lahko pomaga pri racionalizaciji uporabe agrotehnike in pri izboljšanju kakovosti OO (Vesel, 2012).

2.2.2 Sestava in kakovost oljčnega olja

V spodnji preglednici je podana kemijska sestava hladno stiskanega EDOO.

Preglednica 3: Kemijska sestava oljčnega olja (Merljak in Jakob Merljak, 2014)

Sestavine oljčnega olja	Podrobna sestava	Količina % ali mg/100 g
Maščobne kisline		
nasičene MK	miristinska	do 14,66 g/100 oz. 7-12 %
	palmitinska	
	stearinska	
	arašidna	
enkrat nenasičena MK	oleinska omega 9	70-84 %
večkrat nenasičene MK	alfalinolenska omega 3	0,5-1 %
	linolna omega 6	4-12 %
Druge nemaščobne snovi v maščobi oljčnega olja topne snovi		
vitamini	vitamin A	157 µg/100 g
	vitamin E	12,07 mg/100 g
terpenski ogljikovodik	skvalen	0,7 %
karotenoidi	betakaroten	sledovi
	likopen	sledovi
steroli	beta-sitosterol	0,2 %
	delta-5-avenasterol	
	kampesterol	
V vodi topne snovi v oljčnem olju		
biofenoli	sekoiridoidi (oleuropein, ligstrozid)	manjše količine v sledovih
	lignani (pinorezinol)	
	flavoni (luteolin, apigenin)	
Aromatske snovi, ki dajejo aromo		sledovi

V EDOO predstavljajo maščobe oz. triacilgliceroli 98 % skupne sestave olja. V preglednici 3 lahko vidimo glavne predstavnice in posamezne deleže maščobnih kislin (MK).

Preostala 2 % EDOO sestavljajo nemaščobne snovi, ki izjemno vplivajo na kakovostno razvrščanje olja in ugotavljanje izvora. Te sestavine dajejo olju aromo, preprečujejo staranje olja in imajo pomembno vlogo pri bioloških funkcijah v človeškem organizmu. Vse snovi, ki nastanejo v plodu oljke z biosintetskimi reakcijami in se v različnih oblikah prenesejo v OO, so odvisne od veliko dejavnikov: klime, padavin, prsti, zrelosti plodov, sorte in niso enako zastopane (Vesel in sod., 2009). Antioksidanti v OO igrajo pomembno vlogo, saj med drugim olje varujejo pred kvarom. Antioksidante OO tvorita dve skupini, biofenoli in tokoferoli. Biofenoli pomembno vplivajo na svežino olja. Taka olja so senzorično bogata, dokler se sekoiridoidi, glavni predstavniki biofenolov, ne pretvorijo do končnih oblik tirosola in hidroksitirosola (Vesel, 2012). Slokar (2010) opisuje podrobnejše reakcije fenolov v OO. Glavni predstavnik tokoferolov je alfa-tokoferol - vitamin E. OO vsebuje 0,5 do 20 mg skupnih tokoferolov na 100 g. Od tega 95 % predstavlja vitamin E, medtem ko ostalih 5 % predstavljata β- in γ-tokoferol. Precej višje vsebnosti tokoferolov

vsebujejo OO, ki so iztisnjena iz plodov v zgodnejših fazah zrelosti. Tokoferoli v OO variirajo glede na sorto, klimatske pogoje med zorenjem plodov, glede na način obiranja in skladiščenja plodov pred stiskanjem.

Pozitiven vpliv OO na zdravje lahko pripišemo tudi uravnoveženi maščobno kislinski sestavi. Vsebuje malo nasičenih MK, veliko oleinske kisline ter majhno, a zadostno količino esencialnih MK z več dvojnimi vezmi (Bešter, 2007). Nasičene MK niso zaželeni, ker pospešujejo nastajanje in razvijanje civilizacijskih bolezni. Enkrat nenasičene MK so zelo stabilne in v priporočenih količinah celo zmanjšujejo bolezni srca in ožilja. Vsebnost oleinske kisline je zelo odvisna od zemljepisne širine, tako je znano, da je v severnejših oljih več oleinske kisline, zato so tudi stabilnejša. Večkrat nenasičene MK so potrebne za normalen razvoj človeka in nemoteno delovanje organizma (Bučar-Miklavčič, 1997).

2.2.1 Analiza kakovosti oljk in oljčnega olja

Senzorično ocenjevanje oljčnih olj poteka po predpisanih metodah. V Sloveniji imamo v Izoli mednarodno priznan panel za senzorično ocenjevanje oljčnega olja, medtem ko za ocenjevanje vloženih oljk še ne. Organoleptično ocenjevanje poteka v ustrezno opremljenem prostoru, kjer sodeluje osem do dvanajst poskuševalcev. Ocenjevanje olj poteka v predpisanih temno modrih kozarcih, ki se jih pokrije z urnimi stekelci in se servira pri temperaturi okrog 25 °C. Pri tem je potreben kozarec vode za nevtralizacijo okusa in ocenjevalni list. S senzorično analizo ugotavljamo pozitivne in negativne značilnosti OO. Skupna senzorična ocena pripomore k uvrstitvi olja v določeno kategorijo. Na OO in oljках se opravlja tudi številne kemijske analize, kot so kislost, peroksidno število, določanje etilnih estrov maščobnih kislin, s katerimi ugotavljamo nepravne mešanice EDOO z olji slabše kakovosti ter spektrofotometrijsko preiskavo v ultravijoličnem valovanju, za ugotavljanje potvorb. Z raznimi instrumentalnimi analizami lahko plodovom in OO določimo vsebnost vode, vsebnost maščobe oz. oljevitost, maščobno kislinsko sestavo, sterolno sestavo, fenolno sestavo, antioksidativni potencial, stopnjo pigmentacije, trdoto plodov. Veliko strokovnjakov pri analizi OO opravi tudi morfološko analizo za učinkovitejšo sledenje sort.

2.2.1.1 Analiza kakovosti plodov

Pogoj za zdrav in kakovosten pridelek oljk sta dobra kondicija in dobro zdravstveno stanje rastline in ugodni klimatski pogoji. Tako stanje lahko dosežemo z dobro načrtovanim delom in terminsko izvedenimi ukrepi v oljčniku. Bistvo so preventivni ukrepi, ki rastlini omogočajo, da se sama upre neživim in živim dejavnikom (Vesel in sod., 2009).

Kakovost plodov lahko nadziramo že v samem oljčniku. Ekološko kmetijstvo zahteva svoje kriterije, ki jih je potrebno upoštevati za pridobitev certifikata. Uporaba organskih gnojil, prepoved uporabe herbicidov, mehanska obdelava pod drevesi, tretiranje s fitofarmaceutskimi sredstvi, ki so dovoljena v ekološki pridelavi. Pojav oljčne muhe in drugih škodljivih organizmov spremljamo s feromonskimi vabami.

V času zorenja plodov je priporočljiv stalen nadzor zdravstvenega stanja. Že na pogled lahko ocenimo ali je plod zdrav ali je napaden z oljčno muho ali s črvivostjo. Ti pojavi so v naših krajih najpogostejši. Priporočljivo je, da plod kljub zdravemu zunanemu videzu lastnoročno odpremo in pregledamo stanje mesa. Oljkarji za optimalen čas obiranja določijo čas, ko je pretežen delež plodov oljke spremenilo barvo in ob stisku plodu med dvema prstoma, se koščica lepo in samostojno loči od mesa, njihovo meso je kašasto in pušča oljno sled na prstih. Avtorji Lopez-Villalta in sod. (1996) opisujejo naslednje metode za določanje najprimernejšega časa obiranja: na podlagi zunanje obarvanosti plodov, z določanjem indeksa zrelosti, na podlagi razmerja med težo olja in suho snovjo ter na podlagi teže olja na določeno število plodov. Največ oljkarjev za najkvalitetnejši pridelek olja še vedno zagovarja ročno obiranje plodov s plastičnimi grabljami. S tem preprečimo poškodbe plodov, lomljenje vej in poškodbe drevesa. Takšen način si lahko privoščimo zaradi obdelovalnih površin, ki niso prevelike. V Španiji, ki velja za največjo evropsko proizvajalko olja in so njihove površine oljčnikov precej večje, si ročnega obiranja zaradi dolgotrajnejšega postopka skoraj da ne morejo privoščiti, zato se poslužujejo strojnega obiranja. Za doseganje najboljše kakovosti olja je dobro oljke čim prej oz. na isti dan kot jih obiramo, tudi predelati. S tem preprečimo morebitne oksidacijske procese plodov in posledično pregretoost OO. V oljarnah posebnih hitrih testov za takojšnjo analizo običajno ne opravljajo. Na željo pridelovalcev lahko vzorce olja pošljejo v specializiran laboratorij za analize OO. Ob samem prevzemu oljk pregledajo njihovo splošno stanje in opravijo nestrokovno senzorično oceno olja, s katero hitro ocenijo kakovost. V primeru napak olja, se to hitro zazna na vonju in okusu.

2.2.1.2 Analiza kakovosti oljčnega olja

V OO lahko opravimo analize različnih sestavin z različnimi metodami. Najpogosteje uporabljene so naslednje analize.

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) lahko določimo vsoto skupnih biofenolnih spojin ter njihovih posameznih relativnih deležev, količino trigliceridov, digliceridov in monogliceridov ter tudi vsebnost tokoferolov in organskih kislin (Burcu in sod., 2014). HPLC je ena najzmogljivejših analitskih tehnik s širokim spektrom uporabe, ki s pomočjo avtomatizacije postopkov doseže zelo natančno kvantifikacijo posameznih spojin v olju.

S plinsko kromatografijo (GC) lahko okarakteriziramo aromatične komponente, določimo etilne estre maščobnih kislin, določimo skupne sterole, maščobno kislinsko sestavo olja ter hlapne komponente. GC omogoča separacijo preko visokozmogljivih kapilarnih kolon in pokriva širok spekter analiziranja hlapnih komponent. Spada med hitre metode z avtomatskim vzorčevalnikom.

S spektrofotometrijo lahko določimo barvo olja in nekatere kemijske lastnosti olja. Tako lahko spektrofotometrično določimo vsebnost klorofila in karotenoidov. Določevanje specifične absorpcije pri 232 nm (K_{232}) in 270 nm (K_{270}) je enostavna in hitra metoda za oceno oksidiraniosti OO. Tako lahko ugotovljamo, ali je olje staro in ali mu je bilo primešano neoljčno olje. K_{232} je merilo za količino primarnih oksidacijskih produktov –

hidroperoksidov, saj pri 232 nm absorbirajo konjugirani dieni, ki v olju nastajajo hkrati s hidroperoksidi. Konjugirani trieni, ki nastajajo pri oksidaciji linolenske kisline imajo absorpcijski maksimum pri K_{270} . Absorpcijo pri 270 nm povečujejo sekundarni produkti oksidacije – aldehidi, ketoni in alkoholi. Poleg tega spektrofotometrično določamo tudi antioksidativno učinkovitost vzorca z metodo 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH $\cdot$), metodo redukcije železovega iona in drugimi.

S titracijskimi metodami določamo kemijske parametre olja, kot so delež prostih maščobnih kislin, peroksidno in jodovo število. Proste maščobne kisline so tiste maščobne kisline, ki imajo prosto -COOH skupino in niso zaestrene. Peroksidno število je merilo prisotnosti hidroperoksidov, primarnih oksidacijskih produktov v olju in jodovo število je merilo nenasičenosti olja in je odvisno od količine dvojnih vezi v olju.

V zadnjem času se raziskuje možnost uporabe električnih in dielektričnih lastnosti olja za hitro analizo kakovosti olja.

2.3 DIELEKTRIČNA KONSTANTA IN FAKTOR IZGUB

Dielektrična spektroskopija, kot preprosta in hitra merilna tehnika podaja informacije o dielektrični odzivnosti snovi na električno polje. Velikost dielektrične konstante je odvisna od sposobnosti snovi, da shrani električno energijo, faktor dielektričnih izgub pa od sposobnosti snovi, da odda električno energijo (Prevc, 2010). Takšen način se priporoča tudi za ocenjevanje kakovosti hrane, zlasti za odkrivanje vode v živilih.

Dielektrične lastnosti snovi lahko opišemo z električno permitivnostjo, ki je kompleksna količina in odraža refleksijo elektromagnetnega delovanja (Sosa-Morales in sod., 2010). Relativna permitivnost je definirana kot razmerje električne permitivnosti materiala in električne permitivnosti vakuumu:

$$\epsilon^* = \frac{\epsilon}{\epsilon_0} \quad \dots(1)$$

ϵ^* - relativna permitivnost materiala

ϵ – permitivnost materiala

ϵ_0 - permitivnost vakuumu ($\epsilon_0 = 8,8542 \times 10^{-12} \text{ F} \times \text{m}^{-1}$)

Relativna permitivnost ϵ^* je sestavljena iz dveh različnih lastnosti, iz realnega in imaginarnega člena:

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon'' \quad \dots(2)$$

ϵ' - realni del relativne permitivnosti ali dielektrična konstanta

ϵ'' - imaginarni del ali relativni faktor dielektričnih izgub

j – oznaka za imaginarni del kompleksne količine

Več o povezavi med ϵ' in ϵ'' je opisala Prevc (2010).

Na dielektrične lastnosti vplivajo frekvenca, temperatura, vlaga in sestava olj ter nekaterih MK, kar so v svojih raziskavah dokazali Lizhi in sod. (2008). Območje v katerem so merili dielektrično konstanto in faktor izgub je bilo med 100 Hz in 1 MHz. Ugotovili so, da ima območje frekvence majhen vpliv na dielektrično konstanto, medtem ko ima na faktor dielektričnih izgub frekvenca velik vpliv. Zaradi večje viskoznosti olj pri nižji temperaturi se dielektrična konstanta z naraščajočo temperaturo znižuje. Dokazali so, da na vrednost dielektrične konstante bistveno vpliva sestava MK, kjer imajo nenasičene MK večji pozitiven vpliv. Velik vpliv na dielektrično konstanto ima tudi vsebnost vlage, saj se je leta večala z višanjem deleža vlage v živilu. Rezultati pridobljeni v teh raziskavah so lahko koristni za identifikacijo olja, ocenjevanje in spremljanje kakovosti med predelavo ter skladiščenjem olja (Lizhi in sod., 2008). Datta in sod. (2005) so ugotovili, da se lahko z merjenjem dielektrične konstante ugotavlja tudi potvorjenost olj in zmanjševanje kakovosti olj med cvrtjem (Lizhi in sod., 2010).

Lizhi in sod. (2008) so dokazali, da na vrednosti ϵ' vpliva tudi vsebnost vlage v olju. Polarne molekule vode imajo boljšo orientacijo in polarizacijo v električnem polju v primerjavi z oljem, zato dosežejo višje vrednosti. Na vrednosti ϵ' vplivajo že majhne vsebnosti vode in so pri nižjih frekvencah precej večje, z večanjem frekvence se ϵ' hitro zniža.

Corach in sod. (2014) so tudi preučevali vpliv različnih rastlinskih olj na dielektrične lastnosti v frekvenčnem območju med 20 Hz in 2 MHz pri različnih temperaturah. Tudi ti avtorji so pri vseh vzorcih ugotovili, da se dielektrična konstanta linearno zmanjšuje z naraščajočo temperaturo v odvisnosti od sestave olja. Rezultati, ki so jih prinesle raziskave, so uporabni za karakterizacijo olj in za spreminjanje kakovosti med transportom in skladiščenjem. Merjenje dielektrične konstante avtorji svetujejo tudi za spremljanje transesterifikacije triacilglicerolov v metilne estre maščobnih kislin pri sintezi biodizela.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorčenje

Pri analizah smo uporabili plodove in olja petih različnih sort oljke: Bugo, Belico, Leccino, Črnico in Drobnico. Slednji dve sta avtohtoni briški sorti. Plodove smo obirali v oktobru in novembru 2013 v času njihove optimalne zrelosti. Štiri vzorce smo obirali na naši kmetiji Drnovšček v oljčniku na Goriškem, v Kromberku, ti vzorci so ekološke pridelave. Vzorec Drobnice smo obirali v Goriških Brdih, v Gradnem. Vsi vzorci so bili še isti dan predelani, in sicer v Oljarni na Dobrovem ter v Oljarni v Šempetru pri Gorici. Vzorce oljk smo po obiranju zamrznili na -20 °C in jih tako hranili do analize. Oljčno olje smo posebej shranili v temnih steklenicah.

3.1.2 Reagenti, pribor in aparature

Pri analizah smo uporabili naslednje reagente in topila:

- natrijev hidroksid (Merck, 1.09959),
- dietil eter (Sigma-Aldrich, 32203),
- fenoltalein (Carlo Erba, 451154),
- ledena očetna kislina (Sigma-Aldrich, 33209),
- kloroform (Sigma-Aldrich, 32211),
- kalijev jodid (Merck, 1.05043),
- škrob (Kemika, 18806),
- natrijev tiosulfat (Fluke, Sigma-Aldrich, 35245),
- interni standard C:17 (Sigma-Aldrich, H3500),
- borov trifluorid v metanolu (Sigma-Aldrich, 61626),
- natrijev klorid (Merc, 1.06404),
- petrol eter (Sigma-Aldrich, 77399),
- klorovodikova kislina (Sigma-Aldrich, 30721),
- etanol 96 % (Merck, 1.00971.1000),
- Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, 47641),
- natrijev karbonat (Merck, 1.06392),
- DPPH• (Sigma-Aldrich, D9132),
- metanol 100 % (Merck, 1.06009),
- trolox (Sigma-Aldrich, 238813).

Uporabili smo naslednji drobn laboratorijski pribor:

- stekleni lončki s pokrovčki,

- Erlenmeyerjeva buča različnih volumnov,
- bireta,
- analitska tehtnica (Mettler Toledo AT201 in Mettler Toledo MonoBloc PB303-S),
- graduirana pipeta (Ependorf in Transferpette),
- steklene prozorne vialne,
- temne vialne 1,5 µL,
- terilnica,
- razklopni lončki,
- celulozne kapice,
- ekstrakcijski lončki + vata + vrelne kroglice,
- plastične centrifugirke (TPP, 91015),
- kivete,
- laboratorijska injekcija,
- staničevina,
- magnetno mešalo (IKA® RH basic KT/c).

Uporabili smo naslednje laboratorijske instrumente:

- sušilnik (Memmert),
- vodna kopel (Bandelin, Sonorex TK52),
- eksikator,
- Vortex stresalnik (Vortex genie 2),
- Centrifuga (Tehtnica centric 200 in Rotanta 460R, Hettich),
- plinski kromatograf (Agilent Technologies 6890N),
- Soxcap aparatura (SoxcapTM 2047 FOSS),
- Soxtec aparatura (SoxtecTM 2050 FOSS),
- vakuumška črpalka za rotavapor (Buchi Vac® V-500),
- mešalnik (IKA® REO basic C),
- ultraturaks (IKA-Labortechnik, Ultra-turrax T25),
- speedvac (Genevac Technologies HT-4, Series II),
- liofilizator (Alpha 1-2 LD plus),
- hladilnik z zamrzovalnikom (Gorenje),
- ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52),
- vrtničnik (IKA® MS3 basic),
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453),
- sistem LCR meter (Agilent E4980A s celico 16452A),
- termostatska kopel (Fluke 7230-25),
- platinasti termometer (Fluke 1502A),
- digitalni termometer (Fluke 5627-6-D).

