Utjecaj sorte, stupnja zrelosti plodova masline i temperature čuvanja djevičanskog maslinovog ulja na sastav i koncentracije sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola

Lukić, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:077677

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marina Lukić

UTJECAJ SORTE, STUPNJA ZRELOSTI PLODOVA MASLINE I TEMPERATURE ČUVANJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA NA SASTAV I KONCENTRACIJE STEROLA TE ALIFATSKIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, srpanj, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam
Smjer: Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK: 634.63 : 665.327.3(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana: Inženjerstvo
Tema rada je prihvaćena na VII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 29. travnja 2021.
Voditelj: dr. sc. *Tihomir Moslavac*, red. prof.

UTJECAJ SORTE, STUPNJA ZRELOSTI PLODOVA MASLINE I TEMPERATURE ČUVANJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA NA SASTAV I KONCENTRACIJE STEROLA TE ALIFATSKIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA

Marina Lukić, 0058131689

Sažetak: Cilj istraživanja bio je kemijski okarakterizirati djevičanska maslinova ulja od nedovoljno istraženih važnijih autohtonih sorti maslina s hrvatskog dijela istarskog poluotoka, Buže, Črne i Rosinjole, na osnovi profila i koncentracija sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola. Zadatak je bio istražiti razmjere utjecaja sorte, odnosno stupnja zrelosti te pronaći analitičke pokazatelje sortnog porijekla i stupnja zrelosti i ispitati njihovu postojanost nakon 12 mjeseci skladištenja na različitim temperaturama. Djevičanska maslinova ulja proizvedena su u industrijskom mjerilu od maslina spomenutih sorti ubranih u tri stupnja zrelosti i podvrgnuta kemijskoj analizi standardiziranim metodama na osnovi plinske kromatografije. Utvrđeno je da sorta i stupanj zrelosti imaju značajan utjecaj na koncentracije i relativne udjele pojedinačnih i ukupnih sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola u maslinovom ulju, kao i da su utjecaji ta dva faktora međuovisni. Buža se pokazala kao sorta s niskom koncentracijom ukupnih sterola, a Črna kao sorta s potencijalom nakupljanja vrlo visoke koncentracije. Statističkom obradom analizom varijance, analizom glavnih sastavnica i linearnom diskriminantnom analizom utvrđeni su pokazatelji sortnog podrijetla. Utjecaj skladištenja bio je manjih razmjera pa se većina pokazatelja pokazala postojanim i zadržala sposobnost razlikovanja ulja na osnovi sorte i stupnja zrelosti nakon 12 mjeseci.

Ključne riječi: maslina (*Olea europaea* L.), sorta, zrelost, skladištenje, steroli, alifatski i triterpenski alkoholi

Rad sadrži: 196 stranica
70 slika
9 tablica
3 priloga
236 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	dr. sc. *Drago Šubarić,* red. prof.	predsjednik
2.	dr. sc. *Lidija Jakobek Barron*, red. prof.	član
3.	dr. sc. *Anto Mijić,* znanstveni savjetnik	član
4.	dr. sc. *Stela Jokić,* red. prof.	zamjena člana
5.	dr. sc. *Krunoslav* Aladić, doc.	zamjena člana

Datum obrane: 7. srpnja 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku**.**

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study-Food Technology and Nutrition

Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC: 634.63 : 665.327.3(043.3)

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Scientific branch: Engineering
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VII held on April 29, 2021.
Mentor: *Tihomir Moslavac*, PhD, full prof.

INFLUENCE OF VARIETY, DEGREE OF RIPENESS OF OLIVE FRUITS AND STORAGE TEMPERATURE OF VIRGIN OLIVE OIL ON THE COMPOSITION AND CONCENTRATION OF STEROLS, ALIPHATIC AND TRITERPENIC ALCOHOLS

Marina Lukić, 0058131689

Summary: The aim of the study was to characterize virgin olive oils from insufficiently investigated important indigenous olive varieties from the Croatian part of the Istrian peninsula, Buža, Črna and Rosinjola, based on the profile and concentration of sterols and aliphatic and triterpene alcohols. The task was to investigate the extent of the influence of variety and ripening degree, as well as to find analytical indicators of varietal origin and ripening degree and to examine their stability after 12 months of storage at different temperatures. Virgin olive oils were produced at industrial scale from olives of the mentioned varieties harvested at three ripening degrees. Oils were analysed by standardized methods based on gas chromatography. Variety and ripening degree were found to have a significant influence on the concentrations and relative proportions of particular and total sterols and aliphatic and triterpene alcohols in olive oil, and the influences of these two factors were interdependent. Buža proved to be a variety with a low concentration of total sterols, and Črna as a variety with a potential to accumulate very high concentrations. The indicators of varietal origin were determined by statistical analysis, by application of analysis of variance, principal components analysis, and linear discriminant analysis. The impact of storage was weaker, so most of the indicators proved to be stable and retained the ability to differentiate oils based on variety and ripening degree after 12 months.

Key words: olive (*Olea europaea* L.), variety, ripeness, storage, sterols, alifatic and triterpenic alcohols

Thesis contains:
196 pages
70 figures
9 tables
3 supplements
236 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Drago Šubarić*, PhD, full prof.	chair person
2.	*Lidija Jakobek Barron*, PhD, full prof.	member
3.	*Anto Mijić*, PhD, scientific advisor	member
4.	*Stela Jokić*, PhD, full prof.	stand-in
5.	*Krunoslav Aladić*, PhD, assistant prof.	stand-in

Defense date: July 7th 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek.

Prije svega zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Tihomiru Moslavcu, na prihvaćanju mentorstva te pomoći i savjetima u izradi ove doktorske disertacije.

Posebno hvala upućujem prof. dr. sc. Dragi Šubariću, prof. dr. sc. Lidiji Jakobek Barron i dr. sc. Anti Mijiću na raspravi i korisnim savjetima koji su doprinijeli poboljšanju moje doktorske disertacije.

Osjećam veliku zahvalnost prema djelatnicima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku, kako profesorima na studiju koje cijenim zbog visokih standarda studiranja, tako i svim ostalim djelatnicima koje sam imala sreće upoznati, na njihovoj profesionalnosti, etici i najviše od svega na dobrodošlici, ljubaznosti i spremnosti za pomoć.

Puno mi je značila podrška kolega u provođenju ovog istraživanja te bih se zahvalila ravnatelju Instituta za poljoprivredu i turizam, dr. sc. Deanu Banu na povjerenju i podršci svih ovih godina, dr. sc. Barbari Sladonja na ukazanoj prilici, vođenju i podršci te dr. sc Karolini Brkić Bubola, dr. sc. Marinu Krapcu, dr. sc. Danijeli Poljuha i Elvinu Šetiću, dipl.ing. na suradnji u pothvatu istraživanja autohtonih sorti maslina. Još jedno veliko hvala na podršci svim mojim ostalim kolegicama i kolegama u laboratoriju i na Institutu s kojima sam imala sreću surađivati.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju, strpljenju i ohrabrivanju tijekom godina studiranja i u razdoblju izrade i pisanja ovog rada, a posebno mojoj sestri Lei.

Zahvalna sam mojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje i imali vjere u mene, kao i suprugovim roditeljima na podršci i brizi.

Najveća zahvala ide mojem suprugu, na učenju, savjetima i konstruktivnim raspravama, ali i ljubavi i strpljenju tijekom ovog dugog puta. Zahvalna sam mu na preuzimanju obiteljskih obaveza i brige o našoj djeci kako bih uspjela ostvariti ovaj svoj cilj.

