

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Anamarija Barberić

**POLIFENOLI U SORTNIM MASLINOVIM ULJIMA
IZ ISTRE**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2006.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Studij: BILINOGOJSTVO
Usmjerenje: VOĆARSTVO, VINOGRADARSTVO I VINARSTVO

Anamarija Barberić

**POLIFENOLI U SORTNIM MASLINOVIM ULJIMA
IZ ISTRE**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj diplomskog rada:

Dr. sc. Zoran Šindrak

Zagreb, rujan 2006.

Ovaj diplomski rad ocjenjen je i obranjen

dana

ocjenom

pred povjerenstvom u sastavu:

1. Dr. sc. Zoran Šindrak
2. Prof. dr. sc. Đani Benčić
3. Doc. dr. sc. Marija Bujan

Polifenoli u sortnim maslinovim uljima iz Istre

Sažetak

Maslina je jedna od onih biljaka o čijoj kultivaciji postoje arheološki dokazi i zapisi sa samih početaka civilizacije na području blistog istoka i Mediterana. Razlog tome je skromnost ove biljke, koja može uspijevati i na škrtim tlima u uvjetima suše, a od nje se mogu koristiti lisna masa, drvo, plodovi i ulje dobiveno iz njih. Zato su maslina i maslinovo ulje tijekom povijesti stekli poseban, mitski i religijski, status među kultiviranim biljem i prehrambenim namirnicama. U današnje vrijeme popularnost maslinovog ulja je veća nego ikada prije, što se može zahvaliti suvremenim spoznajama o njegovoj prehrambenoj vrijednosti i pozitivnom učinku na ljudsko zdravlje.

Danas je uzgoj masline većinom komercijaliziran, pa se provode brojna istraživanja u cilju dobivanja što većih prinosa, ali i što kvalitetnijih i prepoznatljivih proizvoda.

U ovom istraživanju proučavao se utjecaj sorte i proizvodnog područja (klimatskih prilika) na udio ukupnih fenolnih tvari u uljima tri sorte masline (Bjelica, Buža i Leccino). U odnosu na druge dvije sorte ulja dobivena od plodova Bjelice općenito imaju veći udio fenolnih tvari. Osim toga, u sušnoj godini ulja svih sorti imala su nekoliko puta veće udjele fenolnih tvari nego u kišnoj godini.

Ključne riječi: Maslina (*Olea europaea* L.), sorte, agroekološki uvjeti, maslinovo ulje, fenolne tvari

Polyphenols in varietal olive oils from Istria

Summary

Olive tree is one of those plants about which cultivation exist a numerous archaeological evidences and written notes from the very beginning of the Near East and Mediterranean civilisations. The reason for this is a modesty of this plant, which could grow on poor soils in dry climates. Besides, the foliage, wood, fruits and theirs oil, can be used of the olive. For these reasons olive tree and its oil obtain a special, mythic and religious, status among cultivated plants and foodstuffs. At the present time the popularity of olive oil is higher then ever before thanks to modern knowledge about its nutrition value and beneficial influence on human health.

Olive growing is nowadays mostly commercialized, and numerous investigations are conducting with goal to obtaining as much as possible higher yields, but also for creating even better and more recognizable products.

In this research influence of variety and production area (climatic conditions) on total phenol content in three varieties (Bjelica, Buža and Leccino) oils has been investigated. In relation to oils obtained from the variety Bjelica drupes generally had higher content of phenolic compounds. Besides, in the dry year oils of all varieties had few-fold higher contents of total phenolic compounds then oils of rainy year.

Keywords: Olive (*Olea europaea* L.), olive varieties, agro-ecologic conditions, olive oil, phenolic compounds

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1. Biološka svojstva masline | 1 |
| 1.2. Botanička klasifikacija i sorte maslina | 2 |
| 1.3. Povijest uzgoja masline | 2 |
| 1.4. Proizvodnja i potrošnja maslinovog ulja u svijetu | 4 |
| 2. Cilj istraživanja | 7 |
| 3. Pregled literature | 8 |
| 3.1. Fenolne tvari u plodovima i uljima masline | 8 |
| 3.2. Utjecaj sorte i agroekoloških (elaioekoloških) čimbenika na udio fenolnih tvari | 10 |
| 3.3. Maslinovo ulje u prehrani i njegov utjecaj na ljudsko zdravlje | 12 |
| 4. Materijali i metode | 14 |
| 4.1. Materijali | 14 |
| 4.1.1. Sorte maslina | 14 |
| 4.1.2. Proizvodna područja | 14 |
| 4.1.3. Oborine | 15 |
| 4.1.4. Određivanje indeksa zrelosti i berba uzoraka maslina | 16 |
| 4.2. Metode | 17 |
| 4.2.1. Ekstrakcija ulja iz plodova maslina | 17 |
| 4.2.2. Kemijske analize osnovnih pokazatelja kakvoće ulja | 18 |
| 4.2.3. Ekstrakcija i određivanje ukupnih fenolnih tvari | 19 |
| 4.2.4. Biometrička obrada podataka | 20 |
| 5. Rezultati i rasprava | 21 |
| 5.1. Rezultati mjerenja osnovnih pokazatelja kakvoće maslinovih ulja | 21 |
| 5.1. Ukupne fenolne tvari maslinovih ulja | 21 |
| 6. Zaključci | 24 |
| 7. Literatura | 25 |

1. Uvod

1.1. Biološka svojstva masline

Maslina je zimzelena drvenasta biljka, koja može narasti do visine između 3 i 13 m. Korijenje je savijeno i s puno površinskih razgranjivanja, koja obavljaju veći dio aktivnosti upijanja hrane. Korijen masline se šire vodoravno, a većina se nalazi relativno plitko (1.0 - 1.5 m) u površinskom sloju tla, a opseg njegovog rasprostiranja može sezati dvije do tri visine biljke.

Kora debla masline je izvana sivo-zelene boje, a glatka je do oko desete godine. Kasnije deblo postaje kvrgavo, savijeno, naborane kore s dubokim brazdama, te poprima tamnu, skoro crnu boju. Listovi, u prosjeku dugački 5 do 8 cm, ovalno kopljastog oblika, na izboju su smješteni nasuprotno. Mladi listovi imaju 'živu' zelenu boju, a starenjem poprimaju zagasitu zelenu – maslinastu boju. Ovisno o sorti, naličje listova može biti manje ili više srebrnasto, što može imati krajobraznu i ukrasnu vrijednost. Listovi, u prosjeku, traju oko tri godine. Cvjetovi su mali, dvospolni, bijelo zelenkaste boje i pojavljuju se u resama, grozdovima. Za vrijeme cvatnje u travnju-lipnju (ovisno o klimatskim prilikama) odišu karakterističnim mirisom.

Plod masline je mesnata koštunica, ovalnog oblika, koja se počinje razvijati tijekom ljeta, te krajem rujna ulazi u fazu zrelosti, to jest počinje njegovo zrenje koje se očituje promjenom boje njegove pokožice (epikarpa) – od zelene prema ljubičastoj, pa sve do crne. Do potpune zrelosti ploda (tzv. fiziološke zrelosti), ovisno o klimatskim prilikama i svojstvima sorte, dolazi između studenog i ožujka. Ulje se u plodu počinje nakupljati već tijekom ljeta, za vrijeme njegova rasta, postičući najveći udio kad maslina poprimi svoju najintenzivniju boju.

1.2. Botanička klasifikacija i sorte maslina

Maslina (uljika, ulika), *Olea europaea* L. (*Olea sativa* Hoffm. et Link), spada u red *Oleales*, porodicu *Oleaceae*, podporodicu *Oleoideae*, i rod *Olea*, (Erhardt *et al.*, 2000), uvrštavaju porodicu *Oleaceae* u red *Scrophulariales*.