3.2 METODE DELA

3.2.1 Kemijske analize oljk in olja

3.2.1.1 Delež vode v oljках

Steklene lončke smo skupaj s pokrovčki posušili v sušilniku na 130 °C za 1 uro in ohlajene stehali (m_1). Vanje smo stehali približno 10 g razkoščičenih in na koščke razrezanih oljk (m_2), ter jih sušili na 105 °C za 2 uri. Po sušenju smo vzorce pokrili s steklenimi pokrovčki in jih dali v eksikator ohlajat za pol ure, ter stehali (m_3). Vsak vzorec smo analizirali v dveh paralelkah.

Masni delež vode, w_{H_2O} , smo izračunali po naslednji formuli:

$$w_{H_2O} = ((m_1 + m_2) - m_3) / m_2 \times 100 \% \quad \dots(3)$$

m_1 – masa lončka in pokrovčka

m_2 – masa vzorca pred sušenjem

m_3 – masa vzorca v lončku s pokrovčkom po sušenju

3.2.1.2 Vsebnost maščob v oljках

Oljke smo najprej razkoščičili in jih v terilnici s pomočjo tekočega dušika strli v homogeno zmes. Približno 5 g vzorca smo na petrijevki sušili 18 ur na 65 °C ter vzorce ohladili v eksikatorju. Metoda za določanje celokupnih maščob je sestavljena iz dveh delov. Pri prvem delu v aparaturi potekajo trije koraki: hidroliza, filtracija in izpiranje vzorca, ki se izvajajo brez prenosa vzorca in z minimalnim ročnim delom. V celulozne filtre smo stehali 1 g vzorca (m_3) in le-te postavili v razklopne lončke. V razklopno posodo smo nalili 4 M klorovodikovo kislino (HCl) ter vanjo položili lončke z vzorci (m_2). Vzorce smo vrel 1 uro. Z vakuumom smo odstranili hidrolizno raztopino ter spiranje večkrat ponovili. Razklopne lončke smo čez noč pustili v sušilniku na 60 °C (m_1). S hidrolizo maščob pretvorimo maščobe v maščobne kisline, ki so kasneje v taki obliki lažje dostopne za ekstrakcijo, ki sledi v drugem delu. Steklene ekstrakcijske lončke smo skupaj z vrelnimi kroglicami sušili 2 uri na 105 °C, jih ohladili, stehali (m_5), pokrili z vato in jih z magnetki pritrdili na ekstrakcijsko enoto Soxtec. Hidrolizirane maščobe smo ekstrahirali z 80 mL petrol etra 90 minut. Soxtec uporablja ekstrakcijo v 4-ih korakih: vretje, izpiranje, zbiranje topila in sušenje topila. Po končani ekstrakciji smo vzorce sušili 3 ure na 105 °C, jih ohladili v eksikatorju, stehali (m_4) ter izračunali vsebnost maščob v oljках, $w_{maščob}$:

$$w_{maščob} = ((m_1 - m_2) / m_3) \times (m_4 / m_5) \times 100 \% \quad \dots(4)$$

m_1 – masa ekstrakcijskega lončka po hidrolizi v Soxcapu

m_2 – masa ekstrakcijskega lončka pred hidrolizo v Soxcapu

m_3 – masa vzorca oljk

m_4 – masa vzorca po uporabi in sušenju v Soxtecu

m_5 – masa vzorca pred pričetkom ekstrakcije s Soxtecom



Slika 4: Aparatura Soxcap (levo) in aparatura Soxtec (desno) (foto: Drnovšek J.)

3.2.1.3 Postopek predelave oljčnega olja

Postopek predelave oljk v OO v oljarni oz. torklji na Dobrovem v Goriških Brdih poteka na spodaj opisani način. Večina analiziranih vzorcev je bila tam iztisnjenih, z izjemo Črnice, ki je v manjših količinah in smo jo zato predelali v manjši torklji v Šempetru pri Novi Gorici. Oljkarji se z oljarno najprej dogovorijo glede časa prevzema, da je le-ta čim krajši in organiziran. Oljarji oljke prevzamejo in jih stehtajo. Sledi prva faza, kjer gredo oljke na pranje v vodi. Transporter jih nato vodi v mlin, kjer se oljke zmeljejo in padejo v prvo mešalno posodo. Ko se mletje konča, masa potuje v naslednjo mešalno posodo. Ko je prva posoda izpraznjena, lahko vanjo meljemo že naslednje oljke. Masa se v mešalnih posodah meša približno od 45 do 60 minut, ob stalnem nadzoru temperature, ki ne sme preseči 27 °C. Temperaturo uravnavajo termostati, ki vklapljujejo in izklapljujejo vodne črpalke. Te pošiljajo toplo vodo v dvo-oploščena korita, kjer se zmes zmletih oljk stalno meša. Tam se pri optimalni temperaturi in času začne izločati olje iz celičnih sten. Zmes gre nato v stiskalnico s kontinuiranim delovanjem, kjer se loči trdi del – tropine od olja in vegetacijske vode. Tudi olje priteče iz stiskalnice ločeno od vegetacijske vode. Če želimo olju še bolj povečati čistost, ga še dodatno separiramo s pomočjo separatorjev, ki delujejo na principu specifične mase. Poleg olja uporabijo tudi vegetacijsko vodo. Oljkarji od tu olje v transportnih posodah odpeljejo domov, kjer ga hranijo pri skladiščnih pogojih za OO. Olje je že takoj primerno za uporabo, vendar ga ni priporočljivo takoj stekleničiti zaradi možnosti nastanka usedline. Ta usedlina zmanjšuje življenjsko dobo olja ter povečuje kvarljivost. Olje se po določenem času samo zbistri, odvisno od sorte, letnika, tehnologije predelave. Ta čas običajno traja od 1 do 3 mesecev. Če želimo takoj po predelavi bistro olje, ki je tako tudi najprimernejše za stekleničenje, ga dobimo s postopkom filtracije.

3.2.1.4 Maščobno kislinska sestava plodov in olja

Maščobne kisline (MK) smo določili kot metilne estre maščobnih kislin (MEMK) (modificirana metoda povzeta po Parku in Goinsu, 1994). Pripravili smo raztopino internega standarda (IS) tako, da smo 0,11039 g C17:0 raztopili v 5,2 g topila, ki smo ga pripravili iz metanola (MetOH) in heksana. Skupna masa raztopine je bila 5,31039 g in koncentracija standarda 2,0788 %. Masi 20 mg mase plodov ali enaki masi olja smo pritehtali 100 μ L raztopine IS. Zmesi smo dodali 300 μ L diklorometana in 3 mL sveže pripravljene raztopine natrijevega hidroksida (NaOH) v metanolu (0,5 M). Reakcijsko zmes smo segrevali v vodni kopeli 50 minut na 90 °C, med segrevanjem smo vijale ročno stresali. Po hitrem hlajenju v vodi smo dodali 3 mL 14 % borov trifluorid (BF₃) v metanolu in ponovno segrevali v vodni kopeli za 10 minut na 90 °C. Ohlajeni raztopini smo dodali 3 mL 10 % raztopine natrijevega klorida (NaCl) za povečanje ionske jakosti ter 1,5 mL heksana. Vse skupaj smo močno stresali 1 minuto, zaradi čim boljše ekstrakcije MEMK iz vodne faze v nepolarno heksansko fazo ter zmes centrifugirali pri 1700×g obratih za 5 minut. Heksansko fazo smo odpipetirali v temne vijale in MEMK v vzorcu določili s plinsko kromatografijo. Vsak vzorec smo analizirali v treh paralelkah.



Slika 5: Plinski kromatograf Agilent 6890N (foto: Drnovšek J.)

Opis instrumenta

Za plinsko kromatografijo smo uporabili plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N s pripadajočo opremo, plamensko ionizacijskim detektorjem (FID) in pripadajočim programom za obdelavo podatkov (GC Chem Station). Uporabili smo kolono SUPELCO - SPB PUFA; 30 m × 0,25 mm × 0,2 μ m. Temperatura kolone je bila 210 °C, detektorja 260 °C in injektorja 250 °C. Volumen inicijiranja je bil 1,0 μ L in tlak na injektorju 31,6 psi. Nosilni plin je bil helij s pretokom 1 mL/min. Pretok dušika je bil 45 mL/min, vodika 40 mL/min in zraka 450 mL/min. Plamensko ionizacijski detektor pirolizira organske spojine, odziv detektorja se zapiše kot vrhovi na kromatogramu, integrator izračuna površino vrhov za posamezno maščobno kislino. Vrhove smo identificirali s standardno zmesjo metilnih estrov maščobnih kislin na osnovi internega standarda.

Izračun deleža maščobnih kislin v olju

S pomočjo površine vrhov za posamezne MK na kromatogramu smo izračunali koncentracijo posameznih metilnih estrov maščobnih kislin. Iz podatka o masi raztopine IS in njegove koncentracije smo izračunali maso internega standarda, m_{17} , za vsak vzorec. Koeficient posamezne MK (F_{Ai}) ter internega standarda (F_{Ai17}) smo izračunali kot razmerje molske mase MK in molske mase MEMK. Po spodnji enačbi (5) smo izračunali delež posamezne MK (g/100 g olja). Vsak vzorec smo analizirali v treh paralelkah in rezultate podali kot povprečje.

Delež MK, w_i (g MK/100 g) smo izračunali po enačbi:

$$w_i = (A_i \times F_{Ai} \times m_{17} \times 100) / (A_{17} \times F_{Ai17} \times m_{vz.}) \quad \dots(5)$$

w_i – delež posamezne MK (g MK/100 g olja)

A_i – površina posamezne MK

F_{Ai} – koeficient posamezne MK

m_{17} – masa internega standarda (C17:0) (mg)

A_{17} – površina internega standarda

F_{Ai17} – koeficient internega standarda (= 0,9508)

$m_{vz.}$ – masa vzorca (mg)

3.2.1.5 Proste maščobne kisline

Količino prostih maščobnih kislin (FFA) lahko izrazimo kot odstotek oleinske kisline, ki v utežnih odstotkih pove, koliko je v preizkušanem olju te kisline (modificirana metoda povzeta po ISO 660, 2014).

Postopek

V Erlenmeyerjevo bučo smo stekali 5,0 g olja, prelili s 30 mL nevtralizirane zmesi dietiletra in 96 %-nega etanola (EtOH) ter pretresli. Kot indikator smo uporabili nekaj kapljic fenolftaleina in titrirali z 0,1 M raztopino natrijevega hidroksida, pripravljenega po navodilih proizvajalca do pojava rožnate barve. Za slepi vzorec smo namesto olja stekali vodo, nadaljnji postopek je bil enak.

Odstotek oleinske kisline (ut. %) smo izračunali po naslednji formuli:

$$\% \text{ oleinska kislina} = (((10 \times (V_{\text{NaOH}, vz.} - V_{\text{NaOH}, sl.})) / m_{\text{olja}}) \times 0,282) \quad \dots(6)$$

$V_{\text{NaOH}, vz.}$ - volumen oz. poraba 0,1 M raztopine NaOH za vzorec (mL)

$V_{\text{NaOH}, sl.}$ - volumen oz. poraba 0,1 M NaOH za slepi vzorec (mL)

3.2.1.6 Peroksidno število

Peroksidno število (PŠ) je definirano kot množina O_2 (mmol) v kilogramu maščobe. Metoda je povzeta po AOAC 965.33 (1999).

Postopek

V Erlenmeyerjevo bučo smo stekali 5,0 g olja. Dodali smo 30 mL zmesi ledene očetne kisline in kloroforma ter premešali, da se je lipid raztopil. Dodali smo še 0,2 mL nasičene raztopine kalijevega jodida in ponovno stresali. Razredčili smo z 20 mL vode, dodali indikator raztopino škrobovice in takoj titrirali z 0,01 M raztopino natrijevega tiosulfata do razbarvanja.

Peroksidno število, PŠ, (mmol O₂/kg olja) smo izračunali iz zveze:

$$P\dot{S} = (V_{Na_2S_2O_3} \times c_{Na_2S_2O_3} \times 10^3) / (2 \times m_{olja}) \quad \dots(7)$$

$V_{Na_2S_2O_3}$ - volumen oz. poraba natrijevega tiosulfata (mL)

$c_{Na_2S_2O_3}$ – koncentracija natrijevega tiosulfata (mol/L)

3.2.1.7 Določanje skupnih fenolnih spojin (sFS) v plodovih oljk in olju

Folin-Ciocalteu metoda

Metoda temelji na spektrofotometričnem določanju koncentracije skupnih fenolov z merjenjem absorbance obarvanega kompleksa, ki nastane pri oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju. Postopek določanja sFS v preiskovanih ekstraktih je povzet po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981).

Ekstrakcija FS iz plodov

Razkoščičene plodove oljk (15 g) smo strli v terilnici s pomočjo tekočega dušika. Pasto smo homogenizirali s 180 mL topila etanol:voda (70:30 v/v) z ultraturaxom in filtrirali. Ekstrakcijo fenolnih spojin smo izvedli z vakuumsko črpalko za rotavapor za 15 minut pri 50 W in 60 % polnih obratov. Tekom ekstrakcije smo kontrolirali temperaturo, da ni presegla 25 °C. Stehtano ekstrakcijsko zmes smo razdelili v 3 ali 4 paralelke in topilo odparevali najprej s pomočjo speedvaca pri temperaturi 30-38 °C za 2 uri in nato še liofilizatorja za 48 ur. Stehtan suhi preostanek smo raztopili v 15 mL 96 % etanola.

Ekstrakcija FS iz olja

Iz 1,5 g olja smo fenolne spojine ekstrahirali s 3 mL 80 % metanola (metanol:voda, 80:20, m/m) tako, da smo zmes stresali na vrtničniku 5 minut, nato smo zmes topila in olja centrifugirali 12 minut pri 9000 obratih/minuto. 2 mL metanolnega ekstrakta smo odpipetirali v epice in shranili v hladilniku za nadaljnje analize.

Priprava vzorcev za določanje fenolnih spojin

Po ustrezni razredčitvi smo z mikropipeto prenesli 25 µL razredčenega ekstrakta v dve 1,5 mL centrifugirki in dodali 175 µL metanola. Tako smo imeli dve paralelki z 200 µL metanolne raztopine fenolnih spojin. V vsako paralelko smo dodali 125 µL Folin-Ciocalteu reagenta (FC) (razredčili smo z vodo v razmerju 1:2, v/v), 150 µL 20 % raztopine natrijevega karbonata in še 525 µL bidestilirane vode. Volumen mešanice je znašal 1 mL. Pri oljkah smo reakcijsko zmes centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih/minuto s Tehtnico Centric 200 in izmerili absorbanco po 40 minutah pri valovni dolžini 765 nm. Pri vzorcih

olja smo mešanico centrifugirali 6 minut pri 13000 obratih/minuto in po 34 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm.

Poleg vzorcev smo pripravili tudi slepi vzorec, kjer smo namesto razredčenega vzorca odmerili 200 μL metanola. Vsebnost FS smo izmerili na podlagi umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili na osnovi galne kisline.

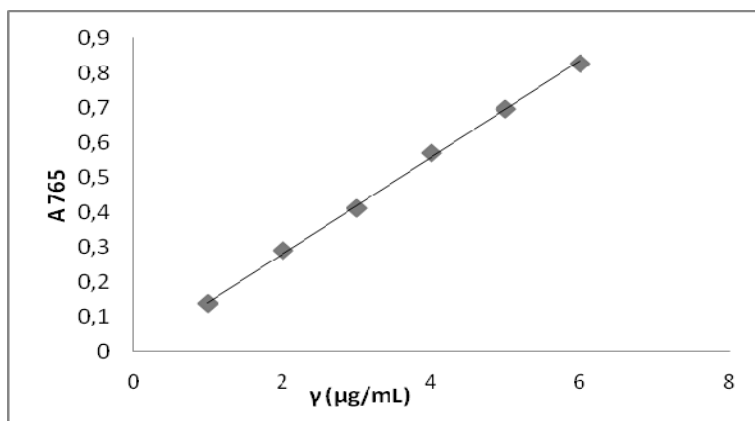
Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. V 25 mL bučko smo odtehtali 10 mg galne kisline, dopolnili do oznake z bidestilirano vodo ter premešali. Tako smo pripravili osnovno raztopino z masno koncentracijo ($\gamma_{\text{G.K.}}$) 400 $\mu\text{g/mL}$, ki smo jo kasneje razredčili za faktor 10. V centrifugirke smo odmerili različne volumne razredčene osnovne raztopine ter v skladu s FC metodo izmerili absorbanco pri 765 nm. V preglednici 4 so prikazani volumni osnovne raztopine (masna koncentracija 40 $\mu\text{g/mL}$), ki smo jih odmerili v reakcijsko mešanico, masna koncentracija galne kisline v reakcijski mešanici ($\gamma_{\text{G.K.}}$) in vrednosti izmerjene absorbance.

Preglednica 4: Volumen osnovne raztopine (V), masna koncentracija galne kisline v reakcijski mešanici ($\gamma_{\text{G.K.}}$) ter pripadajoča absorbanca A_{765}

V(μL)	$\gamma_{\text{G.K.}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	A_{765}
25	1	0,13747
50	2	0,29003
75	3	0,41089
100	4	0,56975
125	5	0,69715
150	6	0,82713

Iz masne koncentracije in izmerjene absorbance galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 6. Z linearno regresijsko analizo smo izračunali koeficient premice (k). Vrednost k je $0,1393 \pm 0,0009$, ($r^2 = 0,9997$).



Slika 6: Umeritvena krivulja z galno kislino v odvisnosti absorbance pri 765 nm od masne koncentracije galne kisline

Masno koncentracijo FS (γ_{FS}) v reakcijski mešanici smo izračunali iz zveze:

$$\gamma_{FS} = \bar{A}_{765}/k \quad \dots(8)$$

kjer je $\bar{A}_{765}$ povprečna vrednost absorbance dveh paralelk za posamezni vzorec.

Vsebnost sFS v oljkah in olju smo izračunali s pomočjo absorbance iz masne koncentracije sFS v reakcijski mešanici in masi oljk ali olja ter izrazili kot mg galne kisline na g oljk ali OO.

3.2.1.8 Določitev antioksidativne učinkovitosti (AU) ekstrakta fenolnih spojin z metodo DPPH·

Metodo so opisali Brand-Williams in sod. (1995) in temelji na spektrofotometričnem sledenju spremembi barve stabilnega prostega radikala DPPH·, ki absorbira svetlobo pri 517 nm.

Priprava reagenta

Najprej smo pripravili 0,1 mM raztopino DPPH· tako, da smo v 100 mL bučko odtehtali 4 mg DPPH· in ga raztopili do oznake s 100 % metanolom.

Priprava vzorcev za določanje antioksidativne učinkovitosti

Pri pripravi ekstraktov plodov smo v kivete odmerili različne volumne ekstraktov in topila (96 % etanol), tako, da je skupni volumen znašal 240 μ L. Pri ekstraktih olja smo za topilo uporabili 80 % metanol. Dodali smo 2760 μ L 0,1 mM DPPH· raztopine, vzorce postavili v temo in po 30 minutah merili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Ob tem smo pripravili tudi kontrolni vzorec na enak način, le da smo namesto ekstraktov v epruveto odmerili 240 μ L 96 % etanola.