Ovaj rad posvećujem našim sinovima Maju i Dorianu.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 6

2.1. DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE 7

2.1.1. Tehnologija proizvodnje, dorada i skladištenje 8

2.1.2. Kategorije kvalitete 9

2.1.3. Autentičnost 9

2.2. POJAVA I ULOGA STEROLA, TRITERPENSKIH DIOLA TE ALIFATSKIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA U BILJKAMA 16

2.2.1. Steroli, triterpenski dioli te alifatski i triterpenski alkoholi u maslinovom ulju 17

2.2.2. Molekularna struktura 19

2.2.3. Razvoj i dozrijevanje ploda masline (*Olea europaea* L.) 21

2.2.4. Biosinteza sterola i triterpenskih alkohola 21

2.2.5. Biosinteza alifatskih alkohola 23

2.3. BLAGOTVORNI UČINAK NA LJUDSKO ZDRAVLJE 25

2.4. UTJECAJ RAZLIČITIH ČIMBENIKA NA SASTAV STEROLA TE ALIFATSKIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA U DJEVIČANSKOM MASLINOVOM ULJU 27

2.4.1. Utjecaj sorte 27

2.4.2. Utjecaj dozrijevanja 33

2.4.3. Utjecaj skladištenja 39

2.4.4. Ostali čimbenici 40

3. EKSPERIMENTALNI DIO 44

3.1. ZADATAK 45

3.2. PLAN POKUSA 45

3.2.1. Odabir sorti 45

3.2.2. Identifikacija istraživanih sorti 46

3.2.3. Karakteristike istraživanih sorti 46

3.2.4. Odabir i opis nasada 47

3.2.5. Određivanje stupnjeva zrelosti plodova maslina 48

3.2.6. Prerada maslina 51

3.2.7. Skladištenje 51

3.3. MATERIJALI 51

3.4. METODE KEMIJSKE ANALIZE 52

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 60

4. REZULTATI 63

4.1. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA STEROLE I TRITERPENSKE DIOLE U SVJEŽIM ULJIMA 64

4.2. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA ALIFATSKE ALKOHOLE U SVJEŽIM ULJIMA 77

4.3. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA TRITERPENSKE ALKOHOLE U SVJEŽIM ULJIMA 85

4.4. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA STEROLE I TRITERPENSKE DIOLE 95

4.5. POSTOJANOST STEROLA I TRITERPENSKIH DIOLA KAO POKAZATELJA SORTE I STUPNJA ZRELOSTI 99

4.6. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA ALIFATSKE ALKOHOLE 105

4.7. POSTOJANOST ALIFATSKIH ALKOHOLA KAO POKAZATELJA SORTE I STUPNJA ZRELOSTI 107

4.8. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA TRITERPENSKE ALKOHOLE 112

4.9. POSTOJANOST TRITERPENSKIH ALKOHOLA KAO POKAZATELJA SORTE I STUPNJA ZRELOSTI 116

5. RASPRAVA 122

5.1. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA SASTAV STEROLA I TRITERPENSKIH DIOLA U SVJEŽIM ULJIMA 123

5.2. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA SASTAV ALIFATSKIH ALKOHOLA U SVJEŽIM ULJIMA 142

5.3. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA SASTAV TRITERPENSKIH ALKOHOLA U SVJEŽIM ULJIMA 151

5.4. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA SASTAV STEROLA I TRITERPENSKIH DIOLA 159

5.5. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA SASTAV ALIFATSKIH ALKOHOLA 164

5.6. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA SASTAV TRITERPENSKIH ALKOHOLA 167

6. ZAKLJUČCI 171

7. LITERATURA 175

8. PRILOZI 193

Popis oznaka, kratica i simbola

24-mkl-rol	24-metilen-kolesterol
ANOVA	analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)
AOAC	Udruženje službenih analitičkih kemičara (engl. *Association of Official Analytical Chemists*)
B-sit-rol	β-sitosterol
CAC	Codex Alimentarius Commission
CDA	Kanonička diskriminantna analiza (*engl. Canonical Discriminant Analysis*)
D5-24-st-dol	$\Delta^{5,24}$-stigmastadienol
D5-avena	Δ^{5}-avenasterol
D7-avena	Δ^{7}-avenasterol
D7-kmp-rol	Δ^{7}-kampesterol
D7-stig-nol	Δ^{7}-stigmastenol
EEZ	Europska Ekonomska Zajednica
EK	Europska Komisija
EPiV	Europski parlament i Vijeće
eritro	eritrodiol
FPP	farnezil-pirofosfat
GC-FID	plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*)
GC-MS	plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)
GFPP	geranil-farnezil-pirofosfat
GGPP	geranil-geranil-pirofosfat
GPP	geranil-pirofosfat
HAPIH	Hrvatska agencija za poljoprivredu, hranu i selo
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)
IOC	Međunarodno vijeće za masline (*International Olive Council*)
IPP	izopentenil-pirofosfat
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

kle-rol	klerosterol
kmp-nol	kampestanol
kmp-rol	kampesterol
kol-rol	kolesterol
LDA	Linearna diskriminantna analiza (engl. *Linear Discriminant Analysis*)
LSD	najmanja značajna razlika (eng. *Least significant difference*) u tzv. Fisherovom LSD testu
MEP	metileritrol-fosfatni put (engl. *Methylerythritol Phosphate*)
MS	varijanca (engl. *Mean Square*)
NCEP	National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (NCEP Adult treatment Panel III)
PCA	Analiza glavnih sastavnica (engl. *Principal Component Analysis*)
RI	indeksi zadržavanja (engl. *Retention Index*)
sito-nol	sitostanol
stig-rol	stigmasterol
SS	Suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti (engl. *Sum of Squares*)
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*)
uk B-sit-rol	ukupni β-sitosterol

1. UVOD

Djevičansko maslinovo ulje dobiva se izravno iz ploda stabla masline (*Olea europaea* L.) isključivo mehaničkim postupcima. Maslinarstvo s proizvodnjom ekstra djevičanskog maslinovog ulja važna je gospodarska grana za zemlje proizvođače pa tako i za Republiku Hrvatsku (RH). U vrijeme rasta maslinarske proizvodnje u RH i izgradnje nacionalnog i regionalnog identiteta na osnovi prirodnih potencijala, postoji potreba za karakterizacijom autohtonih sorti i proizvedenih ekstra djevičanskih ulja po uzoru na ostale tradicionalno maslinarske zemlje. Uz genetičku i morfološku karakterizaciju sorti maslina, stvaranje baze podataka o kemijskom sastavu i ostalim karakteristikama sortnih maslinovih ulja predstavljalo bi osnovu za očuvanje i valorizaciju bioraznolikosti, bolje upravljanje proizvodnjom (sortnih) maslinovih ulja ciljanih karakteristika te izradu robusnijih modela zaštite i promocije putem zaštićenih oznaka podrijetla i kvalitete.

Maslinovo ulje sastoji se od većinske trigliceridne frakcije koja predstavlja više od 98 % ukupne mase ulja. Preostali, iznimno važan dio (otprilike 2 %) čini tzv. neosapunjiva frakcija, sastavljena od oko 230 kemijskih spojeva iz različitih skupina, kojima pripadaju i steroli (fitosteroli ili 4α-desmetil-steroli), alifatski alkoholi i triterpenski alkoholi (4-monometil i 4,4'-dimetil-steroli) uključujući i triterpenske diole eritrodiol i uvaol (Servili i sur., 2013.). Poznavanje sastava i koncentracije spomenutih spojeva u maslinovom ulju od višestruke je važnosti.

Koncentracija ukupnih sterola i alifatskih alkohola te relativni udjeli pojedinih sterola i triterpenskih diola među parametrima su koji se koriste za provjeru i dokazivanje autentičnosti maslinovog ulja već 30 godina, sukladno propisima EU (EK, 2019.). Značajan potencijal kao kemijski pokazatelji autentičnosti maslinovog ulja pokazali su i triterpenski alkoholi (Damirchi i sur., 2005.). Posljednjih godina sve se više bilježe slučajevi odstupanja sastava autentičnih djevičanskih maslinovih ulja od propisanih zahtjeva. Kao mogući uzroci identificirani su berba maslina u sve ranijim stupnjevima zrelosti, prilagodba sorti na nova područja uzgoja te klimatske promjene (Stefanoudaki i sur., 2000.; Rivera del Álamo i sur., 2004.; Ceci i Carelli, 2007.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Mailer i sur., 2010.; Lerma-García i sur., 2011.; Pardo i sur., 2013.; Sena-Moreno i sur., 2015.; Kyçyk i sur., 2016.; Deiana i sur., 2019; Salazar-García i sur., 2019.; Skiada i sur., 2019., 2020.a, 2020.b). Takvi slučajevi nanose štetu proizvođačima i prepreka su nesmetanom odvijanju trgovine. Zbog kasnijeg uvođenja i provođenja propisa u RH, ali i zbog zahtjevnosti metode analize, sastav sterola u uljima autohtonih sorti maslina u Hrvatskoj relativno je neistražen. Utvrđivanje sastava i koncentracija spomenutih skupina spojeva u hrvatskim ekstra djevičanskim maslinovim uljima moglo bi biti važno za predviđanje i upravljanje eventualnim odstupanjima u sastavu od propisanih zahtjeva.