Neki od značajnijih i poznatijih rodova koji također spadaju u porodicu *Oleaceae* su *Fraxinus* (jasen), *Forsythia* (forzicija) i *Ligustrum*, L. (kalina).

Rod *Olea* obuhvaća oko 300 vrsta koje su rasprostranjene po Africi, Aziji, Americi, Oceaniji, Europi (Loussert et Brousse, 1978). Najvažnija među njima je mediteranska maslina. Zohary i Hoppf (1994), uvrštavaju kultivirane genotipove (sorte) maslina, u *Olea europaea* L., subsp. *sativa* (syn. *Olea europaea* L. var. *sativa* L.). U mediteranskom bazenu u divlje oblike masline, za koje se koristi naziv masline "Oleaster", ubrajaju se *O. europaea* L. subsp. *oleaster*, Hoffm. et Link. Masline *oleaster* se od kultiviranih razlikuju po manjim plodovima, tanjem mezokarpu, i manjem udjelu ulja.

S obzirom na namjenu razlikujemo tri osnovne skupine sorti maslina:

- sorte za dobivanje ulja: Buža, Bječiva, (Istarska Bjelica), Leccino i druge,
- sorte za konzerviranje (stolne masline): Ascolana tenera, Manzanilla, Santa Caterina,
- sorte za kombiniranu uporabu: Obica, Ascolana semitenera, Itrana, Picholine...

1.3. Povijest uzgoja masline

Ljudi su maslinu poznavali i koristili već u mlađem kamenom dobu. Najstariji ostaci masline (vrčevi za čuvanje maslinovog ulja, pougljenjeno drvo i koštice) datiraju od prije 8000 godina, a pronađeni su u palestinskom gradu Jerihonu.

Osim toga, pouzdano se zna da je prije 4000 godina, maslina bila uzgajana u Mezopotamiji i Siriji. Arheološki nalazi pouzdano dokazuju da je uzgoj masline na Starom Istoku postojao barem 3500 godina prije Krista.

Prvi zapisani podaci o maslini dolaze iz Zakonika najvećeg babilonskog kralja Hamurabija, koji je živio između 1792. i 1750., godine prije Krista. Taj tekst (najstariji napisani izbornik zakona) sadrži oko 282 odredbe i jedno čitavo poglavlje posvećeno trgovini uljem.

Maslina se počela širiti iz Male Azije i Sirije, odakle su je Feničani (koji su napravili najstariji prikaz masline na jednom muralu koji potječe iz 1350 godine prije Krista) i njima susjedni narodi donosili u različite predjele Mediterana, gdje je cvala njihova trgovina. S afričkih obala prevozili su ulje na Sardiniju i u Španjolsku, a iz Fenicije su ga dovozili u Grčku, Tursku i Kretu (gdje su bili pronađeni dokazi o orezivanju masline koji potječu iz razdoblja između 3500. i 2100. g. pr. Krista), te u Kartagu, od kuda je maslina stigla sve do Portugala.

Na Siciliji su pronađene posude ukrašene maslinovim listovima, koje potječu iz 14.-13. st. pr. Krista. Osim toga, novija otkrića maslinovih koštica, te ostataka keramičkih posuda za ulje u sjevernoj Kalabriji iz jonskog razdoblja, upućuju na to da su se u Italiji masline uzgajale u razdoblje između 1200. i 1100. godine prije Krista. Sve to navelo je arheologe na mišljenje da su temelji uzgoja masline bili od Grka prenešeni starim Italima punih 5 stoljeća prije najstarije helenske kolonizacije apeninskog poluotoka.

Etruščani su dobivali najviše ulje iz samoniklih stabala masline i koristili ga, osim za prehrambene svrhe, i za rasvjetu i za kozmetiku.

Narodi svake velike mediteranske civilizacije stvarali su svoj vlastiti mit za objašnjenje postanka masline, a svi su (posebno oni koji su obitavali na obalama istočnog Mediterana) mislili da su upravo oni prvi počeli uzgajati maslinu.

Od starina su grčki i rimski vojskovođe u znak pobjede voljeli čelo ukrasiti vjenčićem načinjenim od maslinove grančice, ukrasom predodređenim za pobjede u bitkama. Grčki pjesnik i filozof Kalimah koji je živio u 3. stoljeću prije Krista, pripovijeda kako je maslina bila stvorena jednim udarcem koplja u zemlju kojeg je zadala Atena, božica mudrosti, kao simbol mira i napretka. Biljka je bila postavljena na Akropolu, kako bi štitila grad Atenu. Tko god bi srušio jednu od svetih maslina, izravnih potomaka Atenine masline bio bi osuđen na smrt ili, u kasnijem razdoblju, na izgon ili zapljenu dobara.

Za Rimljane je trgovina uljem, zajedno s trgovinom žitarica, bila najvažnija trgovina u Carstvu. U to doba postojalo je više od 20 sorata uzgajanih maslina, a razlikovano je 5 različitih kategorija ulja:

- *ex albis ulivis*, najcjedenije dobiveno od još zelenih maslina;
- *viridae*, izdvojeno iz maslina na početku berbe
- *maturum*, proizvedeno od zrelih maslina
- *caducum*, dobiveno od prezrelih i na tlo palih maslina
- *cibarium*, dobiveno od 'crvljivih' maslina, namijenjeno robovima.

Maslina se kao simbol mira pojavljuje i u Starom zavjetu, u kojem se pripovijeda kako je golubica iz Noine korablje, najavila kopnjenje voda donoseći u kljunu maslinovu grančicu. Od tada, i kršćani, muslimani, i Židovi prepoznaju u toj biljci simbol ponovnog rođenja i napretka.

1.4. Proizvodnja i potrošnja maslinovog ulja u svijetu

U svijetu se uzgaja više od 500 000 stabala maslina, a za očekivati je daljnje širenje uzgoja i rast proizvodnje. Na području Mediterana nalazi se većina stabala maslina (>80%), najviše u Španjolskoj (42%), Italiji (24%), Grčkoj (12%). Svjetska proizvodnja ulja iznosi otprilike 2 milijuna i 400 000 t.

Tablica 1. Potrošnja maslinovog ulja po stanovniku u nekim maslinarskim zemljama

| Zemlja | Potrošnja maslinovog ulja (kg/stanovnik/godina) |
|------------|--|
| Grčka | 23.3 |
| Libija | 20.5 |
| Italija | 11.9 |
| Španjolska | 10.9 |
| Turska | 7.7 |

U manjoj mjeri maslina se uzgaja u nekim zemljama Bliskog Istoka, Sjeverne Afrike i Južne Amerike, a u zadnje vrijeme i na jugozapadu SAD-a poglavito u Kaliforniji i Arizoni. U posljednjih 10 godina svjetska potrošnja porasla je za 55%, a znakovita je činjenica da potrošnja ulja značajno raste u najrazvijenijim zemljama svijeta (SAD, Japan, Australija).

Zadnja desetljeća obilježila su ekspanziju uzgoja maslina u zemljama na kojima se maslina nikada nije uzgajala, kao što su Južna Afrika, Australija, Novi Zeland, Kina, Vijetnam. Svjetska proizvodnja ulja je u stalnom porastu, od 1990., iako mediteranski prostor još uvijek drži potpuni monopol (s Italijom, na drugom mjestu, iza Španjolske), na ljestvici svjetskih proizvođača.