Izračun antioksidativne učinkovitosti

Izračun DPPH· je potekal po formuli:

$$\% \text{ DPPH}\cdot = (A_{517}/A_{k517}) \times 100 \quad \dots(9)$$

A_{517} – absorbanca vzorca pri valovni dolžini 517 nm

A_{k517} – absorbanca kontrole pri valovni dolžini 517 nm

$$ED_{50} = 50 \% / k \quad \dots(10)$$

ED_{50} – koncentracija, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH·

k – naklon premice odvisnosti deleža DPPH· od koncentracije FS v reakcijski mešanici

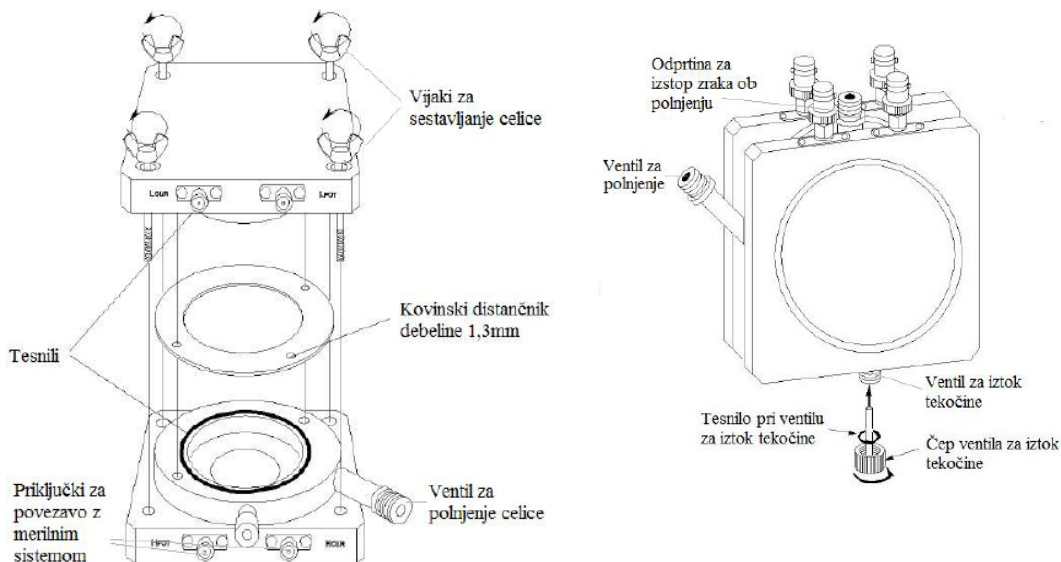
3.2.1.9 Dielektrična konstanta

Dielektrične lastnosti oljk in olja smo merili s kapacitivno metodo z uporabo celice za merjenje dielektričnih lastnosti tekočih vzorcev Agilent, 16452A in LCR merilnikom Agilent, E4980A.

Celica za merjenje dielektričnih lastnosti

Celica je kondenzator, ki omogoča določanje dielektrične konstante preko meritev impedance. Sestavljena je iz dveh paralelnih elektrod z določenim razmikom, med kateri nanese vzorec, olje ali pasto iz plodov. Celica lahko deluje pri napetosti od 30 V in v področju frekvenc od 20 Hz do 30 MHz. Meritve se lahko izvajajo pri temperaturah med -20 do +125 °C. Celico povežemo z LCR metrom s povezovalnim kablom.

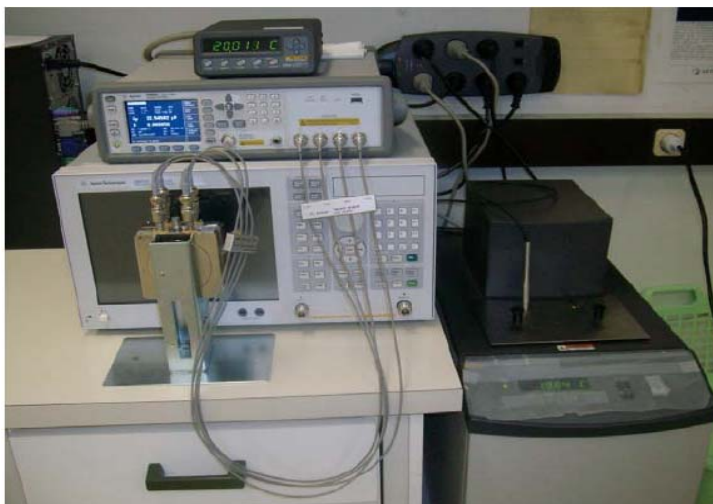
Impedanca je sestavljena iz realnega dela – upornosti in imaginarnega dela – reaktance, na instrumentu smo za določitev teh dveh parametrov izbrali funkciji kapacitivnost C_p in upornost R_p , kjer indeks p pomeni, da smo za meritve v celici - kondenzatorju izbrali paralelno nadomestno vezavo kondenzatorja in upora.



Slika 7: Celica za merjenje dielektričnih lastnosti tekočih in poltekočih vzorcev (Agilent Technologies, 2000)

Merjenje z LCR metrom

LCR Meter Agilent, E4980A omogoča meritve realnega in imaginarnega dela impedance v merilnem območju frekvenc od 20 Hz do 2 MHz pri napetosti od 100 μ V do 2 V. Pri meritvah dielektričnih lastnosti paste iz oljk in olja smo izvajali meritve C_p in R_p v različnih frekvenčnih območjih, in sicer med 20 Hz in 200 Hz po korakih po 20 Hz, med 200 Hz in 2 kHz v korakih po 200 Hz, med 2 kHz in 10 kHz v korakih po 500 Hz, med 10 kHz in 100 kHz v korakih po 5 kHz, med 100 kHz in 2 MHz v korakih po 50 kHz. Celoten proces merjenja je potekal avtomatizirano z uporabo računalnika ter pripadajočo programsko opremo. Vsak vzorec oljk smo izmerili v 3 paralelkah pri temperaturi 20 °C. Vsak vzorec olja smo izmerili v 2 paralelkah, pri temperaturah 20 °C, 25 °C, 35 °C in 50 °C.



Slika 8: Fotografija sistema celice, merilnika za merjenje impedance, termostata in uporovnega termometra (foto: Drnovšek J.)

Termostatiranje vzorcev

Za termostatiranje vzorcev smo uporabili termostatsko kopel, plinasti termometer z merilnim območjem -200 do 420 °C in digitalni termometer z natančnostjo $\pm 0,005$ °C. Temperaturo smo nastavljali ročno na termostatski kopeli in jo preverjali z digitalnim termometrom. Meritve smo izvedli, ko je bila temperatura konstantna vsaj 5 minut in smo dosegli natančnost temperature $\pm 0,05$ °C.

Priprava vzorcev

Plodove oljk smo v terilnici s pomočjo tekočega dušika strli v homogeno zmes. Strto meso oljk smo napolnili v celico za tekoče in poltekoče vzorce. Izmerili smo kapacitivnost in upornost strtega mesa oljk, $C_{p,plod}$ in $R_{p,plod}$. Olje smo posušili in razplinili z mešanjem 30 minut pri 0,10 bara in sobni temperaturi dokler mehurčki plinov niso izginili. Vzorce olj smo v celico napolnili s pomočjo 5 mL injekcijske igle.

Čiščenje celice

Po vsakem vzorcu je bilo potrebno celico temeljito očistiti. Celico smo osušili, iztočili vsebino ter jo izpirali s čistilom za čiščenje elektrod, ki odstranjuje maščobo, z vodo in s propan-2-olom. Celico smo odprli in vsako polovico sprali še z acetonom. Pri čiščenju ohišja celice smo uporabili izključno staničevino.

Izračuni dielektričnih lastnosti olja

Dielektrično konstanto (ϵ') olja smo izračunali po naslednji formuli (Midmore in sod., 1987):

$$\epsilon' = (C_p - C_s) / K_c \quad \dots(11)$$

C_p □ kapacitivnost olja

K_c – konstanta celice, določena pri kalibraciji z zrakom in cikloheksanom

C_s – korekcija zaradi razpršene kapacitivnosti, določena z zrakom in cikloheksanom

Za faktor dielektrične izgube (ϵ'') smo uporabili formulo:

$$\epsilon'' = 1 / (2 \times f \times \pi \times R_p \times K_c) \quad \dots(12)$$

f – frekvenca

π – matematična konstanta (3,14159)

R_p – upornost

Za izračun specifične električne prevodnosti (σ) formulo:

$$\sigma = \epsilon_0 / (R_p \times K_c) \quad \dots(13)$$

ϵ_0 – električna konstanta vakuum (8,854 × 10⁻¹² F × m⁻¹)

Umeritev celice za izračun dielektričnih lastnosti olja

Pred izvedbo meritev vzorcev je bilo potrebno izvesti kalibracijo sistema pri enakih pogojih kot so potekale meritve. Pri kalibraciji sistema za meritve dielektričnosti olja smo uporabili cikloheksan in zrak.

Celico smo napolnili s cikloheksanom in zrakom ter pri vsaki frekvenci in temperaturi izmerili C_p in R_p . Konstanto celice smo izračunali po vzoru Midmore in sod. (1987):

$$K_{C,f} = (C_{Cy} - C_A) / (\epsilon_{Cy} - 1) \quad \dots(14)$$

$K_{C,f}$		konstanta celice pri frekvenci f
C_{Cy}		kapacitivnost vode pri frekvenci f
C_A		kapacitivnost zraka pri frekvenci f
ϵ_{Cy}		dielektrična konstanta cikloheksana

Faktor za korekcijo kapacitivnosti, $C_{C,f}$ smo določili po naslednji enačbi:

$$C_{C,f} = C_A - K_{C,f} \quad \dots(15)$$

$C_{C,f}$		korekcija kapacitivnosti določena pri kalibraciji pri frekvenci f
C_A		konstanta celice pri frekvenci f
$K_{C,f}$		kapacitivnost zraka pri frekvenci f

Povprečno vrednost konstante celice, K_C in faktor za korekcijo kapacitivnosti C_C smo izračunali kot povprečje v območju frekvenc med 10 kHz in 500 kHz, kjer se ti dve konstanti ne spreminjata s frekvenco. Vrednost dielektrične konstante cikloheksana in konstante celice ter faktorja za korekcijo kapacitivnosti smo zbrali v preglednici 5. Vrednosti dielektrične konstante cikloheksana smo poiskali v literaturi (Malanowski in sod., 1979).

Preglednica 5: Dielektrična konstanta cikloheksana (ϵ_{Cy}) konstanta celice (K_C) in faktor za korekcijo kapacitivnosti (C_C) pri temperaturah od 20 do 50 °C

T (°C)	ϵ_{Cy}	$K_C \times 10^{11}$	$C_C \times 10^{12}$
20 °C	2,0228	$3,2866 \pm 0,0007$	$1,534 \pm 0,006$
25 °C	2,0153	$3,2785 \pm 0,0006$	$1,451 \pm 0,006$
35 °C	1,9994	$3,2655 \pm 0,0005$	$1,184 \pm 0,004$
50 °C	1,9732	$3,2655 \pm 0,0002$	$0,81 \pm 0,006$

Izračun dielektričnih lastnosti oljk

Specifično električno prevodnost (σ_{plod}) dielektrično konstanto (ϵ'_{plod}) in faktor izgub (ϵ''_{plod}) strtega mesa oljk, smo izračunali z naslednjimi enačbami:

$$\sigma_{plod} = \sigma_{NaCl} \times R_{p,NaCl} / R_{p,plod} \quad \dots(14)$$

σ_{NaCl} – specifična električna prevodnost natrijevega klorida

$R_{p,NaCl}$ – upornost natrijevega klorida

$R_{p,plod}$ – upornost strtega mesa oljk

$$\epsilon''_{plod} = \sigma_{plod} / (2 \times f \times \pi \times \epsilon_0) \quad \dots(15)$$

f – frekvenca

π – matematična konstanta (3,14159)

ϵ_0 – električna konstanta vakuumu ($8,854 \times 10^{-12} \text{ F} \times \text{m}^{-1}$)

$$\epsilon'_{plod} = \epsilon'_{NaCl} / (C_{p,NaCl} \times C_{p,plod}) \quad \dots(16)$$

ϵ'_{NaCl} – dielektrična konstanta natrijevega klorida

$C_{p,NaCl}$ – kapacitivnost natrijevega klorida

$C_{p,plod}$ – kapacitivnost strtega mesa oljk

Umeritev celice za izračun dielektričnih lastnosti oljk

Pri kalibraciji sistema za oljke smo uporabili raztopino natrijevega klorida s koncentracijo 0,03511 mol/L, ki ima specifično električno prevodnost, $\sigma_{NaCl} = 0,3273 \text{ S} \times \text{m}^{-1}$ in dielektrično konstanto, $\epsilon_{NaCl} = 79,4$. Za to raztopino smo za oba parametra $C_{p,NaCl}$ in $R_{p,NaCl}$ izmerili pri 20 °C in pri enakih frekvencah kot pri olju in oljkah.

Izračun temperaturne odvisnosti dielektrične konstante in faktorja dielektričnih izgub olja

Odvisnost dielektrične konstante in faktor dielektričnih izgub v odvisnosti od temperature smo določili z naslednjo enačbo:

$$\epsilon = A + B T + C T^2 \quad \dots(17)$$

A, B, C – korelacijski koeficienti funkcije

T , T^2 – temperatura

3.2.2 Statistična analiza

Za statistično analizo smo uporabili osebni računalnik in program Excel (Košmelj, 2007).

Enostavni statistični računi

Izračunali smo povprečne vrednosti meritev po naslednji enačbi:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \dots(18)$$

$\bar{x}$ – povprečna vrednost

n – število vzorcev

x_i – vrednosti i -te meritve

Napaka aritmetične sredine - standardni odklon smo izračunali po naslednji enačbi:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \dots(19)$$

SD – standardni odklon

x_i – vrednosti i -te enote vzorca

$\bar{x}$ – aritmetična sredina vzorca

n – število vseh vzorcev

Linearna regresijska analiza

Pri opisu umeritvenih krivulj, določitvi EC_{50} in odvisnosti dielektrične konstante olja od temperature smo uporabili linearno regresijsko analizo. Z metodo najmanjših kvadrantov smo izračunali parametre premice, naklon in odsek premice, njun standardni odklon ter kvadrat korelacijskega koeficienta premice.

Nelinearna regresijska analiza

Za določanje odvisnosti faktorja dielektričnih izgub od temperature smo uporabili nelinearno regresijsko analizo. Empirične konstante te relacije in kvadrat korelacijskega koeficienta smo izračunali z metodo najmanjših kvadratov.

Dunconov test

Pri nekaterih poskusih: maščobno kislinski sestavi oljčnega olja, prostih maščobnih kislinah, peroksidnem številu, skupnih fenolih olja in dielektričnih lastnostih smo zbrane podatke uredili s programom EXCEL XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999). Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z Dunconovim testom in primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI

4.1 SESTAVA OLJK

Ko so plodovi že precej razviti in je koščica že otrdela – začetek avgusta, se prične tvorba maščob v plodovih. Postopno dozorevanje je genetsko pogojeno, poleg tega vplivajo tudi okoljski dejavniki in agrotehnika (Vesel in sod., 2009). V spodnji preglednici je podana sestava oljk glede na vsebnost vode in vsebnost maščobe za posamezne sorte. Oljke so bile obrane v različnih terminih, odvisno od sorte in dozorelosti oljk.

Preglednica 6: Vsebnost vode in vsebnost maščobe za posamezne sorte oljk

vzorec	w_{H_2O} (%)	$w_{maščobe}$ (%)
Drobnica	$64,5 \pm 1,2$	$35,5 \pm 0,2$
Leccino	$63,1 \pm 0,1$	$34,5 \pm 3,5$
Črnica	$68,4 \pm 0,04$	$31,6 \pm 6,8$
Buga	$67,0 \pm 1,6$	$35,4 \pm 2,7$
Belica	$61,3 \pm 0,7$	$38,7 \pm 1,4$

V preglednici 6 lahko vidimo, da se tako vsebnost vode kot tudi vsebnost maščobe med sortami ni precej razlikovala. Črnica se je izkazala kot sorta z največjo vsebnostjo vode 68,4 %, medtem ko smo najmanjšo določili pri Belici 61,3 %. Smo pa v Belici določili najvišjo vsebnost maščobe 38,7 % in v Črnici seveda najnižjo vsebnost maščobe 31,6 %.

Avtorji Dabbou in sod. (2009) navajajo, da so v oljkah treh različnih sort iz Tunizije določili nižje vrednosti za vsebnost vode ter višje vrednosti za vsebnost maščobe. w_{H_2O} je znašala od 42,03 % do 50,78 %, vsebnost maščob od 35,41 % do 50,63 %, kar je precej več kot v naših analizah.

Avtorji Sakouhi in sod. (2011) so dokazali, da na akumulacijo maščob v plodu oljke in na maščobno kislinsko sestavo vplivajo faze zorenja oljke. Ugotovili so, da sta teža plodov in delež maščob odvisna od klimatskih pogojev obravnavanega območja. Razvoj in dozorevanje plodov je pogojeno s kombinacijo biokemijskih in fizioloških sprememb, ki nastajajo pri dozorevanju plodov. Tako so določili, da je najboljši čas za obiranje, ko so se skupni lipidi najbolj akumulirali.

4.2 MAŠČOBNO KISLINSKA SESTAVA OLJK IN OLJA

Preglednica 7: Poglavitne maščobne kisline v oljkah izražene kot g maščobne kisline na 100 g maščobnih kislin

OLJKE (g MK/100 g MK)					
MK	Buga	Belica	Drobnica	Leccino	Črnica
C16:0	11,4 ± 1,00	11,0 ± 0,70	9,40 ± 0,60	11,6 ± 0,40	11,7 ± 0,90
C16:1	0,00 ± 0,00	1,09 ± 0,06	1,09 ± 0,16	1,46 ± 0,04	2,78 ± 0,43
C18:0	0,63 ± 0,56	1,42 ± 0,13	1,35 ± 0,06	0,80 ± 0,70	1,06 ± 0,04
C18:1	81,0 ± 6,70	79,3 ± 4,30	75,3 ± 3,80	74,9 ± 3,10	66,7 ± 4,10
C18:2	5,60 ± 0,40	5,90 ± 0,40	4,50 ± 0,50	4,10 ± 0,20	6,30 ± 0,50
C18:3	0,82 ± 0,09	0,80 ± 0,10	0,57 ± 0,05	0,68 ± 0,08	0,80 ± 0,07
C20:0	0,43 ± 0,04	0,41 ± 0,04	0,43 ± 0,07	0,33 ± 0,07	0,36 ± 0,04

Preglednica 8: Poglavitne maščobne kisline v oljih izražene kot g maščobne kisline na 100 g maščobnih kislin

OLJE (g MK/100 g MK)					
MK	Buga	Belica	Drobnica	Leccino	Črnica
C16:0	10,7 ± 0,2 ^{bc}	10,7 ± 0,04 ^c	11,0 ± 0,13 ^c	11,9 ± 0,01 ^b	11,8 ± 0,22 ^a
C16:1	1,29 ± 0,10 ^b	1,30 ± 0,10 ^b	1,27 ± 0,01 ^b	1,32 ± 0,01 ^a	1,64 ± 0,02 ^b
C18:0	1,64 ± 0,07 ^b	2,25 ± 0,03 ^{bc}	1,59 ± 0,06 ^a	1,53 ± 0,01 ^d	1,49 ± 0,10 ^{cd}
C18:1	80,8 ± 1,20 ^a	79,4 ± 0,40 ^c	78,8 ± 0,96 ^b	78,9 ± 0,02 ^d	78,7 ± 1,32 ^c
C18:2	4,50 ± 0,05 ^c	5,34 ± 0,04 ^a	6,25 ± 0,05 ^b	5,35 ± 0,01 ^d	5,34 ± 0,06 ^c
C18:3	0,69 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,01 ^{ab}	0,69 ± 0,01 ^c	0,68 ± 0,02 ^b	0,69 ± 0,02 ^b
C20:0	0,34 ± 0,06 ^b	0,45 ± 0,04 ^{ab}	0,42 ± 0,05 ^a	0,37 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,01 ^b

Vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo (Dunconov test $\alpha = 0,05$)

Iz preglednic 7 in 8 lahko razberemo maščobno kislinsko sestavo oljk in olja. Prav tako lahko določimo dominantno MK enkrat nenasičeno oleinsko kislino, kar so potrdili že številni avtorji. Njena vsebnost variira od 66,7 % pri oljkah Črnica do 81,0 % pri Bugi. Pri olju vsebnost variira od 78,7 % pri Črnici do 80,8 % pri Bugi. Pri oljkah so variance oleinske kisline nekoliko večje kot med samimi olji. Druga najbolj zastopana pri oljkah je nasičena palmitinska kislina, ki dosega v Drobnici 9,40 % do 11,7 % v Črnici, tej v manjših količinah sledi linolna kislina. Ostale MK kot so palmitoleinska, stearinska, linolenska in arahidinska kislina se pojavljajo v nižjih koncentracijah, okoli 1 % do 2 % tudi manj.