Uz fenole, tokoferole i nezasićene masne kiseline, steroli, triterpenski dioli te alifatski i triterpenski alkoholi važni su nositelji bioaktivnih svojstava maslinovog ulja i doprinose ukupnom blagotvornom učinku na ljudsko zdravlje. Dokazano je da steroli iz maslinovog ulja mogu sniziti razinu LDL-kolesterola u serumu i značajno sniziti rizik od kardiovaskularnih

oboljenja (Piironen i sur., 2000.; NCEP, 2001.; Katan i sur., 2003.). Sterolima se pripisuju i antioksidativna, protubakterijska, protuupalna i protukancerogena svojstva (Piironen i sur., 2000.; Berger i sur., 2004.; Nashed i sur., 2005.; Othman i sur., 2011.; Manai-Djebali i Oueslati, 2017.). Za alifatske alkohole je pokazano da mogu djelovati hipokolesterolemijski, protuupalno i protuagregacijski, slično aspirinu (Fernández-Arche i sur., 2009.; Weerawatanakorn i sur., 2019.), dok je za triterpenske alkohole također dokazan čitav niz blagotvornih učinaka (Stiti i Hartmann, 2012.). Sortna karakterizacija maslinovih ulja na osnovi sastava spomenutih spojeva omogućila bi profiliranje domaćih, hrvatskih sorti pogodnih za proizvodnju i zaštitu ulja s karakterističnim udjelom ovih bioaktivnih sastojaka kao dodatne nutritivne vrijednosti.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da na sastav i koncentraciju sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola u maslinovom ulju utječe veći broj čimbenika (agronomski, zemljopisni, tehnološki), a utjecaji sorte i stupnja zrelosti (termina berbe) identificirani su kao najznačajniji (Matos i sur., 2007.; Stiti i sur., 2007.; Lazzez i sur., 2008.; Sakouhi i sur., 2009.a, 2009.b; Fernández-Cuesta i sur., 2013.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.). Pokazano je da varijabilnost koncentracija određenih važnih sastojaka maslinovog ulja zbog utjecaja sorte i stupnja zrelosti može doseći iste razmjere te je od presudne važnosti uzeti oboje u obzir pri sortnoj karakterizaciji maslinovih ulja (Issaoui i sur., 2008.). Dosad je provedeno nekoliko više ili manje uspješnih pokušaja karakterizacije i razlikovanja maslinovih ulja prema sortnom podrijetlu na osnovi udjela sterola i triterpenskih diola (Bianchi i sur., 2001.; Ranalli i sur., 2002.; López-Cortés i sur., 2013.; Noorali i sur., 2014.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Skiada i sur., 2020.a, 2020.b), ali je samo mali broj istraživanja uzeo u obzir utjecaj zrelosti plodova maslina (Sanchez Casas i sur., 2004.; Matos i sur., 2007.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.). U pojedinim slučajevima, pokazalo se da sastav sterola nije bio dovoljan za potpuno razlikovanje ulja različitih sorti dobivenih od maslina različitog stupnja zrelosti (Matos i sur., 2007.).

Mogućnost razlikovanja djevičanskih maslinovih ulja na osnovi stupnja zrelosti maslina neovisno o sorti također bi mogla biti značajna jer zahtjevi potrošača osviještenih o povezanosti između uvjeta proizvodnje, kao npr. datuma berbe maslina i kvalitete ulja, danas postaju sve specifičniji. Iako su pokušaji istraživanja takvog tipa provedeni, nisu bili u potpunosti uspješni zbog većih kvantitativnih razlika među sortama (Sanchez Casas i sur., 2004.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.) ili su bili ograničeni na ulja samo jedne sorte (Koutsaftakis i sur., 1999.).

Čimbenici koji značajno utječu na kvalitetu maslinovog ulja jesu i trajanje te uvjeti njegovog čuvanja/skladištenja. Utvrđeno je da se koncentracije većine važnih skupina bioaktivnih spojeva iz djevičanskog maslinovog ulja značajno mijenjaju i uglavnom opadaju tijekom starenja ulja. Postoje naznake da steroli ne podliježu tako drastičnim negativnim promjenama tijekom starenja ulja (Rastrelli i sur., 2002.; Thanh i sur., 2006.; Krichene i sur., 2015.; Piscopo

i sur., 2018.; Ghanbari Shendi i sur., 2018.) pa se istraživanje mogućnosti uporabe sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola kao stabilnih pokazatelja sortnog podrijetla i stupnja zrelosti maslina čini opravdanim i za slučaj starijih maslinovih ulja.

Osim što je objavljenih rezultata istraživanja interaktivnog utjecaja sorte i stupnja zrelosti maslina na sastav i koncentraciju sterola i triterpenskih diola, a posebno alifatskih i triterpenskih alkohola u postojećoj literaturi izrazito malo, istovjetnih podataka koji se odnose na djevičanska maslinova ulja od gospodarski važnih hrvatskih sorti gotovo da i nema. Slično, utjecaj čuvanja djevičanskog maslinovog ulja u različitim uvjetima na koncentracije spomenutih spojeva općenito je vrlo slabo istražen.

Osnovna hipoteza ovog istraživanja bila je da se maslinova ulja važnih hrvatskih autohtonih sorti maslina u Istri razlikuju na osnovi sastava i koncentracija sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola te da na iste spojeve značajno utječe i stupanj zrelosti plodova maslina. Pretpostavljeno je da unatoč međusobnoj interakciji utjecaja sorte i stupnja zrelosti, određeni steroli te alifatski i triterpenski alkoholi mogu poslužiti kao analitički pokazatelji sortnog podrijetla i/ili stupnja zrelosti maslina te da je njihova stabilnost postojana i nakon određenog razdoblja čuvanja/skladištenja ulja. Shodno tome, definirani ciljevi istraživanja u okviru disertacije bili su sljedeći:

- okarakterizirati i usporediti djevičanska ulja važnih hrvatskih autohtonih sorti maslina (Buža, Črna i Rosinjola) u Istri, na osnovi sastava i koncentracija sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola;
- utvrditi utjecaj stupnja zrelosti plodova maslina spomenutih sorti na sastav i koncentracije sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola u proizvedenim uljima;
- istražiti utjecaj različitih temperatura čuvanja maslinovog ulja na sastav i koncentraciju spomenutih spojeva te
- utvrditi analitičke pokazatelje sortnog podrijetla neovisne o utjecaju stupnja zrelosti, odnosno
- utvrditi analitičke pokazatelje stupnja zrelosti plodova neovisne o utjecaju sorte među ispitivanim spojevima iz maslinovog ulja, te ispitati njihovu stabilnost i pouzdanost nakon određenog razdoblja čuvanja/skladištenja ulja na različitim temperaturama.

Očekivano je da će se u ovom radu doći do novih spoznaja o specifičnostima kemijskog sastava djevičanskih maslinovih ulja od istraživanih sorti. Dobivena saznanja trebala bi omogućiti usporedbu profila odabranih skupina spojeva izučavanih ulja s profilima ulja od globalno značajnih sorti o kojima postoje objavljeni podaci, što će predstavljati temelj za razlikovanje i utvrđivanje povezanosti specifičnih svojstava maslinovih ulja s područjem hrvatske regije Istre, a što može biti osnova za izradu robusnijih modela njihove zaštite od postojećih. Također, dobivena saznanja predstavljat će osnovu za profiliranje domaćih, hrvatskih sorti pogodnih za proizvodnju i zaštitu ulja s višim udjelom ovih bioaktivnih spojeva.

Rezultati ovog rada trebali bi rezultirati novim spoznajama o dinamici akumulacije sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola tijekom dozrijevanja plodova autohtonih sorti maslina u specifičnim agro-klimatskim uvjetima istarskog poluotoka. Dobiveni podaci bit će korisni u svrhu upravljanja proizvodnjom kako bi se ciljano proizvelo maslinovo ulje s povišenim udjelom tih bioaktivnih sastojaka. Kako je podataka o utjecaju stupnja zrelosti plodova na koncentracije alifatskih i triterpenskih alkohola u postojećoj literaturi iznimno malo, dobiveni rezultati produbit će i globalno znanje o tim pojavama u maslinarstvu.

Multivarijatnim kemometrijskim statističkim metodama pokušat će se utvrditi prikladnost koncentracija i omjera pojedinih spojeva kao analitičkih pokazatelja sortnog podrijetla ulja neovisnih o utjecaju stupnja zrelosti maslina, i obrnuto. Izradit će se statistički modeli za karakterizaciju i razlikovanje ulja različitog sortnog podrijetla s obuhvaćenim utjecajem stupnja zrelosti maslina, kao i statistički modeli za utvrđivanje univerzalnih analitičkih pokazatelja stupnja zrelosti maslina različitih sorti, što će omogućiti potpuniju karakterizaciju sortnih maslinovih ulja.