Glavni razlog brzog širenja i rasta proizvodnje stolnih maslina i maslinovog ulja je njihova prehrambena, preventivna pa i terapijska vrijednost. Budući da kakvoća maslinovog ulja izravno utječe na njegov dijetoterapeutski učinak na ljudski organizam i zdravlje, velika se pozornost posvećuje razumijevanju utjecaja agroekoloških kao i tehnoloških čimbenika (elaiotehnikе) uzgoja pojedinih sorti maslina, te određivanja optimalnih rokova berbe plodova svake pojedine sorte uzgajane u odgovarajućim agroekološkim uvjetima. Osim toga, i sama tehnologija prerade maslina, kako u smislu njihova konzerviranja u cilju proizvodnje stolnih maslina, tako i u cilju ekstrakcije njihova ulja, značajno utječe na kakvoću finalnog proizvoda.

Maslinovo ulje oduvijek je bila važna živežna namirnica u svakodnevnoj prehrani mediteranskog stanovništva, a od polovice dvadesetog stoljeća postaje sve zastupljenije i kod onih naroda koji su tijekom povijesti tek sporadično ili nikada dolazili u doticaj s njim, a glavni su im izvori masnoća uglavnom bile masti životinjskog porijekla. U drugoj polovici dvadesetog stoljeća, kao rezultat dugotrajnih i opsežnih međunarodnih istraživanja o prehranbenim navikama naroda koji obitavaju na području Mediterana i u njegovoj blizini, javlja se i pojam tzv. 'mediteranske prehrane' (engl. *mediteranean diet*), koji u sebi obuhvaća specifične prehranbene navike, često predstavljene shemom u obliku piramide u kojoj glavninu (temelj piramide) energetske vrijednosti hrane predstavljaju razna jela spravljena od namirnica kojima je glavni sastojak škrob (kruh, tjestenina, riža, kuskus, palenta, ostale žitarice i krumpir). Osim toga, velik udio u mediteranskoj prehrani čini povrće, voće (nešto manje jezgrasto voće poput bajama i lješnjaka), grahorice i ostale leguminoze, maslinovo ulje, te sir i jogurt; te živežne namirnice su na jelovniku svakog dana. Riba, meso peradi i jaja kao dodatni izvori proteina na jelovniku su nekoliko puta tjedno, a crveno meso tek ponekad. U 'mediteranskoj prehrani' maslinovo ulje je glavni izvor masnoća, a smatra se da je ovakav način prehrane, kao i konzumacija maslinovog ulja kao glavnog i gotovo jedinog izvora masnoća izravno povezan s malom pojavnošću koronarnih i srčanih oboljenja, i tumora.

2. Cilj istraživanja

Kako kakvoća maslinovog ulja uvelike ovisi o sorti i agroekološkim uvjetima proizvodnje, cilj ovih istraživanja bio je proučiti utjecaj proizvodnog područja na udio ukupnih fenolnih tvari u uljima dobivenim od plodova nekoliko najzastupljenijih sorti maslina u Istri (Buža, Istarska Bjelica i Leccino).

3. Pregled literature

3.1. Fenolne tvari u plodovima i uljima masline

U plodovima maslina se pored vode, ulja, raznih šećera, proteina i antocijana, nalaze i razne fenolne tvari. Od svih uljarica, plodovi maslina su najbogatiji fenolnim tvarima, koje se većinom nalaze u tzv. vegetacijskoj vodi ploda (**Perrin, J. T., 1992.;** **Bianchi, G. i Pozzi, N., 1994**). Fenolne tvari su jedna od glavnih skupina sekundarnih metabolita u plodovima maslina, a najzastupljenija tvar među njima je složeni glikozidni ester hidroksitirozola i elenolne kiseline -oleuropein. Prilikom ekstrakcije ulja iz plodova, fenolne tvari prelaze u vegetacijsku vodu, koja se odvaja od ulja, ali dio njih ostane i u samom ulju. Prema **Macheix, J. J. i sur. (1990)**, najvažnije klase fenolnih tvari u plodovima maslina jesu fenolne kiseline, fenolni alkoholi, flavonoidi, sekoiridoidi. Oleuropein i demetiloleuropein, te ligstrozid i verbaskozid, najznačajniji su sekoiridoidi. Spojevi koji nastaju njihovom razgradnjom, odnosno njihovi derivati kao što su hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), *p*-hidroksifeniletanol (*p*-HPEA), dialdehidni oblici elenolne kiseline vezane za hidroksitirozol ili *p*-hidroksifeniletanol (3,4-DHPEA-EDA, odnosno *p*-HPEA-EDA), te jedan izomer aglikona oleuropeina (3,4-DHPEA-EA), najvažniji su antioksidansi koji se nalaze u djevičanskim maslinovim uljima (**Baldioli, M. i sur., 1996**).

Fenolne tvari su učinkoviti prirodni antioksidansi koji štite maslinovo ulje od autooksidacijskih promjena (**Škarica, B., Žužić I., Bonifačić M., 1997**), te time pridonose stabilnosti ulja u smislu očuvanja njegove kakvoće i trajnosti. Fenolne tvari u stvari štite od oksidacije nezasićene masne kiseline koje se nalaze u sastavu triacilglicerola maslinovog ulja.

Za vodotopive i konjugirane fenole smatra se da u velikoj mjeri doprinose organoleptičkim svojstvima maslina kao što su pikantnost i gorčina nezrelih plodova, a s druge strane daju najpoželjnije odlike prerađenim stolnim maslinama.

Proučavanja antioksidativnog djelovanja fenolnih spojeva pokazala su da poli- i difenoli, kao što su oleuropein i hidroksitirozol imaju veću antioksidativnu aktivnost od monofenola (npr. tirozola) (**Papadopulos, G., i Boskou, D., 1991**). Također je otkriveno da su hidroksitirozol i tirozol, kao i njihovi derivati, djelomično odgovorni za paprenast i gorak okus koji ponekad može biti dominantan u djevičanskom maslinovom ulju (**Kiritsakis, A. K., i sur., 1998**).

U maslinovom ulju različite fenolne tvari dolaze u slobodnom obliku ili vezane s različitim spojevima u kompleksne tvari koje starenjem ulja degradiraju tj. raspadaju se na svoje sastavne dijelove.

Već je **Gutfinger (1981)** otkrio izrazitu povezanost (visoku korelaciju) između stabilnosti maslinovog ulja prema oksidaciji i udjela ukupnih fenolnih tvari. Upravo zbog ovog otkrića udio fenolnih tvari u maslinovom ulju smatra se važnim parametrom kod procjenjivanja kakvoće djevičanskih maslinovih ulja. Zahvaljujući svojim sposobnostima uklanjanja ('čišćenja') slobodnih radikala, te svojstvima vezanja atoma metala, fenolne tvari štite ulje od oksidativnih procesa i time direktno utječu na njegovo čuvanje. Međutim, fenolne tvari u velikoj mjeri utječu na organoleptička svojstva djevičanskog maslinovog ulja (njegov okus i miris); nehlapljive fenolne tvari daju ulju pikantan i gorak okus, te osjet po 'zelenom', dok hlapivi fenolni sastojci kao vanilin doprinose mirisu maslinovog ulja, ali također mogu utjecati i na njegov okus (**Romero, M, P. i sur., 2002**). Upravo zbog toga moguće je organoleptički okvirno detektirati njihovu zastupljenost i harmoničnost u maslinovim uljima, što se odražava u rezultatima (ocjenama) senzorne analize uzoraka maslinovih ulja koju provodi komisija izučenih kušača (panel test).