Vse te spremembe lahko povežemo z veliko dejavniki. Velik vpliv imajo vsekakor zunanji dejavniki, sorta, dozorevanje plodov ter tudi čas obiranja.

Avtorji Dabbou in sod. (2009) so na območju Tunizije preučevali kakovost šestih različnih sort oljk. Med drugim so analizirali tudi maščobno kislinsko sestavo olja in ugotovili razlike med sortami. Te razlike so opisali pri treh najbolj zastopanih MK, te so oleinska, linolna in palmitinska kislina. Vsebnost oleinske kisline se je pri sorti Koroneiki gibala od 76,8 % do 57,9 % pri sorti Chemlali Sflax. Analizirani kultivarji gojeni v sušnih območjih proizvajajo OO z različnimi lastnostmi. Pri enakih sortah so vsebnost linolne kisline določili od 11,1 % do 18,2 % ter za palmitinsko kislino pri sortah Coratina od 11,1 % do 18,2 % pri sorti Chemlali Sflax. S pomočjo preglednice 8 lahko razberemo, da se vsebnost posameznih MK med briškimi in tunizijskimi olji razlikuje ter, da je maščobno kislinska sestava odvisna tudi od zemljepisne širine.

Nekateri avtorji so proučevali vsebnost MK glede na zorenje plodov. Yorulmaz in sod. (2013) navajajo, da so se nekatere MK kot npr. stearinska, palmitinska in linolenska kislina z dozorevanjem količinsko znižale, vzrok je v vezavi MK na celične membrane, medtem ko sta se linolna in palmitoleinska kislina količinsko povečali. Bengana in sod. (2013) so pokazali, da je naraščanje MK v sestavi tesno povezano z zorenjem plodov ter, da je vsebnost triacilglicerolov neodvisna glede na zorenje. Z zorenjem oljk se povečuje delež večkrat nenasičenih MK, s tem se večja tudi občutljivost OO na oksidacijo.

4.3 PROSTE MAŠČOBNE KISLINE (FFA) IN PEROKSIDNO ŠTEVILO (PŠ) OLJA

Kislinsko število olja (KŠ) ali kislinska stopnja določa stopnjo hidrolize triacilglicerolov v mono- in di-acilglicerole ter maščobne kisline. Kislost je lahko pokazatelj kakovosti plodov pred predelavo oziroma razgradnje olja v plodu. Visoka kislost je lahko posledica poškodovanih, gnilih, fermentiranih in/ali plesnivih plodov. Čim nižja je vrednost FFA, kvalitetnejše je olje.

PŠ je pokazatelj primarne stopnje oksidiranosti. Čim nižje je PŠ, kvalitetnejše je olje in dalj časa ga lahko hranimo. Visoka vrednost PŠ je lahko posledica večje vsebnosti večkrat nenasičenih MK, ki hitreje oksidirajo ter tudi neprimernega hranjenja olja – svetloba, temperatura oziroma tudi starost olja (Bučar-Miklavčič in sod., 2010).

V preglednici 9 so podani rezultati analiziranih vzorcev olja za FFA in PŠ.

Preglednica 9: Vsebnost prostih maščobnih kislin (v ut. %; kot oleinska kislina) in PŠ (v mmol O₂ na kg olja) v vzorcih OO

sorta	% oleinske k.	PŠ (mmol O ₂ /kg olja)
Buga	0,113 ± 0,005 ^b	2,93 ± 0,16 ^b
Drobnica	0,123 ± 0,002 ^{ab}	2,70 ± 0,09 ^c
Belica	0,132 ± 0,002 ^a	1,95 ± 0,09 ^d
Črnica	0,114 ± 0,002 ^b	2,08 ± 0,08 ^{dd}
Leccino	0,0815 ± 0,012 ^c	3,28 ± 0,11 ^a

Vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo (Dunconov test $\alpha = 0,05$)

V poglavju Zakonske osnove o oljčnem olju so napisane mejne vrednosti za kemijske parametre za kategorizacijo OO. Mejna vrednost za FFA pri EDOO je $\leq 0,8$ ut.%, za PŠ ≤ 10 mmol O₂/kg olja (preglednica 1). Iz preglednice 9 lahko vidimo, da naši vzorci na podlagi teh dveh izmerjenih parametrov ustrezajo kategoriji Ekstra deviško oljčno olje.

Večina avtorjev spremlja spreminjanje kakovostnih parametrov z daljšim časom skladiščenja ali s segrevanjem. Tako so avtorji Xueqi in sod. (2014) opazovali parameter PŠ pri skladiščenju in ugotovili, da PŠ doseže maksimum po 6 do 8 tednih skladiščenja. Nato se vrednost spet nekoliko zniža, vendar ne pade do prvotne vrednosti. Razlog za naraščanje PŠ je v večji primarni oksidaciji z relativno visoko stopnjo hidroperoksidov, do zniževanja peroksidnega števila po določenem času pride zaradi razgradnje peroksidov v sekundarne produkte oksidacije. Tudi avtorji Vakiari in sod. (2002) so opazili trend povečanja PŠ v vzorcih OO, ki so bili skladiščeni v temnem prostoru prvih 7 mesecev.

4.4 DOLOČANJE FS V PLODOVIH OLJK IN OLJU

Vsebnost FS tako v plodovih kot v olju smo določili s FC reagentom, ki temelji na spektrofotometričnem spreminjanju barve pri valovni dolžini 765 nm ter podatke zbrali v preglednicah 10 in 11.

Preglednica 10: Odtehta oljk za pripravo ekstraktov, absorbcije reakcijskih zmesi s FC reagentom pri 765 nm, vsebnost FS v ekstraktu oljk in koncentracije FS v oljkah

vzorec oljk	odtehta	A _{1 765}	A _{2 765}	γ FS, ekstrakt *	sFS v oljkah **
	(g)			(μ g/mL)	(mg/g)
Drobnica	15	0,6457 $\pm$ 0,022	0,6591 $\pm$ 0,024	959	5,23
		0,6906 $\pm$ 0,022	0,7071 $\pm$ 0,024	981	5,28
Belica	15	0,8256 $\pm$ 0,026	0,7143 $\pm$ 0,031	1223	6,66
		0,8785 $\pm$ 0,026	0,7763 $\pm$ 0,031	1070	5,76
Leccino	15	0,3740 $\pm$ 0,014	0,3792 $\pm$ 0,016	557	2,97
		0,4023 $\pm$ 0,014	0,4103 $\pm$ 0,016	567	2,95
Črnica	15	0,7692 $\pm$ 0,031	0,7580 $\pm$ 0,025	1149	6,64
		0,8311 $\pm$ 0,031	0,8086 $\pm$ 0,025	1124	6,36
Buga	15,04	0,5236 $\pm$ 0,021	0,4801 $\pm$ 0,021	781	4,06
		0,5648 $\pm$ 0,021	0,5227 $\pm$ 0,021	720	3,74

* μ g galne kisline/mL raztopine ekstrakta

**mg galne kisline/g oljk

V preglednici 10 lahko vidimo, da pri oljkah vsebuje Črnica največ FS, oljke Leccino najmanj. Pri Črnici smo določili vsebnost fenolov 6,5 mg/g, pri Leccinu 2,9. Te vrednosti so v primerjavi z rezultati Manzin (2010) precej nižje. Avtor je za sorto Karbonaca določil 15,1 mg/g ter sorto Buža 8,7 mg/g fenolov. Razlogov za taka nihanja v različnih vsebnostih fenolov je veliko, kar so analizirali številni avtorji. Tako so avtorji Patumi in sod. (2002) preučili, da na prag FS v plodovih vplivajo tudi stresni pogoji, tako se npr. v

sušnem letu zvišuje, v primeru uporabe namakanja znižuje. Ker so bile analizirane oljke iz moje naloge obrane v oljčniku z urejenim namakalnim sistemom, je mogoče tudi v tem razlog za nekoliko nižje vrednosti FS v plodovih oljk.

Preglednica 11: Odtehta olja za pripravo ekstraktov, absorbcije reakcijskih zmesi s FC reagentom pri 765 nm, vsebnost FS v ekstraktu olj in koncentracije FS v olju

vzorec OO	odtehta OO	A1 765	A2 765	γ FS, ekstrakt*	sFS v OO**
	(g)			($\mu\text{g/mL}$)	(mg/g)
Buga	1,51	$0,3978 \pm 0,0002$	$0,3459 \pm 0,0002$	114	0,227
		$0,3981 \pm 0,0002$	$0,3462 \pm 0,0002$	99,3	0,197
Belica	1,5	$0,6083 \pm 0,0003$	$0,5962 \pm 0,0001$	175	0,349
		$0,6078 \pm 0,0003$	$0,5960 \pm 0,0001$	171	0,342
Drobnica	1,52	$0,4562 \pm 0,0001$	$0,4841 \pm 0,0001$	131	0,258
		$0,4561 \pm 0,0001$	$0,4839 \pm 0,0001$	139	0,274
Črnica	1,5	$0,5149 \pm 0,0001$	$0,5435 \pm 0,0001$	148	0,296
		$0,5151 \pm 0,0001$	$0,5433 \pm 0,0001$	156	0,312
Leccino	1,5	$0,3533 \pm 0,0002$	$0,3601 \pm 0,0001$	101	0,203
		$0,3530 \pm 0,0002$	$0,3604 \pm 0,0001$	103	0,207

* μg galne kisline/mL raztopine ekstrakta

**mg galne kisline/g olja

Preglednica 12: Statistična analiza podatkov za vsebnost fenolnih spojin v olju

vzorec OO	sFS v OO**
	(mg/g)
Buga	$0,212 \pm 0,021^d$
Belica	$0,346 \pm 0,005^a$
Drobnica	$0,266 \pm 0,011^c$
Črnica	$0,304 \pm 0,012^b$
Leccino	$0,205 \pm 0,003^d$

**mg galne kisline/g olja

Vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo (Dunconov test $\alpha = 0,05$)

Olje sorte Belica vsebuje največ FS, sorta Leccino tako kot pri oljkah vsebuje najmanj FS. Tako smo Belici določili 0,35 mg/g in Leccinu 0,21 mg/g fenolov. Vsebnost FS je statistično enaka v vzorcih olja Buge in Leccina (preglednica 12). Za sorto Belica smo predvideli, da bo vsebovala največ FS v olju, kar so že številni avtorji dokazali (Pandolfi in sod., 2007; Bandelj in sod., 2014). Slokar (2010) je v vzorcih olja določila zelo raznolike vsebnosti FS, in sicer od 0,043 mg/g do 0,530 mg/g. Naši vzorci niso imeli tako velikih nihanj, vrednosti se gibljejo v podobnem rangju.

Iz preglednic 10 in 11 lahko vidimo, da se vsebnost FS tekom predelave za isto sorto oljke in olja spreminja. V oljih se ohrani manjša vsebnost fenolov kot v plodovih oljke. Eden izmed vzrokov je v vezavi fenolov na membrano in pogačo, tako da se le-ti ne ekstrahirajo.

Ostalih razlogov za spremembe je še veliko, od naravnih pogojev do načina obdelave kot tudi do načina predelave iz oljk v olje, ki je pogojeno z dobro higieno.

Biofenole OO tvorijo sekoiridoidi, lignani ter flavonoidi, ki v veliki meri prispevajo k aromi in okusu. Lignane in flavonoide pogosto najdemo tudi v drugih živilih, kar je bil razlog za začetek raziskovanja fenolov. Lignani OO so pinorezinol, acetoksipinorezinol in hidroksipinorezinol. Flavonoida predstavljata luteolin in apigenin. Značilnost oljčnih biofenolov predstavljajo sekoiridoidi, kjer sta glavna predstavnika ligstrozid in oleuropein. Ligstrozid in oleuropein, ki ju vsebujejo sveži plodovi, lahko zaradi poškodb ali pri sami predelavi vstopita v tri možne pretvorbene-reakcijske poti. Prvi dve sta encimskega izvora in vodita do aldehydne oblike oleuropein (ligstrozid) aglikona ter do hidroksi oblike oleuropein (ligstrozid) aglikona. Tretja pot je antioksidativen razpad sekoiridoida do dialdehydne oblike oleuropein aglikona (O-Agl-dA) in dialdehydne oblike dekarboksimetil oleuropein aglikona (DMO-dA). Enako se dogaja tudi z ligstrozidom. Te pretvorbe potekajo vse dokler sekoiridoidi ne zreagirajo do svojih končnih oblik – aromatskih alkoholov tirosole in hidroksitirosole, s čimer postane tudi olje oksidativno šibkejšo (Bandelj in sod., 2014).

Uredba Komisije (EU) 432/2012, ki je bila objavljena leta 2012, določa pravila za uporabo zdravstvenih trditev o različnih živilih. Za polifenole v OO navajajo trditev »Polifenoli v oljčnem olju prispevajo k zaščiti lipidov v krvi pred oksidativnim stresom.« Uredba navaja, da se trditev lahko uporablja samo za oljčno olje, ki vsebuje vsaj 5 mg hidroksitirosole in njegovih derivatov (npr. kompleks oleuropeina in tirosole) na 20 g oljčnega olja. Za navedbo trditve je potrošnike treba obvestiti, da se koristni učinek doseže z dnevnim vnosom 20 g oljčnega olja.

Avtorji Bianco in sod. (2014) so preučevali koncentracije tirosole in hidroksitirosole, sekoiridoidov in celokupnih biofenolov v svežih slovenskih oljih ter ocenili njihovo nihanje med skladiščenjem, v odvisnosti od roka trajanja. Koncentracije olj so merili takoj v svežem olju, v istem vzorcu olja po enem letu in po dveh letih. Avtorji so skladno z ugotovitvami ostalih avtorjev dokazali, da so se koncentracije sekoiridoidov pomembno zmanjšale po dveh letih, medtem ko so se koncentracije končnih produktov hidroksitirosole in tirosole povečale. Tukaj je tudi razlog, da so se koncentracije celokupnih biofenolov po dveh letih le znatno zmanjšale. Ugotovili so, da koncentracije posameznih biofenolov prevladujejo v določeni sorti oljk. Tako so npr. za Istrsko Belico značilni DMO-Agl-dA, DML-Agl-dA, L-Agl-dA, medtem ko za Leccino DMO-Agl-dA in O-Agl-A. Ob primerjavi celokupnih biofenolov v svežih oljih, se le-ti lahko razlikujejo na letni ravni. Primerjali so biofenole v svežem olju pridelane v letih 2011, 2012 in 2013 ter določili najvišje koncentracije v oljih pridelanih 2012. Razlog je lahko v ekstremnih vremenskih razmerah, kot je bila tistega leta suša. Leto 2013 je bilo zaznamovano kot bolj deževno leto.

Pri analizah smo uporabili le FC metodo za določitev vsebnosti FS. Metoda FC je pogosto uporabljena, vendar ni dovolj specifična. V zadnjem času se vse bolj uveljavljajo določitve biofenolov s HPLC metodo, kjer lahko okarakteriziramo posamezne fenolne spojine (Bandelj in sod., 2014).

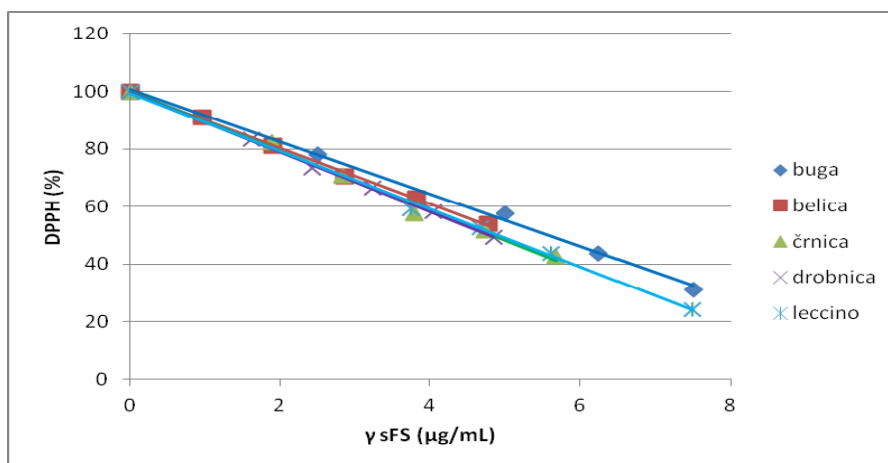
4.5 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST OLJK IN OLJA NA OSNOVI EKSTRAKTOV FENOLNIH SPOJIN Z METODO DPPH·

Antioksidativno učinkovitost smo določili z metodo DPPH·, ki temelji na lovljenju barve iz vijolične v rumeno, zaradi zmanjšanja vsebnosti reaktivne oblike radikala DPPH·. Določili smo tudi vrednost ED₅₀, ki predstavlja koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski mešanici, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH·.

Podatki za določanje AU, naklon in EC₅₀ za oljke in olja smo zbrali v preglednicah 13 in 14. Na slikah 9 in 10 pa je prikazana odvisnost % DPPH· od koncentracije FS v reakcijski mešanici, ki je ostal v tej mešanici po 30 minutah. Vsakemu vzorcu smo določili tudi naklon premice, k, s katerim lahko sklepamo o učinkovitosti lovljenja radikala. Večji kot je naklon premice, boljša je sposobnost lovljenja prostih radikalov in nižja je vrednost ED₅₀.