U ovom istraživanju po prvi put će se istražiti utjecaj određenog razdoblja čuvanja maslinovog ulja na temperaturama hlađenja i zamrzavanja (uobičajenima za konzerviranje drugih prehrambenih proizvoda) na sastav i koncentracije sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola, u usporedbi s čuvanjem na sobnoj temperaturi čiji je utjecaj također općenito slabo istražen. Isto tako, po prvi put će se provjeriti stabilnost tih spojeva kao pouzdanih analitičkih pokazatelja sorte i stupnja zrelosti maslina nakon određenog razdoblja čuvanja/starenja ulja, što bi se moglo pokazati korisnim za provjeru autentičnosti deklariranog sortnog podrijetla i/ili stupnja zrelosti starijih ulja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE

Pored žitarica, voća i povrća, u Mediteranskoj prehrani djevičansko maslinovo ulje istaknuto je kao glavni izvor masnoća. Ono je neizostavan dio ne samo prehrane već i tradicije, povijesti i kulture zemalja Mediterana u kojima je koncentrirano 95 % svjetske proizvodnje maslinovog ulja. Najveće zemlje proizvođači maslinovog ulja danas su Španjolska, Italija, Grčka, Turska i Tunis (**Prilog 1)** (IOC, 2020.b).

S proizvodnim udjelom koji je na razini 0,1 % svjetske i 0,2 % europske proizvodnje (**Prilog 1**) (IOC, 2020.b), u RH posljednjih godina kontinuirano raste interes za proizvodnjom maslinovog ulja. Istovremeno, RH ne proizvodi dostatne količine maslinovog ulja za domaću potrošnju pa više od polovice potrošnje maslinovog ulja pokriva uvozom (Ministarstvo poljoprivrede RH, 2021.). Moguće je da je jedan od razloga negativne vanjskotrgovinske bilance, uz nisku razinu potrošnje maslinovog ulja u RH u usporedbi s ostalim zemljama Mediterana, i visoka cijena ovog poljoprivredno-prehrambenog proizvoda (DZS, 2018.b).

Obilježja uzgoja maslina i proizvodnje maslinovog ulja na priobalnom području RH uvjetovana su prirodnim ograničenjima kao što su brdovita i teško pristupačna područja, razvedena obala s velikim brojem otoka i krško tlo. Poljoprivredna površina rascjepkana je na velik broj manjih zemljišnih čestica pa je uzgoj maslina postao uglavnom poljoprivredna djelatnost za vlastite potrebe koja se može razviti kao poluprofesionalna djelatnost, komplementarno s uzgojem vinove loze i turizmom. U RH je većina stabala maslina (oko 96 %) u vlasništvu obiteljskih gospodarstava te jedan maslinar u prosjeku održava preko 100 stabala maslina. Široka rasprostranjenost i udaljenost nasada uvjetovala je također i velik broj uljara (oko 160), uglavnom s malim preradbenim kapacitetima (oko 1.300 kg/h) (Ministarstvo poljoprivrede RH, 2021.).

S obzirom na navedena obilježja maslinarstva i uljarstva u RH, proizvodni troškovi maslinovog ulja skuplji su u odnosu na superintenzivnu proizvodnju kakva je na primjer moguća i česta u Španjolskoj, međutim to je istovremeno i najveća prednost ovdašnje proizvodnje. Naime, način uzgoja maslina na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima omogućuje veću brigu za kvalitetu sirovine, što je osnovni preduvjet u postizanju vrhunske kvalitete maslinovog ulja. Veća mogućnost prilagodbe proizvodnje ogleda se i u proizvodnji proizvoda sa specifičnim sortnim karakteristikama u okusu i mirisu što se obično postiže ranijom berbom, nerijetko uz male randmane. Velika pokrivenost uljarama osigurava brzu preradu u maslinovo ulje te je u posljednjih 20 godina ekstra djevičansko maslinovo ulje vrhunske kvalitete postalo imperativ u domaćoj proizvodnji.

Takav skupi i visokovrijedni proizvod potrebno je dodatno valorizirati, zaštititi i brendirati kako bi opravdao visoku cijenu proizvodnje. Hrvatska danas ima čak šest zaštićenih oznaka izvornosti (ZOI) za ekstra djevičansko maslinovo ulje (Cres, Krčko, Korčulansko, Šoltansko,

Istra, Bračko) i velik broj brandova pojedinačnih većih proizvođača koji su prepoznati i na svjetskoj razini. Postojeći oblici zaštite i marketinške promocije dodatno povećavaju troškove proizvodnje, ali je trenutno potražnja za proizvodima s dodanom vrijednosti i osiguranom sljedivosti velika pa se može zaključiti da je ovaj model uljarstva u RH održiv.

Ovako dobiven visokovrijedan proizvod ima potencijal biti okarakteriziran i dodatnom nutritivnom vrijednosti koja proizlazi iz njegovih prirodnih sastojaka s bioaktivnim djelovanjem zbog čega se maslinovo ulje može svrstati u prirodnu funkcionalnu hranu (Papanikolau i sur., 2019.). Na maslinovo ulje mogu se primijeniti čak tri odobrene zdravstvene tvrdnje koje se zasnivaju na različitim blagotvornim dugoročnim učincima određenih sastojaka maslinovog ulja na ljudski organizam (**Prilog 2**) (EPiV, 2014.; EPiV, 2018.; EK, 2021.).

2.1.1. Tehnologija proizvodnje, dorada i skladištenje

Masline se beru ručno, ručnim ili strojnim tresačima u superintenzivnim nasadima, sakupljaju se u perforirane plastične sanduke ili mreže te se odvoze u uljaru. U idealnom slučaju, zdravi cjeloviti plodovi odmah idu u proces prerade koji uključuje uklanjanje listova u struji zraka, pranje u tehnološkoj (vodovodnoj) vodi, mljevenje mlinovima čekićarima ili s diskovima te se tijesto od samljevenih maslina odvodi u spremnike u kojima se provodi malaksacija, odnosno miješenje tijesta. Brojna istraživanja dokazala su da su parametri miješenja među najvažnijim za kvalitetu vrhunskog maslinovog ulja jer se za to vrijeme razvijaju hlapljivi spojevi arome pod utjecajem nekoliko vrsta enzima. Miješenje može trajati od 15 do 90 minuta, idealno pri temperaturi nižoj od 27 °C (hladni postupak), ali je moguće zagrijati tijesto dodavanjem tople vode radi lakše i bolje ekstrakcije, odnosno povećanja prinosa ulja po masi ploda (Koprivnjak, 2006.).

Nakon faze miješenja ulje se izdvaja ekstrakcijom u centrifugalnim horizontalnim separatorima. Dvofaznom tehnologijom prerade u procesu centrifugiranja razdvaja se uljni mošt kao jedna faza od ostalih dijelova plodova masline (usitnjeni dijelovi pokožice i tkiva, samljevena koštica) u obliku polutekuće (vlažne) komine kao druge faze. U trofaznoj tehnologiji prerade dodaje se tehnološka (vodovodna) voda u tijesto maslina u količini od 50 do 100 % u odnosu na masu maslina. Na kraju procesa ekstrakcije izdvajaju se uljni mošt kao prva, tekuća faza (biljna i tehnološka voda) kao druga i žitka (suha) komina kao treća faza (Koprivnjak, 2006.).

Zaostala voda i čvrsti dijelovi ploda mogu se nakon prerade ili naknadno ukloniti filtracijom najčešće koristeći filtar preše s celuloznim filterima koji zadržavaju vodu i čvrste čestice. Međutim, u proizvodnji maslinovog ulja na malim obiteljskim gospodarstvima bistrenje se provodi taloženjem i dekantiranjem (otakanjem) 1-4 mjeseca nakon prerade. Maslinovo ulje odvaja se dekantiranjem ulja od taloga na dnu spremnika koji se vremenom izdvojio pod utjecajem sile gravitacije i koji sadrži kapljice vode i čvrste čestice. Na taj način sitne kapljice

vode spajaju se u veće. Brzina i uspješnost taloženja u značajnoj mjeri ovisi o temperaturi (Koprivnjak, 2006.).

Osnovni sastojci ili gradivne jedinice maslinovog ulja su molekule triglicerida (98 % ukupne mase ulja) sastavljene od jedne molekule alkohola glicerola s kojim su esterskim vezama vezane po tri molekule masnih kiselina. Trigliceridi maslinovog ulja obiluju jednostruko i višestruko nezasićenim masnim kiselinama (oleinska, palmitoleinska, linolna i linolenska), dok su zasićene masne kiseline (palmitinska, stearinska) zastupljene u relativnom udjelu od ukupno oko 15 %. Određeni udio masnih kiselina u maslinovom ulju nalazi se u slobodnom obliku.