Do sada je napisano mnoštvo znanstvenih radova koji su se bavili istraživanjima fenolne komponente djevičanskih i ekstra djevičanskih maslinovih ulja.

Gutfinger, T. (1981) je napisao jedan od prvih radova koji se bavio fenolnim tvarima i njihovim određivanjem u maslinovim uljima. Postupak određivanja udjela ukupnih fenolnih tvari u maslinovim uljima opisan u tom radu još uvijek se navelike primjenjuje u praksi, iako metoda nije posve precizna. Naime, po ovom postupku

koristi se Folin-Ciocalteu reagens - otopina kompleksnih polimernih iona sačinjenih od fosfomolibdatne $H_3[PMo_{12}O_{40}]$ i fosfovolframatne $H_3[P(W_{12}O_{40})]$ heteropolikiselina (**Folin, O., and Ciocalteu, V., 1944**). Folin-Ciocalteu reagens oksidira fenolate, reducirajući heteropolikiseline pri čemu nastaje plavi Mo-W kompleks. Gutfinger-ova metoda nije posve specifična za određivanje fenolnih tvari, pogotovo zato što bilo koji reducirajući spoj koji se nađe u ispitivanom uzorku može utjecati na rezultat (promjenu boje). Osim toga, nisu sve fenolne tvari jednako jaki reducensi. Zbog toga se udio fenolnih tvari u uzorcima biološkog porijekla općenito prikazuje kao udio standardne tvari (obično kavene ili galne kiseline, korištene za izradu baždarnog pravca za određeni spektrofotometar) (**Mosca, L. i sur., 2000**). Zato Gutfinger-ova metoda predstavlja samo okvirnu informaciju o kvantitativnom udjelu fenola u nekom maslinovom ulju.

3.2. Utjecaj sorte i agroekoloških (elaioekoloških) čimbenika na udio fenolnih tvari

Brojni timovi istraživača proučavali su i istraživali ulja različitih sorti maslina, te napisali mnogo studija o odnosima između sorti i agroekoloških uvjeta proizvodnje. Tako je već dugo poznato da ukupni udio fenola, ali i udio pojedinačnih fenolnih tvari u djevičanskom maslinovom ulju ovisi o sorti (genetskoj osnovi), klimatskim prilikama tijekom dozrijevanja plodova, stupnju dozrelosti plodova iz kojih se izdvaja ulje, te metodi ekstrakcije ulja. Osim toga i sustav uzgoja i primjenjene agrotehničke mjere (**Pannelli, G., i sur., 1994**), a pogotovo stanje opskrbljenosti vodom odnosno navodnjavanje (**Romero, M. P. i sur., 2002**), također mogu posredno ili neposredno utjecati na udio fenolnih tvari u plodovima maslina.

Montedoro, G. F., Vinicieri, F. F., i suradnici (1997) su svojim istraživanjima pokazali da udio ukupnih fenolnih tvari u maslinovim uljima dobivenim od istih sorata značajno varira na različitim lokacijama. Na različitim lokacijama često vladaju i različiti agroekološki uvjeti. Osim toga, udio fenola u uljima jedne te iste sorte ovisi i o stupnju dozrelosti plodova, odnosno o vremenu i roku berbe, kao i o podlozi na koju je cijepljena (ako nije dobivena ukorjenjivanjem reznica sorte).

Failla, O., i suradnici (2002), su provodili istraživanja u reprezentativnim maslinicima sjeverne Italije, i to na uzorcima sorti Casaliva i Leccino. Iz svakog maslinika uzet je po jedan uzorak od dvije istraživane sorte. Utvrđeno je da su polifenoli davali bitan doprinos autooksidacijskoj stabilnosti ulja, iako je veća stabilnost prema autooksidaciji kod Leccina vjerojatno posljedica mnogo veće koncentracije tokoferola, nego kod sorte Casaliva. Udjeli polifenola i tokoferola značajno su ovisili o klimatskim prilikama pojedine godine.

Heinter, D., i suradnici, (1999) su istraživali utjecaj podloge, kod cijepljenih stabala maslina, na udio i vrstu fenolnih tvari u listovima maslina. Koristili su 6 različitih podloga na koje su cijepljene 2 sorte Leccino i Frantoio. Analizirani su flavonoidi u listovima plemki, pa se ispostavilo da ima značajnih razlika između podloga. Otprije je poznato da različite podloge mogu različito utjecati na udio i vrstu flavonoidnih fenola. Mjerile su se koncentracije apigenina, luteolin-4-glukozida i quercetina, kako bi se proučio utjecaj istraživanih podloga na ove flavonoide u listovima plemki (sortama). Kvalitativne razlike u njihovim koncentracijama došle su više do izražaja kod sorte Leccino, nego Frantoio.

Olivera Koprivnjak (1995), iznosi zaključke o tome gdje se pokazalo da sorta Bjelica sadrži više ukupnih polifenola u odnosu na sortu Bužu i Leccino. Njezin rad se odnosio na fenole u uljima glavnih istarskih sorti u ekološkim uvjetima zapadne obale Istre. Fenoli su odgovorni za svojstva okusa (pikantnost), no nisu manje značajni ni kao antioksidansi koji usporavaju degradaciju kakvoće ulja.

Benčić, Đ., 2000, je u svojoj doktorskoj disertaciji pokazao da, osim što se maslinova ulja razlikuju po udjelu ukupnih fenolnih tvari ovisno o sorti od kojih su dobivena, na udio fenolnih tvari također utječu i agroekološki uvjeti proizvodnog područja, napose nadmorska visina i s njome povezane temperature i količina oborina. Tako će, u pravilu, ulje određene sorte imati manji ukupni udio fenolnih tvari ako je nadmorska visina veća, a klima hladnija.

3.3. Maslinovo ulje u prehrani i njegov utjecaj na ljudsko zdravlje

Prehrambena i zdravstvena vrijednost maslinovog ulja prvenstveno proizlazi iz vrlo povoljnog omjera i udjela masnih kiselina u masnoćama (triacilglicerolima) u njegovom sastavu. Najzastupljenija je oleinska kiselina (oko 70 do 80 %) - mononezasićena masna kiselina koja ne opterećuje metabolizam ljudskog organizma i ne potiče stvaranje 'lošeg kolesterola', tj. lipoproteina niske gustoće (engl. *LDL – low density lipoproteins*). Tako **Baldioli M., i suradnici (1996)** ističu da se biološki, prehrambeni, i zdravstveni učinci maslinovog ulja, pripisuju visokom udjelu oleinske kiseline, a u novije vrijeme prirodnim antioksidansima, posebno polifenolima.

Međutim, da bi se maslinovim uljem, pored masnoća povoljnog sastava masnih kiselina, u organizam unijele i ostale tvari povoljne za ljudsko zdravlje, važno je da se maslinova ulja konzumiraju u svom prirodnom stanju bez provedene rafinacije (djevičanska ulja), te proizvedena od zdravih, na vrijeme branih i prerađenih plodova. Tako u uljima ostaju sačuvane brojne dietoterapeuske tvari koje se prirodno nalaze u plodovima masline, a među njima i fenolne tvari (**Tasioula-Margari, M., i Okogeri, O., 2001**).

Te ostale tvari prisutne u djevičanskom maslinovom ulju (pogotovo onom ekstradjevičanskom), a to su prvenstveno razni antioksidansi poput skvalena, tokoferola (vitamina E) i različitih vrsta fenolnih tvari, štite upravo spomenuti LDL od oksidacijskih procesa, te time sprječavaju ili barem usporavaju nastanak kroničnih degenerativnih procesa koji dovode do ateroskleroze i njome uzrokovanih koronarnih, srčanih i neuroloških bolesti (**Visioli, F. i Galli C., 1998; Miles, E. A. i sur. 2005; Tripoli, E. i sur., 2005**).