Preglednica 13: Izmerjene vrednosti absorbanc reakcijskih zmesi ekstraktov oljk pri 517 nm po 30 minutah, masna koncentracija FS v reakcijski zmesi, delež DPPH·, ki je preostal v mešanici po 30 minutah, naklon premice (k) ter vrednost ED₅₀, ki podaja koncentracijo FS v reakcijski zmesi, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH·.

vzorec		γ FS rkc.z.	DPPH· (%)	k	ED ₅₀
oljke	A517	(μg/mL)	t=30min		(μg/mL)
Buga	0,867	2,50	78,1	-9,0839	5,50
	0,637	5,00	57,5		
	0,483	6,25	43,6		
	0,347	7,50	31,4		
Belica	1,025	0,955	91,1	-9,7059	5,15
	0,914	1,91	81,2		
	0,794	2,87	70,6		
	0,709	3,82	63,0		
	0,608	4,78	54,0		
Črnica	0,882	1,89	82,3	-10,329	4,84
	0,759	2,84	70,8		
	0,618	3,79	57,6		
	0,553	4,74	51,6		
	0,459	5,68	42,8		
Drobnica	0,922	1,62	83,5	-10,4	4,81
	0,812	2,42	73,6		
	0,735	3,23	66,6		
	0,644	4,04	58,3		
	0,544	4,85	49,3		
Leccino	0,655	3,75	59,3	-10,041	4,98
	0,582	4,68	52,7		
	0,483	5,62	43,8		
	0,267	7,50	24,2		



Slika 9: Vsebnost DPPH· v procentih za posamezne sorte oljk v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin, ki je ostala v reakcijski mešanici po 30 minutah

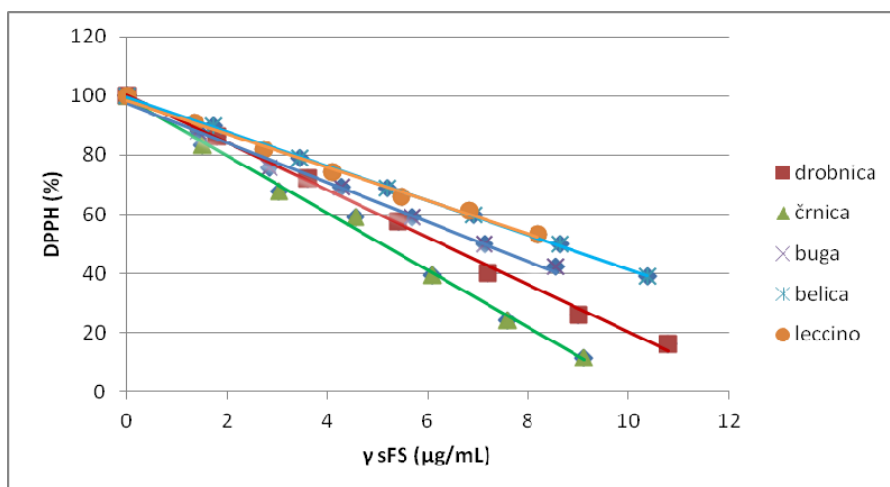
Iz slike 9 lahko lepo vidimo, da se premice prekrivajo, kar pomeni, da imajo enako antioksidativno učinkovitost. Za natančnejšo interpretacijo lahko iz preglednice 13 razberemo, da ima najbolj učinkovito sposobnost lovljenja sorta Drobnica, ki ima $k = -10,4$. Najnižjo učinkovitost lovljenja ima sorta Buga s $k = -9,0839$. Manzin (2010) je svojim vzorcem oljk Karbonaca in Buža določil slabšo sposobnost lovljenja radikalov, saj so vrednosti za ED_{50} znašale od 14,1 do 16,2 $\mu\text{g/mL}$.

V spodnji preglednici so podani rezultati za izmerjene vrednosti absorbanc pri olju, delež DPPH·, ki je ostal pri posameznem poskusu nezreagiran, naklon premice in ED_{50} . Iz teh podatkov lahko natančno razberemo, katera sorta olja ima največji antioksidativni potencial.

Preglednica 14: Izmerjene vrednosti absorbanc reakcijskih zmesi ekstraktov olj pri 517 nm po 30 minutah, masna koncentracija FS v reakcijski zmesi, delež DPPH·, ki je preostal v mešanici po 30 minutah, naklon premice (k) ter vrednost ED₅₀, ki podaja koncentracijo FS v reakcijski zmesi, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH·.

vzorec		γ FS rkc.z.	DPPH· (%)	k	ED ₅₀
olja	A517	($\mu\text{g/mL}$)	t=30min		($\mu\text{g/mL}$)
Drobnica	0,795	1,80	86,3	-8,0055	6,25
	0,663	3,60	72		
	0,530	3,40	57,6		
	0,371	7,20	40,3		
	0,241	9,00	26,2		
	0,149	10,80	16,2		
Črnica	0,904	1,52	83,3	-9,6903	5,16
	0,734	3,04	67,7		
	0,640	4,56	58,9		
	0,428	6,08	39,5		
	0,262	7,60	24,2		
	0,124	9,12	11,4		
Buga	0,820	1,43	88,1	-6,6692	7,50
	0,710	2,85	75,9		
	0,644	4,27	69,1		
	0,549	5,70	58,9		
	0,464	7,12	49,8		
	0,396	8,54	42,5		
Belica	0,989	1,73	89,9	-5,8217	8,59
	0,870	3,46	79,0		
	0,757	5,19	68,7		
	0,657	6,91	59,7		
	0,549	8,64	49,8		
	0,432	10,4	39,2		
Leccino	0,995	1,37	90,9	-5,6307	8,88
	0,898	2,73	82,0		
	0,816	4,10	74,5		
	0,723	5,46	66,1		
	0,671	6,83	61,3		
	0,583	8,20	53,3		

Iz strmine premic na sliki 10 lahko razberemo, katera sorta olja ima boljši antioksidativni potencial (AOP). Sorta Črnica ima največjo učinkovitost za sposobnost lovljenja prostih radikalov, njen k znaša -9,6903. Med najslabšimi se je pokazal ekstrakt sorte Leccino s k=-5,6307. Ob primerjavi z rezultati Slokar (2010) so naši vzorci pokazali boljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov. Avtorica navaja olje z najboljšo antioksidativno učinkovitostjo za vzorec, ki ima ED₅₀ 7,5 $\mu\text{g/mL}$.

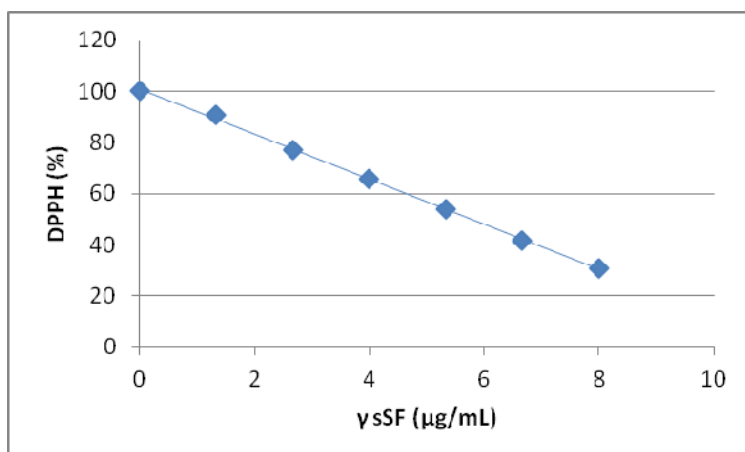


Slika 10: Vsebnost DPPH $\cdot$ v procentih za posamezne sorte olj v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin, ki je ostala v reakcijski mešanici po 30 minutah

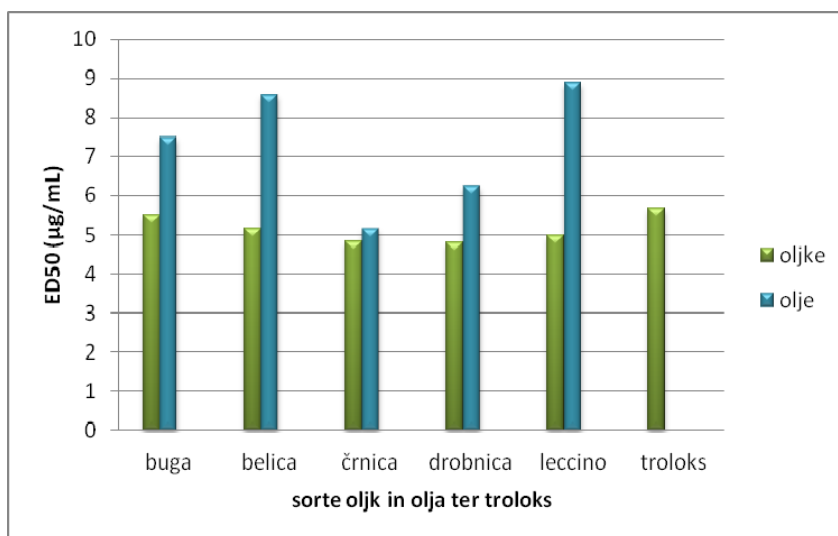
Antioksidativno učinkovitost smo izmerili tudi standardu troloks. Troloks je sintetični standard, ki ima fenolni del podoben tokoferolom in spada med fenole. Troloks je topen v metanolu, zato se ga uporablja za »nadomestek« tokoferola in obenem kot primerjavo za ugotavljanje sposobnosti lovljenja prostih radikalov različnih fenolnih spojin. Rezultate za troloks smo predstavili v preglednici 15 in na sliki 11.

Preglednica 15: Izmerjene vrednosti absorbanc troloksa pri 517 nm po 30 minutah, masna koncentracija FS v reakcijski zmesi, delež DPPH $\cdot$, ki je preostal v mešanici po 30 minutah, naklon premice (k) ter vrednost ED_{50} , ki podaja koncentracijo FS v reakcijski zmesi, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH $\cdot$.

vzorec		γ FS rkc.z.	DPPH $\cdot$ (%)	k	ED_{50}
	A517	(μ g/mL)	$t=30$ min		(μ g/mL)
Troloks	1,011	1,33	90,6	-8,8144	5,67
	0,863	2,67	77,3		
	0,735	4,00	65,9		
	0,600	5,33	53,7		
	0,467	6,67	41,8		
	0,342	8,00	30,7		



Slika 11: Vsebnost DPPH[•] v procentih za troloks v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin, ki je ostala v reakcijski mešanici po 30 minutah



Slika 12: Primerjava enakih sort oljk in olja ter troloksa glede na ED50

Na sliki 12 lahko razberemo, v kakšnem zaporedju si sledijo oljke in olja glede na sposobnost lovljenja prostih radikalov. Pri oljkah velja zaporedje Drobnica, Črnica, Leccino, Belica, Buga za zvečanje iz $ED_{50} = 4,81 \mu\text{g/mL}$ na $5,50 \mu\text{g/mL}$. Pri olju je AOP največji pri Črnici in se znižuje s sorto Drobnica, Buga, Belica ter Leccino.

Višja antioksidativna učinkovitost oljke ne pomeni tudi višje antioksidativne učinkovitosti olja – med oljem in plodom iste sorte nismo našli linearne povezanosti. Za vse sorte lahko opazimo, da je AOP pri olju manjši kot pri plodovih iste sorte. Troloks kaže podobno učinkovitost za lovljenje prostih radikalov kot oljke, pri oljih se to nekoliko razlikuje. Vrednost ED_{50} za troloks je primerljiva z ekstrakti plodov sorte Buga in oljem sorte Drobnica ter Črnica. Fenolne spojine izolirane iz olja so bolj učinkovite kot troloks.

Avtorji Condelli in sod. (2015) navajajo, da je α -tokoferol spojina, ki najbolj vpliva na antioksidativno učinkovitost OO. Za izpopolnitev priporočil za dnevni vnos vitamina E, naj bi zadoščalo zaužitje 50 mL EDOO z najvišjo koncentracijo tokoferola. Na dobro kakovostno OO vpliva vsebnost α -tokoferola in polarnih fenolnih spojin. Vsebnost teh spojin variira glede na sorto, klimatske vplive, dozorelost plodov in načinom predelave oljk.

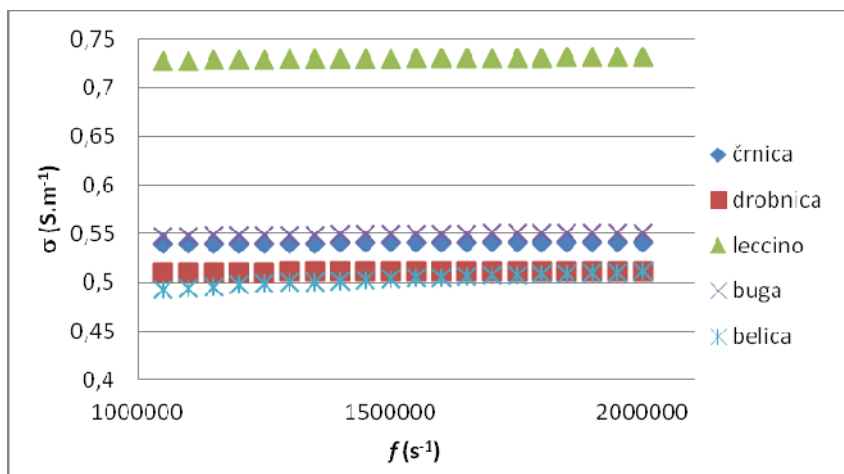
4.6 DIELEKTRIČNE LASTNOSTI OLJK IN OLJA

4.6.1 Dielektrična konstanta in prevodnost strtega mesa oljk

Strto meso oljk smo napolnili v celico za tekoče in poltekoče vzorce. Izmerili smo kapacitivnost in upornost strtega mesa oljk, $C_{p,plod}$ in $R_{p,plod}$. Izmerjene upornosti so med 0,35 in 0,55 Ω . Meso oljk sodi med prevoden material v primerjavi z oljčnim oljem, kjer smo izmerili upornosti med 1 in 100 k Ω pri isti temperaturi in enakih frekvencah.

Meso oljk vsebuje precej vode. Za meritve upornosti in kapacitivnosti v vodnih sistemih je značilno, da se na površini elektrode lahko naberejo ioni v več plasteh, kar vpliva na meritve. Ta efekt ima manjši vpliv pri višjih frekvencah. Zato smo določili električne in dielektrične lastnosti strtega mesa oljk pri frekvencah od 1 do 2 MHz.

Na slikah 13 do 15 smo prikazali odvisnost specifične električne prevodnosti, faktorja dielektričnih izgub in dielektrične konstante strtega mesa oljk od frekvence.



Slika 13: Odvisnost specifične prevodnosti strtega mesa oljk od frekvence

Iz meritev smo določili specifično električno prevodnost strtega mesa oljk, ki je od frekvence neodvisna (slika 13). Povprečne vrednosti specifične električne prevodnosti v izbranem frekvenčnem območju smo podali v preglednici 16, kje se vidi, da se vrednosti σ_{plod} nekoliko razlikujejo med sortami, kar lahko pripišemo tako količini vode kot količini ionskih snovi v plodovih. Napake pri vrednostih električnih prevodnosti v preglednici 16

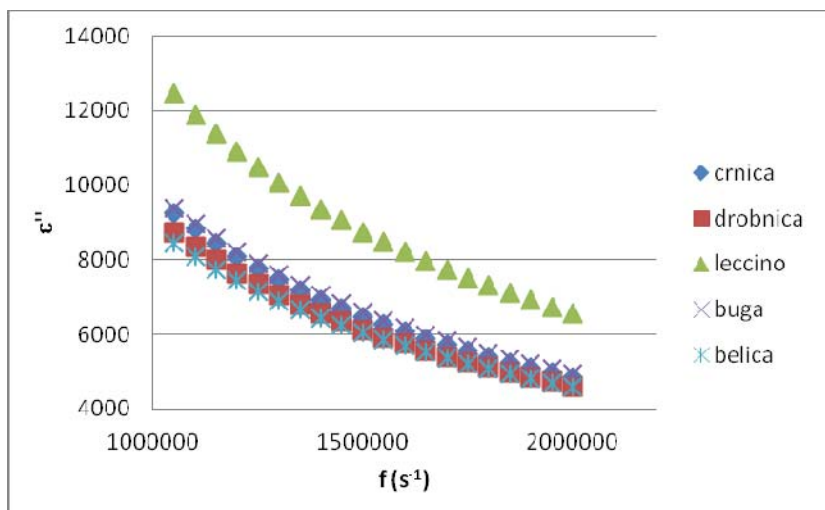
predstavljajo spreminjanje prevodnosti s frekvenco in so zelo nizke. Mnogo večjo napako predstavlja polnjenje poltrdega materiala v režo med elektrodama, ponovljivost določitve specifične električne prevodnosti je <5 %. Podatke o ponovljivosti smo uporabili za Dunconov test, ki je pokazal, da med vzorci ni statistično značilnih razlik, razen za sorto Leccino.

Preglednica 16: Povprečna vrednost specifične prevodnosti in dielektrična konstanta določena pri frekvenci 2 MHz za strto meso oljk

sorta	$\sigma_{\text{plod}} (\text{S} \times \text{m}^{-1})$	$\varepsilon'_{\text{plod}} (2 \text{ MHz})$
Črnica	$0,5406 \pm 0,0004^b$	84 ± 8^c
Drobnica	$0,5111 \pm 0,0004^b$	89 ± 12^c
Leccino	$0,7301 \pm 0,0015^a$	171 ± 33^b
Buga	$0,5497 \pm 0,0012^b$	140 ± 23^{bc}
Belica	$0,5034 \pm 0,0057^b$	277 ± 20^a

Vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo (Dunconov test $\alpha = 0,05$)

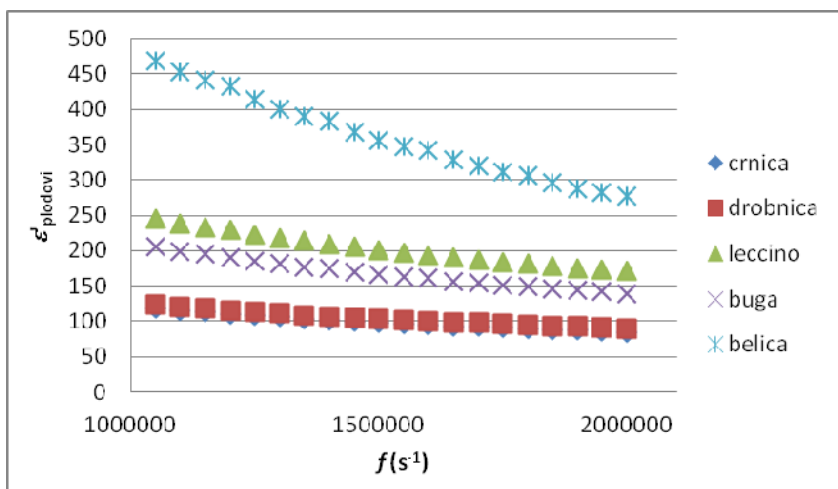
Faktor dielektričnih izgub se znižuje z naraščajočo frekvenco (slika 14), kar je značilni trend za ionski prispevek k izgubam. Trend zniževanja je večji pri tistih oljkah, kjer je prisotnih več ionskih snovi in pri katerih smo določili najvišjo električno prevodnost.