Preostali sastojci djevičanskog maslinovog ulja koji su pojedinačno zastupljeni s malim udjelom i ukupno čine otprilike 2 % mase ulja uobičajeno se nazivaju neosapunjivi sastojci maslinovog ulja. U neosapunjivoj frakciji maslinovog ulja nalazi se više od 230 različitih skupina prirodnih kemijskih spojeva, između ostalih i fenoli, tokoferoli, hlapljivi spojevi arome, voskovi, ugljikovodici, karotenoidi i drugi te konačno steroli, alifatski i triterpenski alkoholi (Servili i sur., 2014.).

2.1.2. Kategorije kvalitete

Maslinovo ulje dobiva se izravno iz ploda stabla masline (*Olea europaea* L.) isključivo mehaničkim postupcima te na taj način ostaje nepromijenjeno u svom osnovnom sastavu u odnosu na sastav ulja u plodu, zbog čega se i naziva „djevičanskim“. S obzirom na određene parametre kvalitete (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, apsorbancija UV zračenja, etilni esteri masnih kiselina, prisutnost pozitivnih mirisnih svojstava te odsustvo defekata u mirisu) tržišni standardi razlikuju tri kategorije kvalitete djevičanskog maslinovog ulja:

1. ulje visoke kakvoće svrstava se u kategoriju Ekstra djevičansko,
2. ulje narušene kvalitete kategorizira se kao Djevičansko, a
3. maslinovo ulje koje je u velikoj mjeri degradirano svrstava se u kategoriju Lampante; ulja iz te kategorije nisu jestiva te prema tome niti namijenjena izravnoj prodaji potrošaču, već se moraju podvrgnuti postupcima procesa rafinacije da bi se učinila prihvatljivim za konzumaciju (EK, 2019.; IOC, 2021.; CAC, 2021.b).

2.1.3. Autentičnost

Ekstra djevičansko maslinovo ulje cijenjeno je među potrošačima zbog svog specifičnog mirisa, okusa i nutritivnih svojstava. Zbog svoje ekonomske važnosti, često je predmet prijevare patvorenjem i pogrešnim označavanjem. Europska unija (EU) općenito uređuje tržište ulja od ploda i komine maslina Uredbom Komisije (EK, 2019.) kojom se, između ostalog, utvrđuju određeni kemijski i senzorni parametri s pripadajućim dopuštenim graničnim

vrijednostima ili intervalima te metodama kemijskog, odnosno senzornog ispitivanja. Službenim kontrolama na osnovi Uredbe Komisije moguće je otkriti patvorenje djevičanskog maslinovog ulja rafiniranim i/ili drugim biljnim uljima, kao i krivo deklariranje više kategorije kvalitete maslinovog ulja od stvarne. U EU je većina ekstra djevičanskih maslinovih ulja visoke kvalitete dodatno zaštićena zaštićenom oznakom izvornosti (ZOI) (EPiV, 2021.). Maslinovo ulje označeno sa ZOI proizvodi se u skladu sa skupom specifičnih zahtjeva koje propisuje nositelj oznake u dokumentu specifikacije, koji regulira aspekte kao što su dopuštene sorte maslina, uvjeti uzgoja, uvjeti berbe i prerade maslina te dorade i čuvanja ulja, kao i njegova specifična fizikalno-kemijska i senzorna svojstva.

Među kemijskim parametrima (ekstra) djevičanskog maslinovog ulja koji su regulirani Uredbom Komisije (EK, 2019.) jesu i koncentracija i sastav sterola i triterpenskih diola. Biosinteza sterola uvjetovana je biljnom vrstom te se biljna ulja međusobno razlikuju prema profilu sterola, stoga se njihov sastav ili relativni omjeri koriste kao parametri čistoće ili autentičnosti djevičanskog maslinovog ulja. U **Tablici 1** prikazane su granice propisane Uredbom Komisije (EK, 2019.) i tržišnim standardom Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2021.) za pojedinačne sterole i triterpenske diole, kao i za minimalni sadržaj ukupnih sterola u kategorijama ekstra djevičanskog i djevičanskog maslinovog ulja. Također su prikazani podaci o sadržaju tih i drugih važnih sterola u maslinovom ulju koji nisu obuhvaćeni Uredbom Komisije (EK, 2019.) kako bi se omogućila bolja usporedba sa sastavom sterola drugih biljnih ulja. U **Tablici 1** nadalje prikazani su rasponi u kojima se određeni steroli prirodno nalaze u raznim drugim sirovim biljnim uljima (CAC, 2021.a).

Odstupanja od graničnih vrijednosti pojedinih sterola i triterpenskih diola u djevičanskom maslinovom ulju propisanih Uredbom tumače se kao nedeklarirana prisutnost drugih biljnih ulja u djevičanskom maslinovom ulju, što se smatra prijevarom potrošača te se tretira kao prekršaj u pravnom smislu. Na primjer, na temelju podataka prikazanih u **Tablici 1**, povišena razina kolesterola u maslinovom ulju ukazuje na prisutnost životinjske masti (Goudjil i sur., 2003.) ili frakcije palminog ulja (Mozzon i sur., 2015.). Ulje sjemenki rajčice još je jedan primjer ulja biljnog porijekla s visokim udjelom kolesterola (Giuffrè i Capocasale, 2016.). Viša razina brasikasterola specifična je za ulje uljane repice ili uljane repice sa smanjenim sadržajem eruke kiseline (*Brassicaceae*), tako da povišeni udio ovog sterola u maslinovom ulju ukazuje na patvorenje s uljem uljane repice. Veći udio kampesterola tipičan je za određena sjemenska ulja, dok povišene razine stigmasterola i Δ^7-stigmastenola ukazuju na prisutnost ulja iz biljaka obitelji Astera (*Asteraceae* ili *Compositae*), kao što su ulje suncokreta i šafrana (CAC, 2021.a; Grob i sur., 1994.; Alonso i sur., 1997.). U ranijem istraživanju, kumulativni udio kampesterola i stigmasterola poslužio je kao marker za otkrivanje već samo 5 % biljnog ulja drugog podrijetla u ekstra djevičanskom maslinovom ulju (Al-Ismail i sur., 2010.). Uredbom Komisije propisan je najmanji dopušteni udio tzv. prividnog ili ukupnog β-sitosterola, koji predstavlja zbroj relativnih

udjela β-sitosterola, $\Delta^{5,23}$-stigmastadienola, sitostanola, Δ^{5}-avenasterola, $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola i klerosterola (EK, 2019.). Stoga se visoki udio β-sitosterola i Δ^{5}-avenasterola s niskim relativnim udjelima kampesterola i stigmasterola u usporedbi s uljima drugih spomenutih biljnih vrsta mogu smatrati specifičnostima maslinovog ulja. Uredbom Komisije propisana je minimalna koncentracija ukupnih sterola u maslinovom ulju od 1000 mg/kg (100 mg/100 g), što se smatra prirodno dostižnom koncentracijom za sva hladno prešana maslinova ulja (EK, 2019.), dok niža koncentracija upućuje na postupak rafinacije (Aparicio i sur., 2013.). Relativni udio eritrodiola i uvalola u odnosu na zbroj ukupnih sterola i ta dva triterpenska diola, viši od najviše dopuštene granice u jestivim maslinovim uljima od 4,5 % (EK, 2019.), upućuje na dodatak ulja komine masline ili čak ulja sjemenki grožđa u maslinovo ulje, s obzirom da se ti spojevi ekstrahiraju organskim otapalom i to ponajviše iz pokožice plodova masline zaostalih u komini (ostatku prerade maslina) u postupku dobivanja sirovog ulja komine maslina (Conte i sur., 2020.; CAC, 2021.b).

Ulje lješnjaka ima sastav vrlo sličan maslinovom ulju s obzirom na sastav triglicerida, masnih kiselina i sterola, odnosno 4-desmetil-sterola. Kada je proizvodnja lješnjaka u suvišku, na tržištu se mogu naći jeftina hladno prešana ulja lješnjaka koja se koriste za ilegalno miješanje s maslinovim uljem. Sastav ostalih triterpenoida u maslinovom ulju, odnosno triterpenskih alkohola iz podskupina 4-metil-sterola i 4,4′-dimetil-sterola, uspješno je korišten za razlikovanje maslinovog ulja od ulja lješnjaka (Azadmard-Damirchi i Dutta, 2006.). Zadovoljavajuće razlikovanje postignuto je i korištenjem sastava slobodnih i esterificiranih sterola (Mariani i sur., 1999.). Mariani i suradnici (1999., 2006.) predložili su indeks izračunat prema jednadžbi $R_1 = kampesterol \times (\Delta^7\text{-}stigmastenol)^2 / \Delta^7\text{-}avenasterol$ u frakciji esterificiranih sterola i utvrdili da je uvijek manji ili jednak jedan za čista maslinova ulja. Cercaci i sur. (2007.) potvrdili su valjanost predloženog indeksa, nazvanog „Marianijev omjer”, R_{MAR}.