Kao antioksidansi, fenolne tvari u organizmu imaju funkciju čistača tzv. slobodnih radikala, što se odražava pozitivnim učincima protiv različitih degenerativnih pojava u ljudskom organizmu. Autooksidacija polinezasićenih masnih kiselina u sastavu ljudskog organizma povezana je s oštećenjem staničnih membrana, starenjem i bolestima srca, te s pojavom tumora. Djelovanje nekih fenolnih tvari, poput

oleuropeina (**Visioli, F., i Galli, C., 1994; Furneri, P. M. i sur., 2002**) i hidroksitirozola (**Visioli, F. i Galli C., 1998; Miro-Casas, E. i sur., 2003; Manna, C. i sur., 1999; Romero, C. i sur., 2002; Visioli, F. i sur., 2000; D'Angelo, S. i sur., 2001**), je i klinički dokazano, a također je poznato da te tvari imaju i antibiotska svojstva, odnosno koče rast nekih bakterija i gljivica, te pokazuju i antikancerogena djelovanja. Upravo to bi mogao biti razlog neočekivanom otkriću **Rose i sur. (1986)**, koji su našli da je mortalitet od tumora dojke mnogo manji u Grčkoj nego u Izraelu; naime u odnosu na Izrael, masnoće korištene u prehrani u Grčkoj većim dijelom potječu od maslinovog ulja, a time je i veći unos u organizam svih ostalih povoljnih tvari sadržanih u maslinovom ulju.

4. Materijali i metode

4.1. Materijali

4.1.1. Sorte maslina

Tijekom 2002. i 2003. godine brani su plodovi maslina slijedećih sorti:

Buža (autohtona istarska sorta, najviše zastupljena u okolici Vodnjana, Peroja i Barbarige, ali je ima i drugdje u Istri),

Istarska Bjelica (porijeklom talijanska sorta koja je 1929. godine introducirana u Kopar, a potom se proširila, po cijeloj Istri),

Leccino (jedna od najznačajnijih sorti maslina u svjetskim razmjerima).

Ulja ovih sorti bila su dobivana od plodova branih tijekom dvije proizvodne godine (2002. i 2004.) u dva, po agroklimatskim obilježjima (preliminarna istraživanja **Benčić., Đ., Doktorska disertacija, 2000.**), značajno različita maslinarska područja poluotoka Istre.

4.1.2. Proizvodna područja

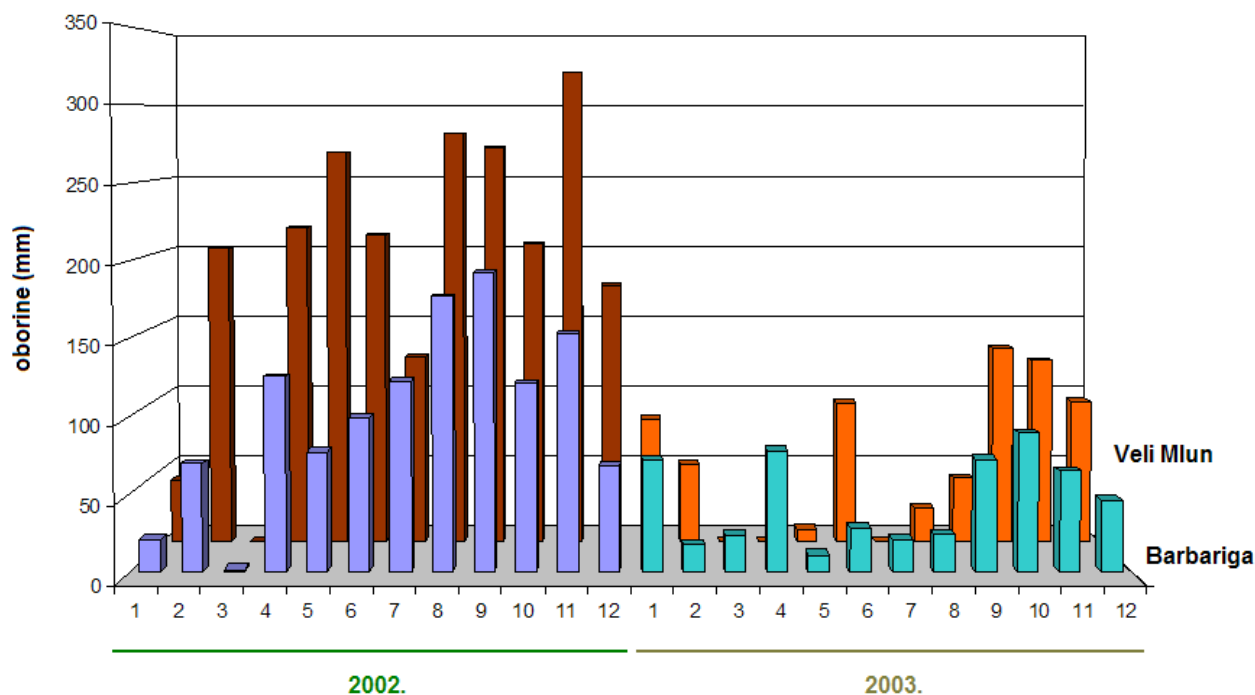
Za istraživanje su odabrana dva proizvodna područja koja se bitno razlikuju po agroekološkim čimbenicima. Prvo, sjeverno proizvodno područje nalazi se na krajnjem sjevernom rubu rasprostiranja masline u sjeverozapadnoj Istri, a maslinici (dvije lokacije: Veli Mlun - samo sorta Leccino, i Sovilnjak - sorte Leccino, Buža i Bjelica) iz kojih su masline brane nalazili su se na 280 metara nadmorske visine.

Drugo, južno proizvodno područje nalazi se uz samu morsku obalu jugozapadne Istre, a radi se o plantažnom nasadu maslina poduzeća "Agroprodukt" d.o.o., Pula, u Barbarigi. Ovaj nasad rasprostire se na 200-tinjak hektara, a nalazi se na 10 m nadmorske visine, tik uz obalu mora. Iz ovog nasada brani su plodovi Bjelica i

Leccina, s time da su posebno brani plodovi Leccina rasli na vlastitom korijenu (vegetativnoj podlozi) i plodovi Leccina uzgajani na generativnoj podlozi (dakle cijepljene na sjemenjake).

4.1.3. Oborine

Oborine su jedan od najvažnijih agroekoloških čimbenika koji utječu općenito na prinos, a tako i na udio fenola u plodovima i uljima maslina. Količina oborina izrazito se razlikovala u dvije godine istraživanja. Dok je 2002. godina bila izrazito kišna (Barbariga 1234 mm, Veli Mlun 2325 mm), posebno u razdoblju zemetanja i rasta plodova, te nakupljanja ulja i za vrijeme berbe, to je 2003. godina bila izrazito sušna (Barbariga 552 mm, Veli Mlun 667 mm). Raspored oborina po mjesecima u dvije istraživane godine prikazan je na grafikonu 1.