Slika 14: Odvisnost faktorja dielektričnih izgub strtega mesa oljk od frekvence

Pri meritvah kapacitivnosti in izračunu dielektrične konstante se mnogo bolj pozna prispevek zaradi oblikovanja plasti ionov na površini elektrod. Izračunana dielektrična konstanta mesa oljk (slika 15, preglednica 16) je previsoka. Pričakovana vrednost dielektrične konstante za živilo z vsebnostjo vode 65 % in maščobe 35 % (preglednica 16) bi bila okrog 50. Kapacitivnost in izračunana dielektrična konstanta zaradi nabiranja ionov na površini elektrod bolj odraža prevodnost kot dielektričnost. Nižjo dielektrično konstanto in nižjo specifično električno prevodnost smo določili pri Drobnici in Črnici, višjo pri Bugi

in sorti Leccino. Izjema je izjemno visoka dielektrična konstanta pri sorti Belica, kjer smo določili najnižjo prevodnost. Ponovljivost določanja dielektrične konstante je <15 %.

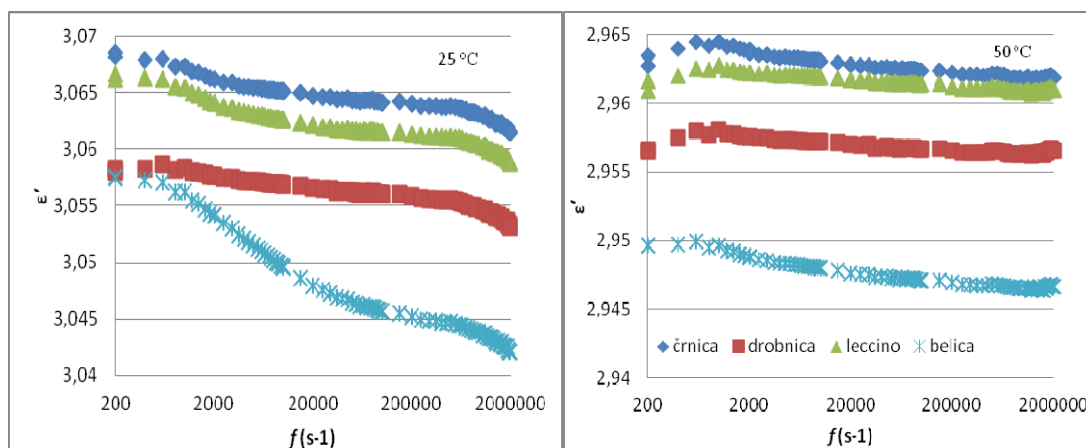


Slika 15: Odvisnost dielektrične konstante strtega mesa oljk od frekvence

4.6.2 Dielektrična konstanta in prevodnost olja

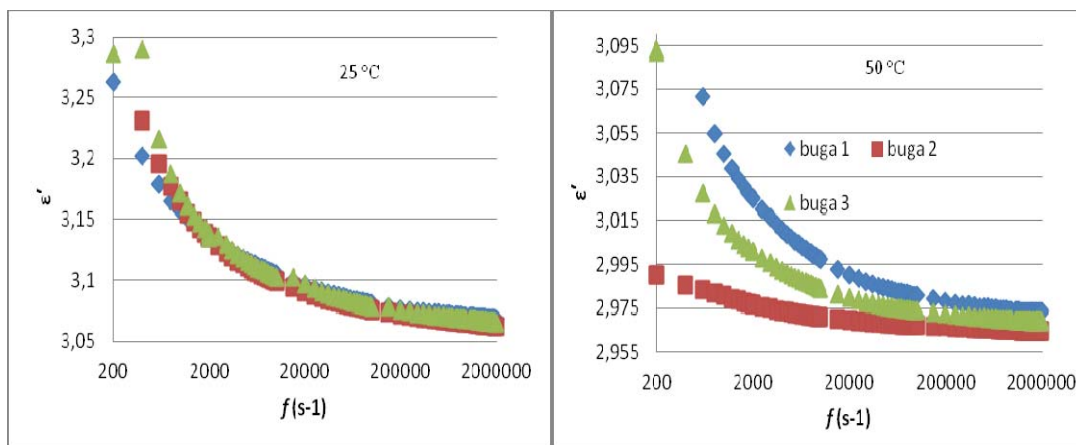
Določanje dielektričnih lastnosti rastlinskim oljem ima široko paleto uporabe. Z njimi lahko ugotavljamo ali je bilo olje skladiščeno pri pravih pogojih, potvorjenost olja, novi trendi kažejo na možnost določanja maščobno kislinske sestave.

Iz slike 16 lahko vidimo, da imata sorti Črnica in Leccino podoben trend spreminjanja dielektrične konstante s frekvenco, slika je podobna tudi pri Drobnici, le da so vrednosti ϵ' nekoliko nižje. Sorta Belica ima popolnoma drugačen trend, ϵ' se s frekvenco izrazito zmanjšuje. Spreminjanje dielektrične konstante s frekvenco je pri 25 °C precej večje, kot pri 50 °C. Razlogov za takšno odvisnost dielektrične konstante od frekvence v literaturi nismo našli, oblika takega spektra zahteva dodatno raziskovanje.



Slika 16: Odvisnost dielektrične konstante vzorcev olja sort Črnica, Drobnica, Leccino in Belica od frekvence pri 25 °C in 50 °C

Ker smo za sorto Buga dobili bistveno drugačne meritve od ostalih vzorcev, smo spreminjanje dielektrične konstante s frekvenco za to sorto podali na ločenem grafu (slika 17). Vrednosti ϵ' so precej višje, trend je drugačen, meritve niso ponovljive. Samo pri tem olju smo opazili penjenje med odstranjevanjem vode in degaziranjem. Olje je na pogled bistro in se po barvi in motnosti ne razlikuje od ostalih olj.



Slika 17: Odvisnost dielektrične konstante vzorca olja sorte Buga od frekvence pri 25 °C in 50 °C

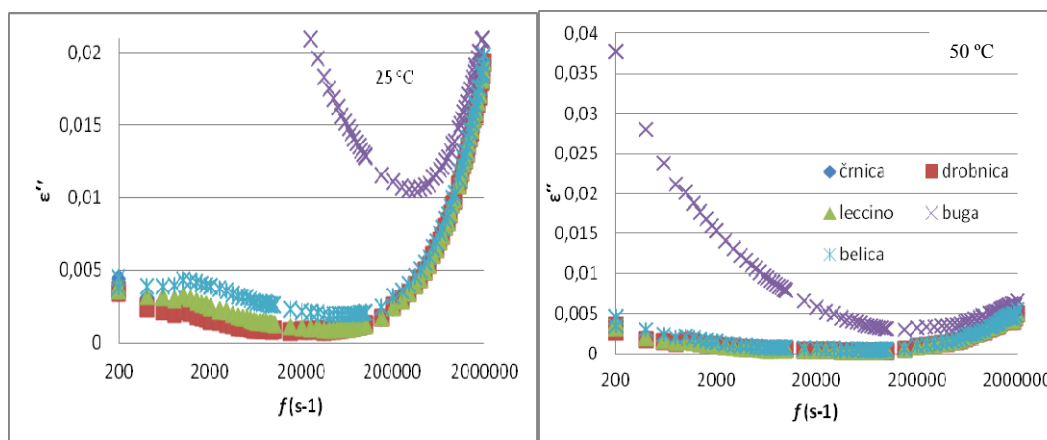
Povprečne vrednosti ϵ' smo zbrali v preglednici 17. Pri nižji temperaturi smo najnižjo vrednost določili pri Belici 3,042, najvišjo vrednost pri sorti Črnica 3,068. Pri 50 °C to zaporedje ostaja enako, le vrednosti so nekoliko nižje, pri Črnici je ϵ' 2,964, pri Belici 2,946. Lizhi in sod. (2008) so določili plato olja pri frekvencah od 100 Hz do 500 kHz ter v tem platu določili tudi maksimalno vrednost, ter opisali neodvisnost ϵ' od frekvence. V našem primeru zaznamo odvisnost ϵ' od frekvence. Vrednosti pri 1 MHz znašajo od 3,044 do 3,063, te rezultate lahko primerjamo z rezultati v literaturi, ki znašajo od 3,041 do 3,049 (Lizhi in sod., 2008).

Preglednica 17: Povprečne vrednosti dielektrične konstante olj v frekvenčnem območju od 500 Hz do 1000 Hz in različnih temperaturah

sorta	ϵ' (500 Hz-1000 Hz)			
	20 °C	25 °C	35 °C	50 °C
Leccino	3,0859 ± 0,0011 ^{ab}	3,0618 ± 0,0016 ^b	3,0201 ± 0,0017 ^{ab}	2,9615 ± 0,0006 ^a
Belica	3,0692 ± 0,0036 ^b	3,0475 ± 0,0036 ^b	3,0050 ± 0,0026 ^b	2,9475 ± 0,0024 ^a
Črnica	3,0878 ± 0,0001 ^{ab}	3,0643 ± 0,0006 ^b	3,0226 ± 0,0009 ^{ab}	2,9626 ± 0,0001 ^a
Drobnica	3,0832 ± 0,0013 ^{ab}	3,0559 ± 0,0007 ^b	3,0134 ± 0,0006 ^{ab}	2,9568 ± 0,0017 ^a
Buga	3,1111 ± 0,0048 ^a	3,0961 ± 0,0015 ^a	3,0590 ± 0,0089 ^a	2,9829 ± 0,0063 ^a

Vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo (Dunconov test $\alpha = 0,05$)

Spreminjanje faktorja dielektričnih izgub s frekvenco ima za vsa olja podobno obliko. Vrednosti se pri nižjih frekvencah znižujejo, dokler ne dosežejo minimuma, nato se začnejo hitro povečevati in dosežejo maksimum pri največji frekvenci, spekter tvori približno obliko črke U. Po tem, kako visoka sta kraka črke U se analizirana olja razlikujejo od literaturnih podatkov. Lizhi in sod. (2008) so za ϵ'' dobili nekoliko drugačen trend. Njihova krivulja ima bolj izrazito obliko črke »U«. Tudi oni so ugotovili znižanje vrednosti ϵ'' z naraščajočo temperaturo.

**Slika 18:** Odvisnost faktorja dielektričnih izgub vzorcev olja od frekvence pri 25 °C in 50 °C

Tudi spreminjanje faktorja dielektričnih izgub, ϵ'' , s frekvenco je za analizirana olja precej različno. Spet predvsem odstopa olje sorte Buga. Razlike v spektru so večje pri 25 °C kot pri 50 °C. Pri 25 °C smo minimalno vrednost določili pri sorti Črnica 0,000785 in maksimalno vrednost Belici 0,0198. Pri višji temperaturi so se te vrednosti nekoliko znižale, tako je pri 50 °C dosegla Črnica minimum pri 0,000280 ter sorta Belica pri 0,00542. Pri višji temperaturi smo opazili tudi drugačen trend, vrednosti ne narastejo tako visoko kot pri nižjih temperaturah, manjše so razlike med rezultati ϵ'' med analiziranimi olji, izjema je Buga.

Pri Bugi smo pri vseh meritvah določili najvišje rezultate v primerjavi z ostalimi vzorci olja. Pri 25 °C smo določili maksimalno vrednost 1,0372, pri 50 °C vrednost 0,1305. Vsi rezultati za to olje so previsoki.

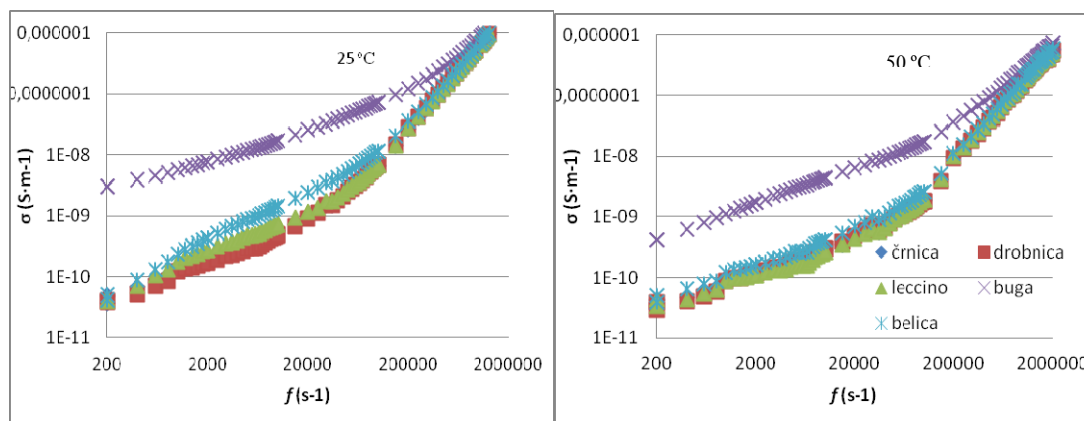
Za primerjavo vpliva sort olja in temperature na ϵ'' , smo izbrali vrednost ϵ'' pri 2 MHz in podatke zbrali v preglednici 18. Vidimo, da so vrednosti ϵ'' zelo podobne za vse sorte razen za Bugo ter da se ϵ'' znižuje s temperaturo. Tudi Lizhi in sod. (2008) so ugotovili znižanje vrednosti ϵ'' z naraščajočo temperaturo.

Preglednica 18: Faktor dielektričnih izgub olj pri 2 MHz in različnih temperaturah

sorta	ϵ'' , 2 MHz			
	20 °C	25 °C	35 °C	50 °C
Leccino	$0,0257 \pm 0,0199^a$	$0,0194 \pm 0,00008^b$	$0,0112 \pm 0,0000005^b$	$0,00514 \pm 0,00002^b$
Belica	$0,0259 \pm 0,0096^a$	$0,0198 \pm 0,0004^b$	$0,0116 \pm 0,0002^b$	$0,00542 \pm 0,000008^b$
Črnica	$0,0255 \pm 0,0161^a$	$0,0193 \pm 0,00006^b$	$0,0112 \pm 0,00006^b$	$0,00514 \pm 0,0003^b$
Drobnica	$0,0256 \pm 0,0111^a$	$0,0193 \pm 0,00008^b$	$0,0112 \pm 0,0001^b$	$0,00494 \pm 0,00015^b$
Buga	$0,0279 \pm 0,0731^a$	$0,0221 \pm 0,0004^a$	$0,0138 \pm 0,0011^a$	$0,00658 \pm 0,0007^a$

Vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo (Dunconov test $\alpha = 0,05$)

Specifična električna prevodnost OO je z naraščajočo frekvenco naraščala. Vsi vzorci imajo podoben trend in vrednosti, razen Buge. Pri 25 °C smo minimalno vrednost določili sorti Drobnica $9,9 \cdot 10^{-13}$ S/m pri najnižji frekvenci, enaki sorti smo določili minimalno vrednost tudi pri 50 °C, in sicer $1,7 \cdot 10^{-11}$ S/m. Maksimalno vrednost smo določili sorti Belica pri vseh temperaturah, pri 25 °C je ta znašala $2,2 \cdot 10^{-6}$ S/m pri največji frekvenci ter $9,3 \cdot 10^{-8}$ S/m pri 50 °C in največji frekvenci. Pri rezultatih specifične prevodnosti je vzorec Buga bil še najbolj podoben ostalim meritvam vzorcev, ampak vrednosti še vedno izstopajo in so previsoke, kar je iz slike 19 lepo razvidno. Tako smo pri 50 °C določili minimalno vrednost prevodnosti $1,8 \cdot 10^{-10}$ S/m in maksimalno vrednost $7,3 \cdot 10^{-7}$ S/m.



Slika 19: Odvisnost specifične električne prevodnosti vzorcev olja od frekvence pri 25 °C in 50 °C

V preglednici 19 smo zbrali vrednosti specifične električne prevodnosti OO pri najnižji frekvenci 400 Hz in pri različnih temperaturah. Pri vseh temperaturah smo določili najnižjo električno prevodnost pri teh pogojih olju Drobnice, sledijo Leccino, Črnica, Belica. V literaturi so podatki o prevodnosti olj zelo redki. Prevc in sod. (2013) so merili prevodnost 12 EDOO pri 20 °C in določili mediano 0,025 nS/m in povprečje na 0,042 nS/m, kar se

zelo dobro ujema z meritvami v preglednici 19, električna prevodnost odčitana iz slike v prispevku Corach s sodelavci (2014) je 0,1 nS/m.

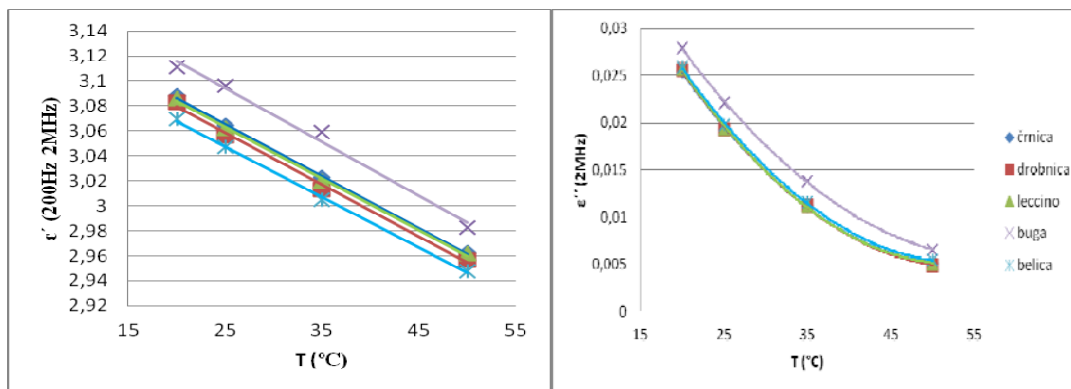
Iz Dunconovega testa lahko za izbrane parametre dielektričnih lastnosti oljčnih olj zapisane v preglednicah 17, 18 in 19 razberemo, da večina razlik ni statistično značilnih.

Preglednica 19: Specifična električna prevodnost olj pri 400 Hz in različnih temperaturah

sorta	σ (nS/m), 400 Hz			
	20 °C	25 °C	35 °C	50 °C
Leccino	0,054 ± 0,0199 ^a	0,071 ± 0,0070 ^b	0,066 ± 0,0131 ^a	0,044 ± 0,0075 ^a
Belica	0,075 ± 0,00096 ^a	0,087 ± 0,0283 ^b	0,090 ± 0,0764 ^a	0,066 ± 0,0373 ^a
Črnica	0,071 ± 0,0161 ^a	0,067 ± 0,0474 ^b	0,051 ± 0,0404 ^a	0,048 ± 0,0190 ^a
Drobnica	0,034 ± 0,0111 ^a	0,053 ± 0,0030 ^b	0,047 ± 0,0053 ^a	0,040 ± 0,0062 ^a
Buga	1,700 ± 0,9711 ^a	3,900 ± 0,7722 ^a	2,600 ± 0,5349 ^a	0,620 ± 0,7804 ^a

Vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo (Dunconov test $\alpha = 0,05$)

Dielektrična konstanta in faktor dielektričnih izgub so odvisni od temperature, kar so navedli številni avtorji (Lizhi in sod., 2008; Prevc in sod., 2013). Zato smo podatke o temperaturni odvisnosti dielektrične konstante in faktorja izgub prikazali na sliki 20. Potrdimo lahko, da se vrednosti ϵ' in ϵ'' z naraščajočo temperaturo znižujejo. Pri dielektrični konstanti je za opis spreminjanja s temperaturo (enačba 17) zadoščala že premica, ker je koeficient C enak nič. Za opis spreminjanja faktorja dielektričnih izgub od temperature smo izbrali polinom druge stopnje. Podatki za parametre so zbrani v preglednici 20, kjer lahko tudi vidimo, da ni velikih razlik med olji. Dielektrična konstanta se s temperaturo najbolj spreminja pri olju sorte Buga, najmanj se spreminja pri olju sorte Belica. Potrdimo lahko, da je pri meritvah dielektričnih lastnosti pomembno, da kontroliramo temperaturo in pri opisu dielektričnih lastnosti, da primerjamo podatke pri določeni temperaturi.