Koncentracija ukupnih alifatskih alkohola također je jedan od parametara koji se koristi za kontrolu autentičnosti maslinovih ulja. U kombinaciji s informacijom o ukupnoj koncentraciji voskova i zbroju relativnih udjela eritrodiola i uvaola može se koristiti za potvrdu pripadnosti kategorijama maslinovog ulja lampante i sirovog ulja komine maslina (EK, 2019.).

Tablica 1 Razine sterola u djevičanskom maslinovom ulju i u imenovanim sirovim biljnim uljima prema tržišnim standardima i propisima EU (EK, 2019.; IOC, 2021.; CAC, 2021.a, 2021.b)

Sterol/parametar (jedinica)	Djevičansko maslinovo ulje[1]	Repičino ulje s niskim udjelom eruka kiseline	Sojino ulje	Suncokretovo ulje	Suncokretovo ulje s visokim udjelom oleinske kiseline	Palmino ulje	Ulje kukuruznih klica	Lješnjakovo ulje
Kolesterol (%)	≤ 0,5	ND[2]–1,3	0,2–1,4	ND–0,7	ND–0,5	2,6–6,7	0,2–0,6	ND–1,1
Brasikasterol (%)	≤ 0,1	5,0–13,0	ND–0,3	ND–0,2	ND–0,3	ND	ND-0,2	ND
Kampesterol (%)	≤ 4,0[1]	24,7–38,6	15,8–24,2	6,5–13,0	5,0–13,0	18,7–27,5	16,0–24,1	3,0–6,2
Stigmasterol (%)	< Kampesterol	0,2–1,0	14,9–19,1	6,0–13,0	4,5–13,0	8,5–13,9	4,3–8,0	ND–2,0
β-Sitosterol (%)	(najzastupljeniji)	45,1–57,9	47,0–60	50–70	42,0–70	50,2–62,1	54,8–66,6	76,45–96,0
Δ^5-Avenasterol (%)	(2. najzastupljeniji)	2,5–6,6	1,5–3,7	ND–6,9	1,5–6,9	ND-2,8	1,5–8,2	1,0–5,1
Δ^7-Stigmastenol (%)	≤ 0,5[1]	ND-1,3	1,4–5,2	6,5–24,0	6,5–24,0	0,2–2,4	0,2–4,2	ND–4,3
Δ^7-Avenasterol (%)	(Nije definirano)	ND–0,8	1,0–4,6	3,0–7,5	ND–9,0	ND–5,1	0,3–2,7	ND–1,6
App. β-sitosterol [3] (%)	≥ 93,0	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)
Ostali (%)	(Nije definirano)	ND–4,2	ND–1,8	ND–5,3	3,5–9,5	ND	ND–2,4	ND
Ukupni steroli (mg/kg)	≥ 1000	4500–11,300	1800–4500	2400–5000	1700–5200	300–700	7000–22,100	1200–1800
Eritrodiol + uvaol (%)	≤ 4,5	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)	(Nije definirano)

Rasponi/granice označene podebljanim slovima označavaju specifičnosti ulja drugih biljnih vrsta s obzirom na maslinovo ulje. (EK, 2019.) [1] Ekstra djevičansko maslinovo ulje kao tržišna kategorija kako je definirano Uredbom Komisije 2568/91 i Tržišnim standardom IOC-a; iznimke od granica u tablici: ako je relativni udio kampesterola > 4.0 i ≤ 4,5 % ili Δ^7-stigmastenol > 0,5 i ≤ 0,8 %, ulje mora udovoljavati određenim strožim kriterijima za druge parametre kako je specificirano u ovim dokumentima. [2] ND – nije detektirano, definirano kao ≤ 0,05 %. [3] App. β-sitosterol – prividni ili ukupni β-sitosterol je suma relativnih udjela: β-sitosterola, Δ^5-avenasterola, $\Delta^{5,23}$-stigmastadienola, klerosterola, sitostanola i $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola.

Metode analize sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola

Metoda analize sterola i triterpenskih diola u maslinovom ulju korištena u većini do danas objavljenih studija standardna je metoda IOC-a koja se primjenjuje u zemljama članicama EU, a trenutno je na snazi njena peta revizija (IOC, 2020.a). Ova metoda također je usvojena kao službena Uredbom Komisije EU 2568/91 i kasnijim izmjenama i dopunama (EK, 2019.), a koristi se za službene kontrole maslinovog ulja na tržištu EU. Primjenjuje se i u realnom sektoru, odnosno u laboratorijima unutar tvrtki koje proizvode ili kupuju te pakiraju i stavljaju maslinovo ulje na tržište. Na metodu IOC-a upućuje i međunarodni standard Codex Alimentarius za maslinova ulja i ulja od komine masline „CODEX STAN 33-1981“ (CAC, 2021.b), koji se primjenjuje u međunarodnoj trgovini i za regulaciju tržišta maslinovog ulja u zemljama koje su pretežno uvoznici (ne EU). Ovu metodu je također usvojila i Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) u standardnoj metodi 'ISO 12228, dio 2' (ISO, 2014.) te je ISO metoda za određivanje sadržaja pojedinačnih i ukupnih sterola u uljima od ploda i komine maslina postala tehnički identična standardnoj metodi IOC-a (IOC, 2020.a). 'Službena metoda Ch 6-91′ Američkog društva kemičara za ulja (American Oil Chemists' Society, AOCS) također se sastoji od istih postupaka (AOCS, 1997.). Osim što se koristi za ispitivanje autentičnosti maslinovog ulja na tržištu, metoda IOC-a (IOC, 2020.a) koja je usvojena kao službena Uredbom Komisije EU 2568/91 (EK, 2019.) daleko je najšire korištena u znanstvenim istraživanjima sterola i triterpenskih diola te alifatskih alkohola u maslinovom ulju.

Službena metoda (EK, 2019.; IOC, 2020.a) sastoji se od sljedećih koraka:

1. Saponifikacija i ekstrakcija neosapunjive frakcije maslinovog ulja organskim otapalom dietil eterom (tzv. ekstrakcija tekuće-tekuće), nakon čega slijedi dodatno odluživanje i uklanjanje vode iz eterskog ekstrakta;
2. Odvajanje sterola i triterpenskih diola od ostalih skupina spojeva neosapunjive frakcije (alifatski i triterpenski alkoholi, tokoferoli, polifenoli) tankoslojnom kromatografijom (engl. *thin-layer chromatography*, *TLC*) organskim otapalom na pločama sa slojem silikagela;
3. Eluiranje frakcije sterola i triterpenskih diola iz odgovarajuće frakcije/sloja na ploči silika gela organskim otapalom, derivatizacija u trimetilsilil etere (sililacija) i razdvajanje plinskom kromatografijom (engl. *gas chromatography*, *GC*);
4. Detekcija sterola i triterpenskih diola pomoću plinskog kromatografa s plamenom ionizacijskim detektorom i identifikacija usporedbom s referentnim kromatogramom iz službene metode i vremenima zadržavanja u odnosu na unutarnji standard (α-kolestanol ili betulin);
5. Kvantifikacija na temelju koncentracije unutarnjeg standarda dodanog u uzorak na početku analize, uz pretpostavku da je faktor odziva jednak jedan.

Kao rezultat analize izražava se koncentracija ukupnih (vezanih i slobodnih) sterola (mg/kg ili mg/100 g) i relativni udjeli (%) pojedinih sterola u odnosu na zbroj svih sterola. Relativni udjeli mogu se izračunati iz koncentracija ili jednostavno iz površina kromatografskih pikova, tj. moguće je koristiti unutarnji standard za izražavanje koncentracija svakog sterola sadržanog u analiziranom maslinovom ulju (mg/kg), iako to nije zahtjev standardne metode iz Uredbe Komisije. Metoda omogućava analizu 14 glavnih sterola zajedno s triterpenskim diolima eritrodiolom i uvaolom, a također je moguće identificirati i kvantificirati dva sterola koja nisu karakteristična za maslinovo ulje, brasikasterol i ergosterol.