Grafikon 1. Oborine (mm) po mjesecima u 2002. i 2003. godini na istraživanim lokacijama

4.1.4. Određivanje indeksa zrelosti i berba uzoraka maslina

Svaki uzorak ulja dobiven je od plodova ubranih s jednog stabla. Tako je, biometrički gledano, jedno stablo (ulje) određene sorte s određene lokacije predstavljalo jedno opažanje. Prikupljeni uzorci imali su između 8 i 14 kg (ovisno o raspoloživosti radne snage), a svaki uzorak bio je ubran s jednog stabla masline, osim u onim situacijama kad nije bilo moguće skupiti dovoljno plodova s jednog stabla. Plodovi maslina bili su brani ručno, iz svih dijelova krošnje podjednako da se dobije reprezentativan uzorak. Kako nije bilo druge mogućnosti nego da se stabla s kojih će se uzimati uzorci odabiru nasumice, to su rezultati određivanja pojedinih svojstava (u ovom slučaju ukupnih fenolnih tvari u uljima) analizirani po potpuno slučajnom rasporedu. Prilikom nasumičnog odabira stabala ipak se pazilo da stabla pojedinih sorata budu podjednake starosti, uzgojnog oblika, habitusa rasta, te opterećenja urodom i zrelošću plodova. Dakle, prio odabiru stabala pazilo se da ona otprilike odražavaju prosječno stanje te sorte u danom masliniku.

Prilikom ubiranja plodova maslina nastojalo se da oni budu otprilike istog stupnja dozrelosti, odnosno indeksa zrelosti, iako uvjeti na terenu nisu ostavljali mnogo prostora za čekanje posve određenog stupnja dozrelosti plodova pojedinih sorti maslina. Naime, uzorci maslina bili su skupljani u isto vrijeme kad su svoje masline brali i lokalni maslinari; međutim, ipak se nastojalo brati plodove u najprikladnijem stupnju dozrelosti. U **tablici 1** nalaze se prosječni indeksi zrelosti istraživanih sorti u dvije godine na sjeveru i jugu.

Tablica 2. Prosječni indeksi zrelosti (svih opažanja - uzoraka) istraživanih sorti u dvije godine na sjeveru i jugu

| Sorta | godina | | | |
|---------|--------|------|--------|------|
| | 2002. | | 2003. | |
| | sjever | jug | sjever | jug |
| Bjelica | 1.27 | 1.33 | 1.20 | 1.20 |
| Buža | 4.57 | 3.73 | 4.36 | 4.87 |
| Leccino | 4.13 | 3.53 | 3.97 | 4.56 |

Tako su plodovi Buža i Leccina imali slične indekse zrelosti, dok je kod bjelice on u isto vrijeme bio znatno manji, kako na sjeveru tako i na jugu, što je uvjetovano specifičnim obojenjem plodova ove sorte čemu i zahvaljuje svoje ime. Indeks zrelosti određen je po metodi predloženoj od IOOC (1984) (prema, **Kiritsakis, A. K. i sur., 1998**). Njegovo određivanje ne zahtijeva posebnu opremu, a ima orijentacijsku važnost. Njegovim višegodišnjim određivanjem za pojedine sorte, u nekom proizvodnom području, moguće je doći do saznanja koji stupanj zrelosti plodova određene sorte omogućava dobivanje ulja optimalne kakvoće.

4.2. Metode

4.2.1. Ekstrakcija ulja iz plodova maslina

Ulja sakupljenih uzoraka bila su ekstrahirana isti ili, najkasnije, sljedeći dan, a masline su do ekstrakcije ulja bile držane na hladnom i od svjetlosti zaklonjenom mjestu u tankom sloju u platnenim vrećama velikih okaca.

Ulja su ekstrahirana korištenjem malog (laboratorijskog) stroja za ekstrakciju ("Olio mio - Baby", Toscana Enologica Mori, Firenze, Italy) koji se sastoji od mehaničke drobilice (mlina čekićara), vertikalnog cilindra za miješanje paste (zdrobljenih maslina) i centrifugalnog dekantera koji odvaja ulje od vegetacijske vode i komine.

Miješanje paste trajalo je 30 minuta, a voda se u nju nije dodavala, osim u nekim slučajevima kad je bilo neophodno dodati male količine hladne vode da bi ekstrakcija ulja uopće bila moguća. Temperatura maslinove paste tijekom cijelog procesa prerade nije prelazila 30°C jer je prostorija u kojoj se ekstrahiralo ulje bila grijana samo noću tek toliko da se u njoj može raditi, pa temperatura zraka nije prelazila 18°C. Doduše, stroj bi se sam nakon nekog vremena rada zagrijao, ali ne preko 30°C.

Netom ekstrahirana ulja ostavljena su oko 45 min. u poklopljenoj posudi, da se grube nečistoće slegnu na dno ili isplivaju na površinu posude, a nakon toga se od tih nečistoća pročišćeno ulje odmah punilo u prikladne bočice od tamnog stakla, sve do vrha (zbog što manjeg doticaja sa zrakom). Bočice su bile zatvorene originalnim patentnim plastičnim čepovima. Tako spremljeni uzorci smješteni su na tamno mjesto, na oko 10°C (ne duže od 20 dana), da se ostatak vode i finijih nečistoća istaloži na dno bočica. Nakon taloženja, odvojen je gornji sloj čistog ulja i stavljen u nove sterilne bočice, napunjene do vrha i začepljene.

Na ovakav način pripremljeni uzorci stavljeni su na duboko smrzavanje (-20°C) sve do ekstrakcije fenolnih tvari.

4.2.2. Kemijske analize osnovnih pokazatelja kakvoće ulja

Prema **Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina** (NN br. 63/2006) djevičansko maslinovo ulje je ulje dobiveno od ploda masline isključivo fizičkim prešanjem i/ili centrifugiranjem uz odgovarajuće zagrijavanje, kod čega ne dolazi do kemijskih promjena u ulju. U proizvodnji djevičanskih maslinovih ulja dopušteno je primjenjivati pranje, centrifugiranje, dekantiranje i filtriranje.

Prema ovom Pravilniku pod djevičanskim maslinovim uljem ekstra kakvoće podrazumijeva se ulje odgovarajućih organoleptičkih (senzornih) svojstava, bez nepoželjnih mirisa i okusa, a koje sadrži najviše 0.8 % slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina.

Kemijske analize osnovnih pokazatelja kakvoće ulja (udio ukupnih slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj, te primarni i sekundarni produkti oksidacije - K_{232} i K_{270}), provedene prije ekstrakcije fenolnih tvari iz uzoraka ulja, pokazale su da svi ispitivani uzorci prema kemijskim parametrima zadovoljavaju uvjete za ekstra kakvoću. Samo u takvim uljima može se očekivati maksimalni udio fenolnih tvari, jer se pretpostavlja da se njihova koncentracija nije smanjivala uslijed nepoželjnih kemijskih procesa degradacije ulja.

Spektrofotometrijska određivanja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu reagensa, te specifičnih koeficijenata apsorpcije K_{232} i K_{270} , provedena su na spektrofotometru DU-64, Beckman.

4.2.3. Ekstrakcija i određivanje ukupnih fenolnih tvari

Za ekstrakciju fenolnih tvari iz uzoraka ulja korišten je modificirani postupak prema **Montedoro, G. F. i suradnicima (1992)**, a za njihovo određivanje postupak prema **Gutfinger-u (Gutfinger, T., 1981)**.