Slika 20: Dielektrična konstanta, ϵ' , v frekvenčnem območju od 200 Hz do 2 MHz in faktor dielektričnih izgub, ϵ'' , pri frekvenci 2 MHz za vsa olja v odvisnosti od temperature

Preglednica 20: Parametri premice za dielektrično konstanto ter parametri polinomske regresije drugega reda za faktor dielektričnih izgub za odvisnost parametra od temperature za vse vzorce olja

sorta	ϵ' (200 Hz-2 MHz)			ϵ'' (2 MHz)			
	A	- B·10 ⁻³	r	A	- B·10 ⁻³	C·10 ⁻⁵	r
Leccino	3,166	4,10	0,9993	0,058318	2,02	1,92	0,9967
Belica	3,149	4,05	0,9957	0,057725	1,97	1,84	0,9965
Črnica	3,169	4,15	0,9987	0,057537	1,99	1,88	0,9968
Drobnica	3,162	4,16	0,9899	0,057638	1,98	1,86	0,9973
Buga	3,202	4,31	0,9991	0,057501	1,80	1,56	0,9976

Pri faktorju dielektričnih izgub v odvisnosti od temperature smo pri skoraj vseh vzorcih določili podobne parametre polinomske regresije, le sorta Buga rahlo izstopa. ϵ'' se v odvisnosti od temperature najbolj spreminja pri olju sorte Leccino, najmanj se spreminja pri olju sorte Buga.

Prevc (2010) za sončnično olje z visoko vsebnostjo oleinske kisline prav tako opisuje največje spremembe ϵ'' pri 2 MHz pri temperaturah 20 °C in 30 °C ter manjše spremembe pri višjih temperaturah, kar se sklada z našimi rezultati. Največje spremembe ϵ'' so pri temperaturah 20 °C in 25 °C, ter najmanjše pri temperaturah 35 °C in 50 °C.

Specifična električna prevodnost olj, določena pri 400 Hz, v odvisnosti od temperature ima precej drugačen trend v primerjavi z ϵ' in ϵ'' . Kot vidimo v preglednici 20 vrednosti pri vseh oljih naraščajo z naraščajočo temperaturo do 25 °C ali 35 °C, odvisno od sorte, pri najvišji temperaturi te vrednosti padajo in pri večini olj doseže minimum pri 50 °C. To se ne sklada s podatki iz literature (Prevc in sod., 2013; Corach in sod., 2014), kjer se vidi, da električna prevodnost, določena pri frekvencah do 100 Hz z naraščajočo temperaturo narašča.

Lizhi in sod. (2010) so s pomočjo dielektrične spektroskopije ugotavljali potvorbe oljčnega olja. Ekstra deviškemu oljčnemu olju so dodali razna rastlinska olja, kot npr. sezamovo, repično, koruzno, sojino olje ter pripravili tri različne mešanice. Tem mešanicam so merili dielektrično konstanto pri 25 °C. Vrednost dielektrične konstante teh olj je linearno naraščala z večanjem koncentracije dodanega rastlinskega olja. Z metodo najmanjših kvadrantov in analizo glavnih komponent so ocenili, da bi za določanje dielektrične konstante lahko uporabili presejalni test potvorbe ekstra deviškega oljčnega olja z rastlinskimi olji.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Leto 2013 je bilo posebno leto z veliko padavinami spomladi, z dolgim sušnim in vročim poletjem ter jesenskimi padavinami, ki znatno vplivajo na dozorevanje oljk. Po dolgem sušnem obdobju so se plodovi zaradi jesenskih padavin napili vode, kar vpliva na obarvanje plodov, trdoto in oljevitost v laboratorijski oljarni. Velike količine vode vplivajo tudi na spiranje v vodi topnih snovi – biofenolov iz olja, kar lahko vpliva na slabšanje kakovosti OO (Vesel, 2013). Takšne vremenske razmere so vplivale tudi na sestavo plodov, v katerih smo določili višjo vsebnost vode in skladno s tem nižjo oljevitost oljk. Na sestavo plodov imajo največji vpliv vremenske razmere, starost dreves, sorta in zemljepisna širina. Zato je za natančno določitev podatkov potrebno večletno strokovno spremljanje in analiziranje oljk (Dabbou in sod., 2009).

Z našimi analizami smo tako v oljkah kakor tudi v olju določili naslednjo zastopanost MK: dominantna je oleinska kislina, s precej nižjo procentno zastopanostjo ji sledi palmitinska kislina, tej sledi linolna kislina, nato stearinska kislina, palmitoleinska kislina, linolenska kislina in kot najmanj zastopana je arahidinska kislina. Kemijska sestava OO, predvsem vsebnost nekaterih MK, je odvisna predvsem od zemljepisne širine. Znano je namreč, da vsebujejo olja južnih zemljepisnih širin drugačen okus in vonj zaradi višje vsebnosti nasičenih MK kot olja iz severnejših območij. Razmerje med nenasičenimi in nasičenimi MK je tako pri teh oljih višje in so zato težje prebavljiva. Prav tako vsebujejo višje število peroksidov, ki vplivajo na stabilnost (Sancin, 1990). Od tukaj sledi dejstvo, da bi z maščobno kislinsko sestavo olja lahko določili tudi geografsko poreklo (Gomez-Gonzalez in sod., 2011). Maščobno kislinska sestava je pomembna tako s prehranskega kot tudi s tehnološkega vidika, saj je od nje v veliki meri odvisna hitrost oksidacije triacilglicerolov tako v olju samem med skladiščenjem kot tudi v telesu po zaužitju (Bešter, 2007).

Različne fizikalno-kemijske analize lahko dajejo informacije o kakovosti OO. Z različnimi kemijskimi parametri, kot so kislost, PŠ, spektrofotometrijsko preiskavo v UV in senzoričnim ocenjevanjem, lahko olje uvrstimo v ustrezno kategorijo, pri čemer je potrebno upoštevati predpisano zakonodajo o mejnih vrednostih. V naši nalogi smo analizirali proste maščobne kisline in peroksidno število ter tako oljčno olje s kemijskimi analizami lahko uvrstili v kategorijo Ekstra deviško oljčno olje. S takimi hitri testi lahko na hiter način ugotovljamo kakovost in potvorjenost oljčnega olja.

Fenolne spojine so nedavno postale predmet številnih raziskav zaradi svojih terapevtskih lastnosti za razna rakava obolenja, delujejo antivirusno in protivnetno, znižujejo obolenost za hiperlipidemijo in hiperglikemijo. Fenolne spojine imajo vlogo antioksidantov in tako skrbijo za ohranitev kakovosti živila, preprečujejo staranje živila ter nudijo zaščito telesnim celicam pred oksidativnim stresom (Alu'datt in sod., 2013). Kemijska in biokemijska sestava oljk je pogojena z agronomskimi dejavniki – način kultivacije, sorta oljk, klimatski pogoji, namakalni sistemi (Gomez-Rico in sod., 2008). Spremembe v obarvanosti plodu so pogojene s spremembami vsebnosti polifenolov, povišano

koncentracijo antocianov in znižanjem koncentracije klorofila. Številni avtorji so spremljali vsebnost FS v različnih sortah. Tako so Jemai in sod. (2009) dokazali, da se vsebnost FS z dozorevanjem plodov spreminja. V zgodnji fazi dozorevanja je glavna komponenta FS oleuropein, ki se v kasnejših fazah znižuje zaradi razgradnje v hidroksitirozol. Povečanje koncentracije hidroksitirozola so pripisali tudi povečani aktivnosti hidrolitičnih encimov, zlasti glikozidaze in esteraze, ki katalizirajo hidrolizo oleuropeina. Tudi z našimi analizami smo pokazali razlike med sortami v plodovih in olju. Za enako sorto smo pokazali, da se zaradi vezave fenolov na membrano velik del fenolov iz plodov oljke ne prenese tudi v samo olje.

Vsem vzorcem smo določili antioksidativno učinkovitost, ta je pri različnih sortah oljk skoraj enaka. Pri vzorcih olja nekoliko bolj variira, zato lahko nekatere vzorce, kot npr. Črnico in Drobnico opredelimo za učinkovitejše pri lovljenju prostih radikalov. Oljčno olje vsebuje največ tokoferola oz. vitamina E, zato smo antioksidativni potencial določili troloksu, to je sintetični standard, ki se ga uporablja kot nadomestilo za tokoferol. Ugotovili smo, da ima olje sorte Črnica boljšo antioksidativno učinkovitost, s sorto Drobnica sta si zelo podobna. Ob primerjavi troloksa z vzorci oljk, smo pri vseh sortah določili boljšo učinkovitost. Naši rezultati dokazujejo, da sposobnost ekstraktov za lovljenje prostega radikala DPPH $\cdot$ ni v povezavi s koncentracijo FS, kot so to ugotovili avtorji Baiano in sod. (2014).

Dielektrične lastnosti živil so odvisne od uporabljene frekvence, temperature, vsebnosti vlage, gostote, sestave in strukture živila (Venkatesh in Reghavan, 2004). S spremljanjem dielektričnih lastnosti lahko določimo kvaliteto in potvorjenost živil ter tudi kontaminiranost in oksidacijo olj. Poskusili smo določiti dielektrične lastnosti plodovom oljk, vendar nam je največjo težavo predstavljalo polnjenje poltrdega vzorca strtega mesa oljk v rezo med elektrodama. Plodovi oljk vsebujejo poleg vode in maščob tudi precej mineralnih, ionskih snovi, ki pri stiskanju plodov ostajajo v pogači in soku in ne prehajajo v (nepolarno) olje. Obnašanje strtega mesa oljk v izmeničnem električnem polju lahko opišemo predvsem z realnim delom impedance, upornostjo, saj je prispevek imaginarnega dela le okrog 3 %. Pri merjenju dielektrične konstante in faktorja dielektričnih izgub se pozna ionski prispevek pri oblikovanju plasti, zato smo tudi dobili precej višje vrednosti. Naše analize niso dovolj specializirane za določitev dielektričnih lastnosti plodovom oljk, potrebne bi bile nadaljnje raziskave. Dielektrične lastnosti olja se že dolgo uporablja za določanje stopnje razgradnje olja pri cvrtju, saj so ugotovili, da je dielektrična konstanta olja odvisna od količine polarnih komponent, ki nastajajo v olju pri višjih temperaturah ob prisotnosti vlage in živil. Modernejše raziskave kažejo, da je dielektrična konstanta olja odvisna od maščobno kislinse sestave olja. Olja z višjim deležem linolenske kisline imajo višjo dielektrično konstanto kot olja z višjim deležem oleinske kisline (Lizhi in sod., 2008; Lizhi in sod., 2010). Vrednosti dielektrične konstante olja so med 3,069 in 3,111 pri 20 °C in se z naraščajočo temperaturo znižujejo s faktorjem 0,13 % na 1 °C. Najvišjo vrednost dielektrične konstante ali plato, kot ga imenujejo nekateri avtorji, smo določili kot povprečje meritev med 500 in 1000 Hz in je med sortami različna. Vrednosti dielektrične konstante smo primerjali z vsebnostjo oleinske kisline in ugotovili pri olju sorte Buga najvišjo vrednost dielektrične konstante (3,111) in najvišjo vsebnost oleinske kisline (80,8 %), pri olju z najnižjo vsebnostjo oleinske kisline (Črnica, 78,7 %) smo določili srednjo vrednost dielektrične konstante. Povezave med vsebnostjo oleinske kisline in

dielektrično konstanto nismo ugotovili. Spreminjanje faktorja dielektričnih izgub s frekvenco je za vzorce olja precej različno. Naši podatki se nekoliko razlikujejo od podatkov iz literature. Določitev faktorja izgub je povezana s slabo ponovljivostjo, zato Dunconov test pokaže, da so razlike med vzorci zanemarljive. Tako kot Lizhi in sod. (2008) smo ugotovili znižanje vrednosti faktorja dielektričnih izgub z naraščajočo temperaturo, zato je tekom meritev potrebno nadzorovati temperaturo. Pri specifični električni prevodnosti se vzorci olja med sabo še najbolj ujemajo. Električna prevodnost oljčnega olja je nizka in znaša 0,034 in 0,071 nS/m.

5.2 SKLEPI

- Vsebnost vode in vsebnost maščobe se je razlikovala med sortami v majhnem rangi, hipoteza je potrjena. Določili smo nekoliko višje vrednosti za vsebnost vode in posledično nižjo oljevitost oljk.
- Hipoteza o variaciji maščobno kislinske sestave oljčnega olja drži. Večja nihanja med sortami zaznamo pri plodovih oljk v primerjavi z olji.
- Oljčna olja se značilno razlikujejo v vsebnosti prostih maščobnih kislin in peroksidnim številom. Z obema parametroma lahko opredelimo olje kot zelo kakovostno ekstra deviško oljčno olje.
- Vsebnost skupnih fenolov se s predelavo iz oljke v olje za isto sorto spreminja. Oljkam smo določili višje vrednosti skupnih fenolov, kot iz njih iztisnjenemu olju. Lahko potrdimo tudi hipotezo, da vsebuje oljčno olje sorte Belica najvišjo vsebnost fenolov.
- Vsem vzorcem smo določili antioksidativno učinkovitost in hkrati potrdili hipotezo, da se antioksidativni potencial med sortami razlikuje tako pri oljkah kakor tudi pri olju ter znotraj enake sorte med plodom in oljem.
- Električne lastnosti strtega mesa oljk odražajo bolj prevodnost kot dielektričnost. Prevodnost je med 0,50 in 0,73 S·m⁻¹. Statistično značilno se razlikuje samo sorta Leccino.
- Dielektrični spekter olja v frekvenčnem območju 20 Hz do 2 MHz je različen pri različnih sortah. Potrdili smo hipotezo, da so dielektrične lastnosti oljčnih olj odvisne od temperature in frekvence.

6 POVZETEK

V magistrski nalogi smo petim vzorcem in iz njih iztisnjenega oljčnega olja iz območja Goriške opravili kemijske in dielektrične analize. S pridobljenimi rezultati lahko potrdimo vse zastavljene hipoteze. Vsem vzorcem se tako znotraj sort, kakor tudi med samo predelavo iz plodov v olje vrednosti spreminjajo.

Pri določitvi sestave oljk so rezultati o vsebnosti vode v plodovih dosegli vrednosti od 61,3 % pri Belici do 68,4 % pri Črnici ter vrednosti za vsebnosti maščob pri Belici od 38,7 %, do 31,6 % pri Črnici. Na sestavo plodov, njihovo trdoto in zrelost vplivajo tudi padavine oz. prisotnost vode v tleh. Deževna obdobja v jesenskem času in urejen namakalni sistem so vplivali na višjo vsebnost vode v plodovih in posledično nižjo oljevitost.

Maščobno kislinsko sestavo plodov in olja smo določali kot metilne estre maščobnih kislin. Koncentracije posameznih MEMK v vzorcu smo določili s plinsko kromatografijo. Vsebnost posameznih maščobnih kislin, predvsem oleinske kisline v EDOO je v tesni povezavi z zemljepisno širino. Znano je, da je v severnejših oljih več oleinske kisline, kar smo z našimi analizami tudi potrdili. Pri oljkah se vsebnost giblje od 74,36 do 81,30 g MK/100 g MK, pri olju od 78,65 do 80,85 g MK/100 g MK pri sorti Buga. Sestava MK je ugodna in podaja rezultate o zastopanosti nasičenih, manj zaželenih MK in nenasičenih, zaželenih MK. Podatki o maščobno kislinski sestavi olja nam podajo veliko informacij o samem izvoru olja, pomembni so tudi tako s prehranskega kakor tudi s tehnološkega vidika. Vsebnost MK, naj bi bila odvisna tudi od klimatskih pogojev v korelaciji z genetskimi dejavniki, na zastopanost posameznih MK, naj bi vplivale tudi faze zorenja oljk.

S pomočjo ekstraktov oljk in olja smo določili tudi skupne fenolne spojine in antioksidativno učinkovitost. Vsebnost FS smo določili s FC reagentom in tako v oljkah določili od 2,95 mg/g oljk do 6,64 mg/g oljk pri Črnici, v olju od 0,197 mg/g olja do 0,349 mg/g olja pri vzorcu Belica. Vsebnost FS se tekom predelave za isto sorto oljke in olja spreminja, zaradi kemijskih reakcij med samo predelavo. Antioksidativno učinkovitost smo določili z ekstraktom olja in oljk z DPPH[•] metodo. Tako smo vsem vzorcem določili sposobnost lovljenja prostih radikalov. Za najuspešnejšo se je pri oljkah izkazala sorta Drobnica z $k = -10,4 \text{ mL}/\mu\text{g}$ in $\text{ED}_{50} = 4,81 \mu\text{g/mL}$, medtem ko smo pri olju kot najuspešnejše določili olje Črnice z $k = -9,69 \text{ mL}/\mu\text{g}$ in $\text{ED}_{50} = 5,16 \mu\text{g/mL}$. Med sortami ni linearne povezanosti za AU, variira tudi AU med oljkami in oljem iste sorte.

Samemu olju smo določili tudi proste maščobne kisline in peroksidno število. S tem smo pokazali, da olje vsekakor spada v kategorijo EDOO, saj smo določili precej nizke vrednosti obeh parametrov. Najvišjo vrednost prostih maščobnih kislin smo določili pri sorti Belica, in sicer 0,1324 %. Najvišjo določeno vrednost PŠ smo določili olju Leccino (3,2818 mmol O₂/kg olja). Iz opravljenih analiz in dobljenih podatkov, bi lahko rekli, da je takšno OO bilo iztisnjeno iz kakovostnih plodov in je primerno za daljše hranjenje pri skladiščnih pogojih.

Dielektrične lastnosti oljk in olju smo določili s kapacitivno metodo. Plodovi oljke vsebujejo precej ionskih snovi, zato je za pasto iz plodov bolj značilna prevodnost kot dielektričnost. Električna prevodnost paste iz plodov je neodvisna od frekvence in različna za različne sorte ter znaša med 0,50 in 0,73 S/m.

Pri oljčnem olju smo pokazali odvisnost dielektrične konstante od temperature in frekvence, tako so najvišje vrednosti ϵ' pri temperaturi 20 °C ter najmanjši frekvenci in se s povečanjem temperature in frekvence znižujejo. Za sorto Buga smo pri ϵ' zaznali precej drugačen trend od ostalih olj. Faktor izgub se nekje do frekvence 100 kHz najprej znižuje, odvisno od sorte in temperature, nato začne postopoma naraščati in doseže maksimum pri največji frekvenci. Pri določanju faktorja dielektričnih izgub smo dobili precej raznolike rezultate. Najnižje rezultate smo določili pri najnižji temperaturi, ϵ'' se z večanjem temperature povečuje.