Zbog velikog broja dugih pripremnih koraka prije kromatografske analize, službena metoda (EK, 2019.; IOC, 2020.a) prilično je dugotrajna. Uključuje korištenje značajnih količina određenih toksičnih i mutagenih kemikalija (organska otapala) i proizvodi značajnu količinu opasnog otpada. Nadalje, metoda zahtijeva višu razinu obuke osoblja i laboratorijske opreme pa se smatra relativno složenom i skupom. Iz tih razloga ulažu su napori da se postupak pojednostavi i smanji količina opasnih otapala. S druge strane, metoda je vrlo robusna ako se analitički postupak primjenjuje u potpunosti i prema uputama i ima vrlo dobre validacijske parametre, kao što je relativna standardna devijacija u uvjetima ponovljivosti i obnovljivosti (IOC, 2020.a) pa je i dalje referentna metoda za analizu sterola i triterpenskih diola u maslinovom ulju.

Uredba Komisije predlaže i službenu metodu za analizu alifatskih alkohola (EK, 2019.; IOC, 2020.a). Metoda je u osnovi jednaka kao i prethodno opisana metoda analize sterola i triterpenskih diola, osim što se alifatski alkoholi izdvajaju iz druge frakcije/sloja na ploči silika gela. Iz iste frakcije analiziraju se i triterpenski alkoholi, odnosno 4-metil-steroli i 4,4'-dimetil-steroli (Azadmard-Damirchi i Dutta, 2006.), iako njihova analiza nije do kraja standardizirana.

Za analizu sterola te alifatskih i triterpenskih diola koriste se i druge tehnike i metode. Osim standardne plinske kromatografije (GC) (Olmo-García i sur., 2019.; Almeida i sur., 2020.) korištena je i dvodimenzionalna plinska kromatografija (GC×GC) (Purcaro i sur., 2015.; Aloisi i sur., 2020.), i to u vezanim sustavima s različitim spektrometrima masa kao detektorima (engl. *mass spectrometer*, *MS*). Takve metode pokazale su niz prednosti, kao što su jednostavnija priprema uzoraka, povećana osjetljivost i sposobnost analize više različitih grupa spojeva. Ipak, ove metode uglavnom su bile usmjerene samo na analizu glavnih sterola. Metode temeljene na kromatografiji i spektrometriji masa za analizu bioaktivnih spojeva iz maslinovog ulja, uključujući sterole i triterpenske alkohole, nedavno su sažete u detaljnom preglednom članku Olmo-Garcíe i suradnika (2021.).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, *HPLC*) u kombinaciji s različitim sustavima detekcije, često vezana sa spektrometrijom masa, također se koristila za analizu sterola i triterpenskih alkohola u maslinovom ulju. Priprema uzoraka za takvu analizu uglavnom je uključivala korake iz

službene metode (EK, 2019.; IOC, 2020.a), ali bez sililacije (Cañabate Díaz i sur., 2007.; Lerma-García i sur., 2009.; Mo i sur., 2013.; Abdallah i sur., 2018.). Takve metode omogućile su analizu manjeg broja sterola od službene metode, a u nekim slučajevima analizirani spojevi nisu bili u potpunosti razdvojeni tekućinskim kromatografom. U posljednjoj reviziji IOC metode (IOC, 2020.a), odvajanje preparativnom tekućinskom kromatografijom pomoću kolone s punjenjem od silikagela i detekcijom na osnovi adsorpcije ultraljubičastog zračenja ili na osnovi indeksa refrakcije predloženo je kao alternativa tankoslojnoj kromatografiji kao referentnoj tehnici razdvajanja.

Posljednjih godina korištenje moćnih insturmenata i primjena metabolomskog pristupa omogućili su identifikaciju i relativnu kvantifikaciju mnogo većeg broja sterolnih spojeva u maslinovom ulju, što zasigurno predstavlja jedan od najperspektivnijih pravaca istraživanja u okviru ove teme u budućnosti. Na primjer, nakon jednostavne ekstrakcije u 80 %-tnom metanolu (v/v) i analize tekućinskom kromatografijom s ultravisokim tlakom u sprezi s hibridnom spektrometrijom masa na osnovi kvadrupola i vremena preleta iona (engl. *ultra-high-pressure liquid chro-matography with electrospray quadrupole-time-of-flight hybrid mass spectrometry*, UHPLC-ESI/QTOF-MS), pojedine istraživačke grupe predložile su identitetificiranje nekoliko stotina različitih sterola (Mohamed i sur., 2018.; Ghisoni i sur., 2019.).

Do danas predložene alternativne hibridne metode zasnovane na kombinaciji, odnosno vezanim sustavima tekućinske i plinske kromatografije (LC-GC) za analizu sterola te triterpenskih alkohola u maslinovom ulju predstavljene su u nedavnom preglednom članku Contea i suradnika (2020.). Takve metode karakterizira kraće trajanje i smanjena upotreba toksičnih otapala, kao i povećana osjetljivosti uz nizak rizik od kontaminacije uzorka, ali zahtijevaju visoko specijaliziranu instrumentaciju. Kvantitativni rezultati dobiveni najnovijim izdanjem norme (IOC, 2020.a), koja je uključivala potpuno automatiziranu saponifikaciju i ekstrakciju praćenu LC-GC analizom bez prethodne derivatizacije, bili su u potpunosti usporedivi s ISO metodom (Nestola i Schmidt, 2016.).

Neke druge tehnike također su se pokazale uspješnima u kvantificiranju ukupnih i/ili pojedinih skupina sterola u maslinovom ulju, kao što je nuklearna magnetska rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*, *NMR*) (Hatzakis i sur., 2010.), infracrvena spektroskopija u bliskom području s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform near infrared*, *FT-NIR*) (Özdemir i sur., 2018.), i druge.

Steroli i triterpenski alkoholi u maslinama i maslinovom ulju pojavljuju se u slobodnom i vezanom obliku, esterificirani s masnim ili fenolnim kiselinama ili vezani s molekulama šećera u glikozide koji mogu, ali ne moraju biti acilirani. Informacije o udjelima slobodnih sterola i sterilnih estera gube se standardnom analizom sterola, jer ona uključuje saponifikaciju u početnoj fazi pripreme uzorka (Panagiotopoulou i Tsimidou, 2002.). Omjer sterola u

slobodnom i vezanom obliku korišten je za razlikovanje biljnih ulja različitog podrijetla (Grob i sur., 1989.; Verleyen i sur., 2002.). Također se pokazalo da analiza slobodnih i esterificiranih sterolnih oblika može ukazati na prisutnost ulja lješnjaka u maslinovom ulju (Mariani i sur., 2006.). U istraživanjima u kojima su određivani udjeli slobodnih i vezanih sterola, za pripremu uzoraka prije kromatografske analize redovito je korištena ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction, SPE*), uglavnom na kolonama punjenim silikagelom (Mariani i sur., 2006.; Cunha i sur., 2006.; Valli i sur., 2021.).

Gómez-Coca i suradnici (2013.) razvili su metodu za istovremeno određivanje slobodnih i esterificiranih glukozida sterola. Nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) i eluiranja s kloroformom/metanolom, glukozidi su analizirani: (I) plinskokromatografskom analizom oslobođenih masnih kiselina i derivatiziranih glukozida sterola nakon pethodne hidrolize esterificiranih steril glukozida, odnosno (II) izravnom analizom pojedinačnih esterificiranih glukozida sterola pomoću tehnike HPLC-MS.

2.2. POJAVA I ULOGA STEROLA, TRITERPENSKIH DIOLA TE ALIFATSKIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA U BILJKAMA

Biljni steroli ili fitosteroli su skupina prirodnih kemijskih spojeva koji nastaju biosintezom u biljkama. U usporedbi sa sterolima životinjskog porijekla i sa sterolima iz gljiva, karakterizira ih nekoliko specifičnosti. Kod životinja je jedini proizvod biosinteze sterola kolesterol, u gljivama je to ergosterol, dok su krajnji produkti biosinteteze sterola u biljkama različiti sterolni spojevi koji se javljaju u omjerima koji su genetski predodređeni biljnom vrstom (Schaller, 2004.). Pojam steroli se obično koristi za 4-desmetil-sterole, koji su najbrojnija i najzastupljenija skupina sterola u biljnom svijetu, s glavnim predstavnicima β-sitosterolom, Δ^5-avenasterolom, kampesterolom i stigmasterolom, a slijede ih drugi steroli zastupljeni s manjim udjelima (Piironen i sur., 2000.). Srodne skupine 4-metil-steroli i 4,4'-dimetil-steroli (također poznate pod zajedničkim nazivom triterpenski alkoholi) prekursori su sterola (4-desmetil-sterola) i zastupljeni su u ulju u nešto nižim koncentracijama, iako se mogu pojaviti u koncentracijama usporedivim s koncentracijama 4-desmetil-sterola (Aparicio i Luna, 2002.).