Fenolne tvari ekstrahirane su iz 20 g djevičanskih maslinovih ulja s 4 mL metanola HPLC čistoće (2x); ulje je bilo homogenizirano s metanolom 30 min. pomoću magnetske mješalice. Nakon toga je slijedilo centrifugiranje na 5000 rpm, 30 minuta (2x), čime je odvojena (2 x 4 mL) čista metanolna frakcija s fenolnim tvarima. Dobivene metanolne frakcije su spojene, a otapalo (metanol) je otpareno u vakuumu u struji dušika. Temperatura tijekom ovog postupka nije prelazila 32 °C. Sirupasti ostatak nakon evaporacije otopljen je u 5 mL acetonitrila (HPLC čistoće) i pročišćen od ostataka lipidnih tvari heksanom

(dva puta s po 10 mL). Acetonitrilna frakcija u kojoj su ostale fenolne tvari, odijeljena je od heksanskog sloja, a sam acetonitril uklonjen je iz suspenzije također u vakuumu u struji dušika na temperaturi do 32°C. Sirupasti ostatak s fenolnim

tvarima pohranjen je na -20°C do provođenja određivanja ukupnih fenola korištenjem Folin-Ciocalteau reagensa.

Za određivanje ukupnih fenolnih tvari u odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetirano je 0.03 mL metanolnog ekstrakta koji je razrijeđen redestiliranom vodom do 5 mL. Nakon toga je dodano 0.5 mL Folin-Ciocalteau reagensa, a nakon 3 minute dodao se 1 mL zasićene otopine Na_2CO_3 ($w(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 35\%$). Zatim se smjesa dobro promućka i nadopuni vodom do označenog volumena (10 mL). Nakon točno jedan sat, mjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 725 nm, uz slijepu probu. Za izradu baždarnog pravca korištene su otopine kavene kiseline (3,4-dihidroksicimetna kiselina) poznatih koncentracija.

4.2.4. Biometrička obrada podataka

Podaci su analizirani GLM procedurom u SAS sistemskom paketu, verzija 8.00 (SAS Institute Inc. Cary, NC). Pošto dizajn (shema) pokusa nije bio balansirani (radilo se o potpuno slučajnom rasporedu s različitim brojem opažanja), izračunati su *LS*-prosjeci (LSMEANS, od engl. *Least-Squares means*) za svaki faktor i interakciju uvrštenu u odgovarajuću analizu. Prednost *LS*-prosjeaka od 'običnih' prosjeka - aritmetičkih sredina, je ta da oni predstavljaju granične prosjeke balansirane populacije. Primjenom opcije LSMEANS u sistemskom paketu SAS, također se mogu definirati i izračunati, te uspoređivati *LS*-prosjeci interakcija pojedinih faktora.

Razlikovanje *LS*-prosjeaka (odnosno utvrđivanje signifikantnosti razlike između njih) provedeno je primjenom *t*-testa - za svaki par *LS*-prosjeaka. Za ukupne fenole kao signifikantne uzimane su one za koje se to može tvrditi s najmanje 95%-tnom sigurnošću.

5. Rezultati i rasprava

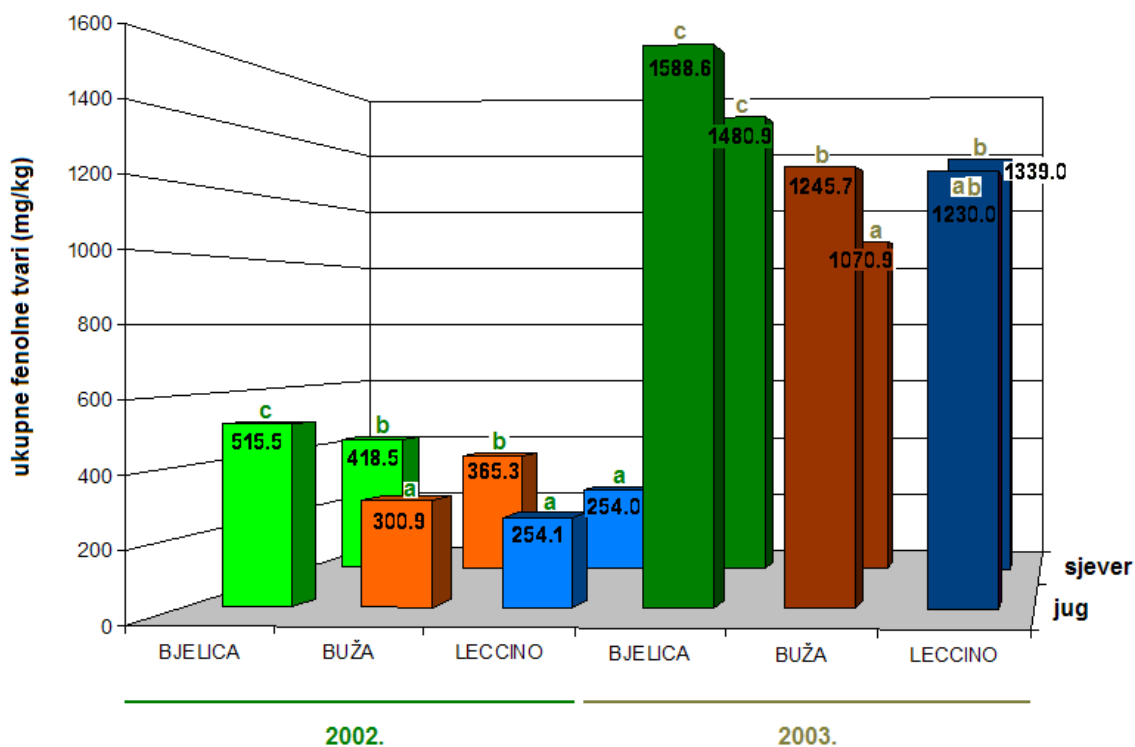
5.1. Rezultati mjerenja osnovnih pokazatelja kakvoće maslinovih ulja

Prema osnovnim kemijskim pokazateljima kakvoće (postotni udio ukupnih masnih kiselina, peroksidni broj i specifični indeksi apsorbancije K_{232} i K_{270}), svi analizirani uzorci maslinovih ulja odgovaraju uvjetima ekstra kakvoće.

5.2. Ukupne fenolne tvari maslinovih ulja

S obzirom da su ukupne fenolne tvari u istraživanim maslinovim uljima određene, još uvijek naveliko korištenom, metodom prema Gutfinger-u (1981) u kojoj se koristi Folin-Ciocalteu reagens (koji, kako je ranije spomenuto, i nije posve specifičan za fenolne tvari), moguće je da rezultati njihova određivanja ponešto odstupaju od stvarnih vrijednosti. Međutim, ta odstupanja ne mogu biti tolika da mijenjaju smisao dobivenih rezultata; već po samim organoleptičkim svojstvima svježih ulja iz sušne 2003. godine (gotovo nepodnošljivo pikantan i gorak okus svježih ulja, što bi odgovaralo organoleptičkim svojstvima ulja koja imaju više od 1 g ukupnih fenolnih tvari po kilogramu) nema nikakve sumnje da je udio ukupnih fenolnih tvari u uljima svih sorti bio daleko veći nego u kišnoj 2002. godini.

Na **grafikonu 2.** jasno se uočava utjecaj ekstremno različitih ekoloških uvjeta (prvenstveno količine oborina) u godinama istraživanja (2002. - kišna, 2003. - sušna) na udio fenolnih tvari u uljima istraživanih sorata. Osim toga, uočljive su i razlike između pojedinih ulja; ulja Bjelice u obje godine istraživanja imaju značajno veći udio fenolnih tvari u odnosu na ulja ostale dvije sorte.



Grafikon 2. LS-prosjeci ukupnih fenolnih tvari (mg/kg) u uljima pojedinih sorti u dvije godine istraživanja na dvije lokacije (sjever i jug). Unutar svake pojedine godine istim slovima (a, b, c ili d) označene su one vrijednosti između kojih razlika nije statistički značajna (uz $p \leq 0.05$)

Na jugu Istre, 2002. godine, nije bilo značajnih razlika u udjelima ukupnih fenolnih tvari između ulja Buža i Leccina; ulja Bjelica imala su signifikantno veći udio ukupnih fenolnih tvari i od ulja Buža i od ulja Leccina ($p \leq 0.05$).