Specifična prevodnost OO v odvisnosti od frekvence ima pri vseh sortah in temperaturah enako obliko krivulje, le vrednost se rahlo zmanjša z večanjem temperature. Pri vseh sortah se specifična prevodnost olja povečuje in doseže maksimum pri največji frekvenci. Specifična prevodnost ni na nek značilen način odvisna od temperature.

7 VIRI

- Agilent Technologies. 2000. Agilent 16452A liquid test fixture operation and service manual. 3rd ed. Kobe, Agilent Technologies: 48 str.
- Alu'datt M. H., Rababah T., Ereifej K., Alli I. 2013. Distribution, antioxidant and characterization of phenolic compounds in soybeans, flaxseed in olives. Food Chemistry, 139: 93-99
- AOAC official method 965.33. Peroxide value of oils and fats. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC international. Cuniff P. (ed.). Vol. 2. 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 41: 9B – 9B
- Baiano A., Terracone C., Viggiani I., Nobile del M. A. 2014. Changes produced in extra virgin olive oils from cv. Coratina during a prolonged storage treatment. Czech Journal of Food Science, 32, 1: 1-9
- Bandelj D., Arbeiter A. B., Bešter E., Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Čalijski D., Hladnik M., Hladnik T., Kanjir Ž., Levanič T., Mazi Ž., Višnjevica A. M., Podgornik M., Valenčič V., Volk S. 2014. ABC o 'Istrski belici'. Koper, Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Jadranski čezmejni program IPA: 18 str.
- Bengana M., Bakhouch A., Lozano-Sanchez J., Amir Y., Youyou A., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. 2013. Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra virgin olive oil. Food Research International, 54, 2: 1868-1875
- Bešter E. 2007. Oksidacijska stabilnost ekstra deviških olj Slovenske Istre. Doktorska disertacija. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 122 str.
- Bešter E., Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Čalijski D., Miklavčič V. A., Valenčič V., Volk S. 2014. ABC o oljčnem olju. Koper, Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče: 18 str.
- Bianco D., Castelluccio M. D., Conte L., Knez S., Miklavčič M., Mozetič B., Parmagiani P., Prinčič D., Scarbolo E., Sivilotti P., Vesel V., Vrščaj B. 2014. Uelije II – oljčno olje. Simbol kakovosti v čezmejnem prostoru. [S. l.], Deželna agencija za razvoj podeželja - ERSA: 360 str.
- 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
- Bratović M., Sraka M., Prgomet Ž. 2012. Gnojenje oljk. V: Trajnostni razvoj oljkarstva z zmanjšano porabo fitofarmacevtskih sredstev in hranil. Mrzlič D. (ur.). Nova Gorica, KGZS - Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica: 39-47

- Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Jančar M., Sotlar M., Vesel V. 1997. Oljka in oljčno olje. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 143 str.
- Bučar-Miklavčič M., Bešter E., Butinar B., Čalijski D., Volk S., Valenčič V. 2010. ABC o oljčnem olju. Koper, Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče: 18 str.
- Burcu A. A., Ozen B., Tokatli F., Sen I. 2014. Comparison of some chemical parameters of a naturally debittered olive (*Olea europaea* L.) type with regular olive varieties. Food Chemistry, 161: 104-111
- Condelli N., Caruso M. C., Galgano F., Russo D., Milella L., Favati F. 2015. Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the mediterranean area. Food Chemistry, 177: 233-239
- Corach J., Sorichetti P. A., Romano S. D. 2014. Electrical properties of vegetable oils between 20 Hz and 2 MHz. International Journal of Hydrogen Energy, 39: 8754-8758
- Dabbou S., Rjiba I., Nakbi A., Gazzah N., Issaoui M., Hammami M. 2009. Compositional quality of virgin olive oils from cultivars introduced in Tunisian arid zones in comparison to Chemlali cultivars. Scientia Horticulturae, 124: 122-127
- Gomez-Gonzalez S., Ruiz-Jimenez J., Luque de Castro M. D. 2011. Oil content and fatty acid profile of spanish cultivars during olive fruit ripening. Journal of the American Oil Chemists' Society, 88, 1: 1737-1745
- Gómez-Rico A., Fregapane G., Salvador M. D. 2008. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. Food Research International, 41, 4: 433-440
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists' Society, 58, 11: 966-968
- ISO 660. Animal and vegetable fats and oils – Determination of acid value and acidity. 3rd ed. 2014: 9 str.
- Jemai H., Bonaziz M., Sayadi S. 2009. Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 2961-2968
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. dop. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 239 str.
- http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf
(18. feb. 2015)

- Lizhi H., Toyoda K., Ihara I. 2008. Dielectric properties of edible oils and fatty acids as a function of frequency, temperatura, moisture and composition. *Journal of Food Engineering*, 88: 151-158
- Lizhi H., Toyoda K., Ihara I. 2010. Discrimination of olive oil adulterated with vegetable oils using dielectric spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 96: 167-171
- Lopez-Villalta C., Munos-Cobo P. L. M. 1996. Production techniques. V: *World olive encyclopedica*. Madrid, World Olive Council: 180-181
- Malanowski. S., Patz. R., Ratzsch. M. T., Wohlfarth C. 1979. Dielectric, electro-optical and thermodynamic investigation of binary-mixtures formed by pyridine with hydrocarbons and chlorobenzene. *Fluid Phase Equilibria*, 3: 291-312
- Manzin V. 2010. Vsebnost fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost ekstraktov listov in plodov oljke (*Olea europaea* L.). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 51 str.
- Marangon F., Troiano S., Visintin F. 2007. Ocena pomembnosti vnosa oljkarstva v podeželsko krajino Furlanije Julijske Krajine (vzhodno gričevje Furlanije Julijske krajine in Italijanska Brda) ter Slovenije (Goriška Brda), gledano s finančnega vidika. V: *Oljka v zgodovini, krajini in gospodarstvu na območju Brd in vzhodnega gričevja Furlanije Julijske krajine: ohranitev in razvoj*. Gentilini S. (ur.) 1. izd. Gorica, Deželna agencija za podeželski razvoj – ERSA: 78-105
- Merljak M., Jakob Merljak P. 2014. *Olja za prehrano, zdravje in nego telesa*. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 202 str.
- Midmore B. R., Hunter R. J., O'Brien R. W. 1987. The dielectric response of concentrated lattices. *Journal of Colloid and Interface Science*, 120, 1: 210-217
- Oljčno olje. 2015. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 1 str.
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/oljčno_olje/
(16. nov. 2014)
- Pandolfi S., Scarbolo E., Parmegiani P., Paoletti A., Baldoni L., Cultrera G. M. N., Mariotti R., Martellossi M. 2007. Karakterizacija genomov oljke v Furlaniji Julijski krajini in Goriških Brdih. V: *Oljka v zgodovini, krajini in gospodarstvu na območju Brd in vzhodnega gričevja Furlanije Julijske krajine: ohranitev in razvoj*. Gentilini S. (ur.) 1. izd. Gorica, Deželna agencija za podeželski razvoj – ERSA: 18-74
- Park P. W., Goins R. E. 1994. *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59: 1262-1266
- Parmegiani P., Scarbolo E. 2007. Oljkarstvo na območju Goriških Brd in vzhodnega gričevja Furlanije Julijske krajine (agronomski vidik). V: *Oljka v zgodovini, krajini in gospodarstvu na območju Brd in vzhodnega gričevja Furlanije Julijske krajine:*

- ohranitev in razvoj. Gentilini S. (ur.). 1. izd. Gorica, Deželna agencija za podeželski razvoj – ERSA: 10-15
- Patumi M., Andria di R., Marsilio V., Fontanezza G., Morelli G., Lanza B. 2002. Olive and olive oil quality after intensive monocone olive growing (*Olea Europaea* L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes. Food Chemistry, 77,1: 27-34
- Podbersič R. 2004. Zgodovina oljkarstva na Goriškem. V: Oljkarstvo na Goriškem. Podbersič R. (ur.). Nova Gorica, Goriško oljgarsko društvo, Društvo oljkarjev Brda: 9-39
- Pravilnik o oljčnem olju. 1999. Uradni list Republike Slovenije, 9, 30: 3469-3500
- Prevc T. 2010. Povezava dielektrične konstante in maščobnih števil modelnih liidnih sistemov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67 str.
- Prevc T., Cigić B., Vidrih R., Poklar Ulrih N., Šegatin N. 2013. Correlation of basic oil quality indices and electrical properties of model vegetable oil systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 11355-11362
- Sancin V. 1990. Velika knjiga o oljki. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 319 str.
- Slokar N. 2010. Kvantitativna in kvalitativna analiza fenolnih spojin ter antioksidativni učinek ekstraktov oljčnega olja. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63 str.
- Sosa-Morales M. E., Valerio-Junco L., Lopez-Malo A., Garcia H. S. 2010. Dielectric properties of foods: Reported data in 21st century and their potential applications. Food Science and Technology, 44, 8: 1169-1179
- Uredba komisije (EU) št. 432/2012 z dne 16. maja 2012 o seznamu dovoljenih zdravstvenih trditev na živilih, ki se nanašajo na zmanjšanje tveganja za nastanek bolezni ter na razvoj in zdravje otrok. 2012. Uradni list Evropske Unije, L 136: 1-40
- Vakiari S. A., Papadopoulou R., Koutsaftakis A. 2002. Comparison of different olive oil extraction systems and the effect of storage conditions on the quality of the virgin olive oil. Grasas Aceites, 53: 324-329
- Venkatesh M. S., Raghavan G. S. V. 2004. An overview of microwave processing and dielectric properties of agri – food materials. Biosystems Engineering, 88, 1: 1-18
- Vesel V., Valenčič V., Jančar M., Čalijski D., Butinar B., Bučar-Miklavčič M. 2009. Oljka – živilo, zdravilo, lepotilo. Ljubljana, Založba Kmečki glas: 141 str.

Vesel V. 2012. Oljčno olje in njegova kakovost. V: Trajnostni razvoj oljkarstva z zmanjšano porabo fitofarmacevtskih sredstev in hranil. Mrzlić D. (ur.). Nova Gorica, KGZS – Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica: 49-58 str.

Vesel V., Markočič A. 2012. Določanje časa obiranja oljk (*Olea Europaea* L.) sort 'Istrska belica' in 'Leccino' na podlagi različnih parametrov. V: Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu. Koper, Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Univerzitetna založba Annales: 33-45

Vesel V. 2013. Dozorevanje oljk 2013. Nova Gorica, KGZS – Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica: 12 str.

http://www.kmetijskizavod-ng.si/priponke/Nasveti/Oljkarstvo/dozorevanje_oljk_2013-12-05.pdf (10. jan. 2015)

Vrhovnik I., Prgomet Ž. 2011. Oljkarstvo. V: Sredozemsko kmetijstvo v sožitju z naravo. Mrzlić D. (ur.). Nova Gorica, KGZS – Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica: 9-22

Xueqi L., Zhu H., Shoemaker C. F., Wang S. C. 2014. The effect of different cold storage conditions on the compositions of extra virgin olive oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 91, 9: 1559-1570

Yorulmaz A., Erinc H., Tekin A. 2013. Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. Journal of the American Oil Chemists' Society, 90: 647-658

ZAHVALA

Za strokovno vodenje in pomoč se zahvaljujem doc. dr. Nataši Šegatin s Katedre za biokemijo in kemijo živil na Biotehniški fakulteti.

Za somentorstvo se zahvaljujem doc. dr. Rajku Vidrihu s Katedre za tehnologijo, prehrano in vino na Biotehniški fakulteti.

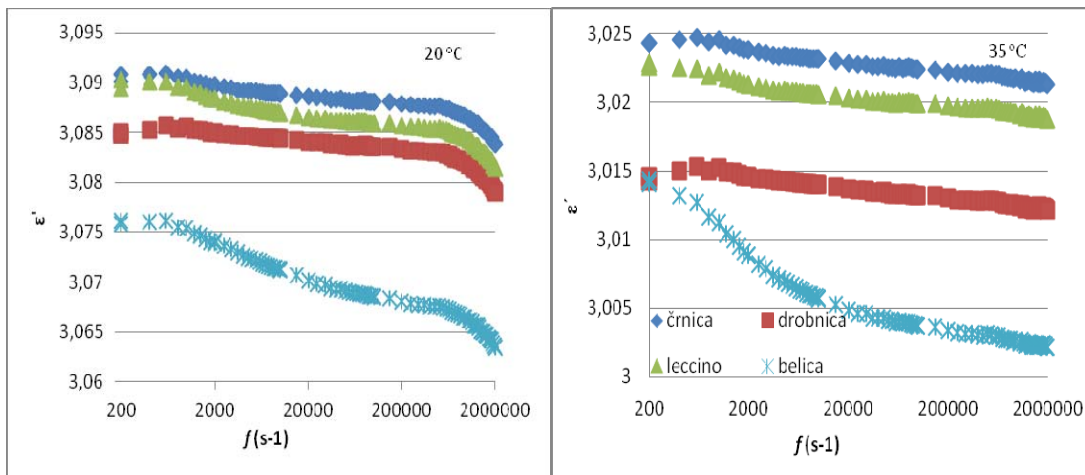
Za recenzije se zahvaljujem doc. dr. Tomažu Polaku s Katedre za tehnologijo mesa in vrednotenje živil na Biotehniški fakulteti.

Zahvaljujem se tudi vsem tehničnim delavcem ter vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi magistrske naloge.

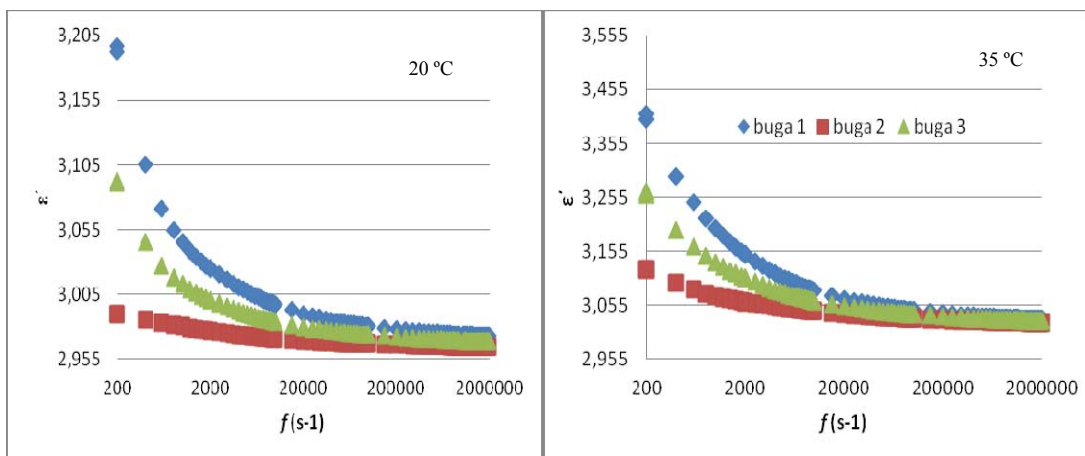
Zahvaljujem se tudi Zarjanu Drnovšek za podarjene oljke in oljno olje sorte Drobница.

Velika zahvala gre seveda Kristijanu in celotni družini, ki so me spodbujali, nudili oporo in razumevanje tekom študija.

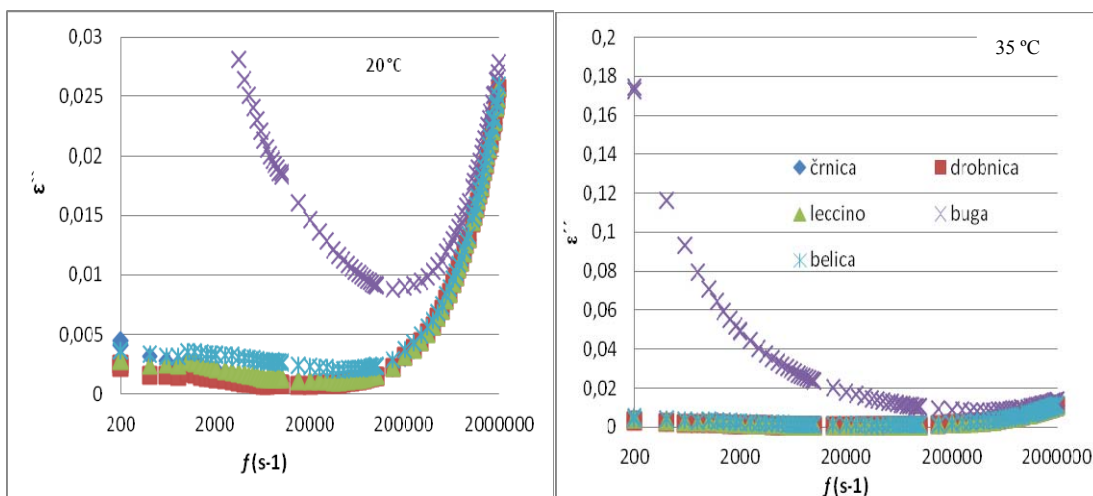
PRILOGE



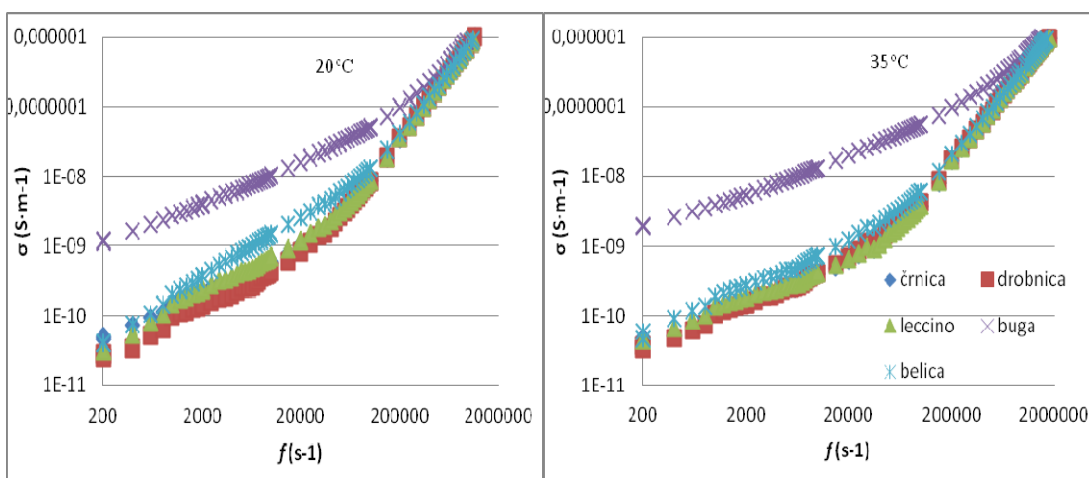
Priloga A: Dielektrične konstante vzorcev olja sorte Črnica, Drobnica, Leccino in Belica v odvisnosti od frekvence pri 20 °C in 35 °C



Priloga B: Dielektrične konstante vzorca olja Buga v odvisnosti od frekvence pri 20 °C in 35 °C



Priloga C: Faktor dielektričnih izgub vzorcev olja v odvisnosti od frekvence pri 20 °C in 35 °C



Priloga D: Specifična električna prevodnost vzorcev olja v odvisnosti od frekvence pri 20 °C in 35 °C