Na sjeveru, kao i na jugu Istre, najveći udio ukupnih fenolnih tvari bio je u uljima Bjelica. U odnosu na sortu Bužu, ulja Bjelica imala su nešto veći udio ukupnih fenolnih tvari, ali ta razlika nije bila statistički signifikantna, dok su i ulja Bjelica i ulja Buža imala signifikantno veći udio fenolnih tvari od ulja Leccina ($p \leq 0.05$).

Gledano po pojedinim sortama, zanimljivo je primjetiti da su samo ulja sorte Bjelice na jugu imala signifikantno veći udio ukupnih fenolnih tvari od onih na sjeveru.

U 2003. godini ulja svih sorti, bilo na jugu ili na sjeveru, imala su višestruko veće (ulja Bjelica oko 3 puta, a ulja Leccina čak oko 5 puta) udjele fenolnih tvari nego što je to bio slučaj u 2002. godini. To se bez sumnje može pripisati ekstremno različitim klimatskim prilikama u vrijeme rasta i razvoja plodova maslina (ekstremna suša), što se poklapa sa zaključcima **Uceda, M. i suradnika (1999)** koji su svojim istraživanjima različitih parametara kakvoće maslinovih ulja, provedenih u sklopu oplemenjivačkog rada na maslinama, našli, da su najveći uzrok varijabilnosti za udio ukupnih fenolnih tvari bile klimatske prilike godine i sama sezona (koja sa sobom nosi pojavu alternativne rodnosti, odnosno nerodnosti), dok je za većinu parametara kakvoće ulja najvažniji uzrok varijabilnosti bila sorta.

Na sjeveru, kao i na jugu, najveći udio ukupnih fenolnih tvari imala su ulja Bjelica; za razliku od 2002. godine, bio je signifikantno veći i od onog u llima Buža i od onog u uljima Leccina. Ulja Bjelice i 2003. godine imala su nešto veći udio ukupnih fenolnih tvari na jugu, ali ne signifikantno različit od ulja sa sjevera.

Ulja Buža su, za razliku od 2002. godine, imala značajno veći udio fenolnih tvari na jugu, a on se nije značajno razlikovao od udjela u uljima Leccina kako sa sjevera tako i s juga.

6. Zaključci

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je udio ukupnih fenolnih tvari u maslinovim uljima značajno uvjetovan sortom, ali uvelike ovisi i o klimatskim prilikama, prvenstveno o količini i razdiobi oborina, ali i ostali agroekološki čimbenici (dozrelost plodova tj. vrijeme berbe, stanje alternativne rodnosti i kondicija biljke) imaju značajan utjecaj.

Općenito se može zaključiti da će u uljima biti veći udio fenolnih tvari što biljke više oskudijevaju vodom, odnosno što je dugotrajnije sušno razdoblje tijekom rasta i dozrijevanja plodova. Iako su se u zadnje vrijeme počela cijeliti ulja s povećanim udjelom fenolnih tvari, u slučajevima ekstremne suše ulja (pogotovo svježe ekstrahirana) mogu imati pretjerano pikantan i gorkast okus što može odbojno djelovati na potrošače.

7. Literatura

1. D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., et al. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug. Metab. Dispos.* 29:1492-1498.
2. Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., and Montedoro G. F., (1996). Antioxydant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 11:1589-1593
3. Benčić, Đ. (2000). *Utjecaj sorti i stupnja zrelosti na kvalitetu ulja u istarskim maslinicima*. Doktorska disertacija, Zagreb.
4. Bianchi, G., Pozzi, N. (1994). 3,4-Dihydroxyphenylglycol, a major C6–C2 phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochemistry* 35:1335-1337
5. Folin, Otto and Ciocalteu, Vintila. *On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. Jour. Biol. Chem.* 73: 627-650 1927. Cited in Todd-Sanford 10th ed., 1944, page 412.
6. Furneri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N. and Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 20(4):293-296
7. Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58:966-968
8. Kiritsakis, K. A., Lenart B. Elizabeth, Hernandez J. Ruben, Willet C. Walter; *Olive Oil From the Tree to the Table*, Second Edition (August 1, 1998). ISBN: 0917678427. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut 06611 USA.
9. Macheix, J. J., Fleriet, A., and Billot, J., (1990). *Fruit phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
10. Manna, C., Della Ragione, F., Cucciolla, V., Borriello, A., D'Angelo, S., Galletti, P., et al. (1999). Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity. *Advances in nutrition and cancer* 2:115-130
11. Miles, E. A., Zoubouli, P., Calder, P. C. (2005). Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 21(3):389:394
12. Miro-Casas, E., Covas, M.-I., Farre, M., Fito, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., Roset, P. and de la Torre, R. (2003). Hydroxytyrosol Disposition in Humans. *Clinical Chemistry* 49:945-952
13. Mosca, L., De Marco, C., Visioli, F., Cannella, C. (2000). Enzymatic Assay for the Determination of Olive Oil Polyphenol Content: Assay Conditions and Validation of the Method. *J. Agric. Food. Chem.* 48:297-301
14. Narodne novine, službeni listi Republike Hrvatske, br. 63/2006. *Pravilnik o uljima od ploda i koline maslina*.
15. Pannelli, G., Servili, M., Selvaggini, M., Baldioli, M., Montedoro, G. F. (1994). Effect of agronomic and seasonal factors on olive (*Olea europaea* L.) production and on the qualitative characteristics of the oil. *Acta Hort.* 356:239-243.
16. Papadopoulos, G., Boskou, D., (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *JAOCS.* 68:669-671

17. Perrin, J. T. (1992). Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Rev. Fr. Corps Gras* 39, 25-32.
18. Romero, C., Brenes, M., Garcia, P., Garrido, A. (2002). Hydroxytyrosol 4- β -glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J. Agric. Food Chem.* 50:3835-3839
19. Romero, M. P., Tovar, M. J., Girona, J., Motilva, V. J., (2002). Changes in the HPLC Phenolic Profile of Virgin Olive Oil from Young Trees (*Olea europaea* L. Cv. Arbequina) Grown under Different Deficit Irrigation Strategies. *J. Agric. Food Chem.* 50:5349-5354
20. Rose, D. P., Boyar, A. P. and Wynder, E. L., (1986). International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate and colon per capita food consumption. *Cancer* 58:2363-2371
21. Škarica B., Žužić I., Bonifačić M. (1996): *Maslina i maslinovo ulje visoke kakvoće u Hrvatskoj*, «Tipograf» d.d., Rijeka, 1996
22. Tasioula-Margari, M., and Okogeri, O., (2001). Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS. *Journal of Food Science* 4(66):530-534
23. Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews* 18:98-112
24. Uceda, M., Hermoso, M., García-Ortiz, A., Jimenez, A., Beltrán, G. Intraspecific Variation of Oil Contents and the Characteristics of Oils in Olive Cultivars. Proc. 3rd Int. ISHS Symp. on Olive Growing, *Acta Hort.* 474. ISHS, 1999. pp 659-662.
25. Visioli, F., Galli, C., (1994). Oleuropein Protects Low Density Lipoprotein From Oxidation. *Life Sciences.* 55:1965-1971
26. Visioli, F., Galli, C., (1998). Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health. *J. Agric. Food Chem.* 46:4292-4296
27. Visioli, F., Galli, C., Plasmati, E., Viappiani, S., Hernandez, A., Colombo, C., et al. (2000). Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation* 102:2169-2171.