Biljni steroli ili fitosteroli esencijalni su sastojci membrana biljnih stanica. Uključeni su u embrionalni rast (Schaller, 2004.) i nastanak nakupina lipida te su važni za prijenos signala, diferencijaciju stanica i reorganizaciju njihove strukture, kao i u obrani od zaraznih bolesti (Feng i sur., 2020.; Mongrand i sur., 2010.). Pretpostavlja se da akumulacija sterola u sjemenkama i uljima osigurava rast novih stanica i izdanaka. Putem C3 hidroksilne skupine imaju sposobnost povezivanja s alkilnim lancima proteina, sfingolipida i fosfolipida Van der Waalsovim silama što osnažuje koheziju i fluidnost stanične membrane i pomaže biljci održati strukturu pri promjenama temperature (Piironen i sur., 2000.; Feng i sur., 2020.). Biljni steroli

su i prekursori brojnih hormona, kao npr. brasinosteroida, najvažnije vrste biljnih hormona koji reguliraju rast i razvoj biljaka (Schaller, 2004., Oklestkova i sur., 2015.; Piironen i sur., 2000.) te imaju aktivnu ulogu u prilagodbi biljaka na biotičke i abiotičke stresne situacije (Valitova i sur., 2016.).

Biljni steroli se pojavljuju u biljkama u slobodnom i vezanom obliku. Slobodni steroli su uglavnom locirani u staničnim membranama i kao takvi važni su sastavni dio strukture stanične membrane biljne stanice (Piironen i sur., 2000.; Feng i sur., 2020.). Esteri sterola uglavnom ispunjavaju međustanične prostore (Piironen i sur., 2000.). Smatra se da esteri sterola nastaju kada su slobodni oblici prisutni u suvišku kako bi se razine slobodnih sterola zadržale na fiziološki optimalnim razinama. Esterifikacija uključuje reakciju hidroksilne skupine na atomu ugljika na položaju 3 (C3) u molekuli sterola s karboksilnom skupinom molekule masne ili fenolne kiseline (Schaller, 2004.). Drugi oblik vezanih sterola su steril glikozidi gdje je glikozidna veza uspostavljena između C3 hidroksilne skupine sterola s C1' ugljikom molekule šećera. Za glikozide sterola se također smatra da sudjeluju u regulaciji koncentracije slobodnih sterola u membrani. Smatra se da je glukozid β-sitosterola uključen u sintezu celuloze (Schaller, 2004.). Glikozidi sterola mogu se dalje esterificirati s dugolančanim masnim kiselinama u acilirane glikozide sterola (Wojciechowski, 1991.). U slučaju aciliranih steril-glikozida, na položaj C6' šećera vezana je masna kiselina dugog lanca (Piironen, 2000.).

Funkcija nesteroidnih triterpenoida, poput triterpenskih alkohola i diola, nešto je slabije istražena, ali se smatra da oni doprinose obrani biljke od stresa i funkcijama vanjskog dijela kožice ploda (pokožica ili epikarp) kao što je npr. vodopropusnost te da imaju ulogu u interakcijama između biljke i kukaca (Stiti i Hartmann, 2012.).

Smatra se da je glavna funkcija alifatskih alkohola u biljkama tvorba dugolančanih estera reakcijama esterifikacije s masnim kiselinama. Tako nastali voskovi pretežito se nalaze u vanjskom sloju kožice ploda i služe kao aktivna barijera u sprječavanju gubitka vode i prodora štetnih tvari i patogena (Reina-Pinto i Yephremov, 2009.).

2.2.1. Steroli, triterpenski dioli te alifatski i triterpenski alkoholi u maslinovom ulju

Najreprezentativniji steroli (4-desmetil-steroli) u plodovima maslina i maslinovom ulju su β-sitosterol (75–90 % ukupnih sterola), Δ^5-avenasterol (5–20 %), kampesterol (1–4 %) i stigmasterol (0,5–2 %), iako su zabilježena i odstupanja u uljima pojedinih sorti. Manje zastupljeni steroli u maslinovom ulju su klerosterol, sitostanol, 24-metilen-kolesterol, Δ^7-avenasterol, Δ^7-kampesterol, $\Delta^{5,24}$-stigmastadienol, Δ^7-stigmastenol i kampestanol, a još su prisutni steroli $\Delta^{5,23}$-stigmastadienol, kolesterol i brasikasterol. Najzastupljeniji triterpenski dioli eritrodiol i uvaol javljaju se uglavnom u relativnim udjelima nižim od 4 % izraženo na zbroj svih sterola i eritrodiola i uvaola (EK, 2019.; IOC, 2021.; CAC, 2021.b). Među triterpenskim

alkoholima maslinovog ulja ističu se citrostadienol kao najzastupljeniji predstavnik 4-metil-sterola te cikloartenol i 24-metilen-cikloartenol kao najzastupljeniji predstavnici 4,4'-dimetil-sterola. Ostali triterpenski alkoholi koji se pojavljuju u maslinovom ulju jesu obtusifoliol, gramisterol, cikloeukalenol, različiti izomeri amirina, butirospermol i tarakserol (Piironen i sur., 2000.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Azadmard-Damirchi i Dutta, 2006.).

Alifatski alkoholi u maslinovom ulju su alkoholi dugog, zasićenog, ravnog lanca, a najzastupljeniji su alkoholi s parnim brojem ugljikovih atoma u molekuli, uglavnom dokozanol (22 atoma ugljika, C22), tetrakozanol (C24), heksakozanol (C26) i oktakozanol (C28). Dugolančani alifatski alkoholi s neparnim brojem ugljikovih atoma, s glavnim predstavnicima trikozanolom (C23), pentakozanolom (C25) i heptakozanolom (C27), pojavljuju se u maslinovom ulju u znatno nižim koncentracijama (EK, 2019.; IOC, 2021.; Giuffrè, 2014.a, 2014.b; Krichène i sur. 2010.). Osim što su važni zbog svoje biološke aktivnosti i blagotvornog djelovanja na zdravlje ljudi, kao markeri za provjeru autentičnosti maslinovog ulja te zato što imaju veliki potencijal za diskriminaciju ulja na osnovi sorte (o čemu se govori u sljedećim odjeljcima), pojedini autori su sterolima te alifatskim i triterpenskim alkoholima dodijelili neka dodatna svojstva povezana s drugim aspektima kvalitete maslinovog ulja. Među sterolima iz maslinovog ulja, glavnim nositeljima antioksidacijskog djelovanja i drugih blagotvornih učinaka na zdravlje smatraju se β-sitosterol i Δ^5-avenasterol zbog njihovog većinskog udjela i strukturnih specifičnosti (Manai-Djebali i Oueslati, 2017.; Manai-Djebali i sur., 2018.). Utvrđeno je da ta dva sterola snažno koreliraju s oksidativnom stabilnošću maslinovog ulja (Manai-Djebali i sur., 2018.; Gutiérrez i sur., 1999.). Također, utvrđeno je da viši omjer koncentracija kampesterola i stigmasterola može poslužiti kao pokazatelj bolje kvalitete maslinovog ulja (Ranalli i Angerosa, 1996.), s obzirom na to da je zabilježena pozitivna korelacija razine stigmasterola s udjelom kiselosti (slobodnih masnih kiselina), što ukazuje na lošiju kvalitetu ploda i ulja, kao i s pojavom senzornih mana u maslinovim uljima dobivenim iz uskladištenih plodova masline (Gutiérrez i sur., 2000.). Uočeno je povišenje razina Δ^7-stigmastenola u maslinovom ulju u raznim nepovoljnim uvjetima, kao što su zaraza plodova maslinovom muhom, dugotrajnije skladištenje maslina prije prerade, više temperature prerade maslina i dulja razdoblja skladištenja ulja u određenim uvjetima (Abu-Alruz i sur., 2011.). Odnosi koncentracija različitih alifatskih i triterpenskih alkohola mogu se koristiti za izračun tzv. alkoholnog indeksa, kojeg je prvi predložio Camera (1981.) za identifikaciju dodatka ulja komine maslina u djevičansko maslinovo ulje, da bi ga kasnije drugi autori koristili kao parametar opće kvalitete maslinovog ulja (Ranalli i De Mattia, 1997.; Ranalli i sur., 1999.a, 1999.b). Viši indeks označavao je nižu kvalitetu maslinovog ulja. Indeks je bio proporcionalan koncentraciji svih glavnih alifatskih alkohola s parnim brojem ugljikovih atoma, a obrnuto proporcionalan koncentraciji triterpenskih alkohola cikloartenola i 24-metilencikloartenola te diterpena geranilgeraniola.

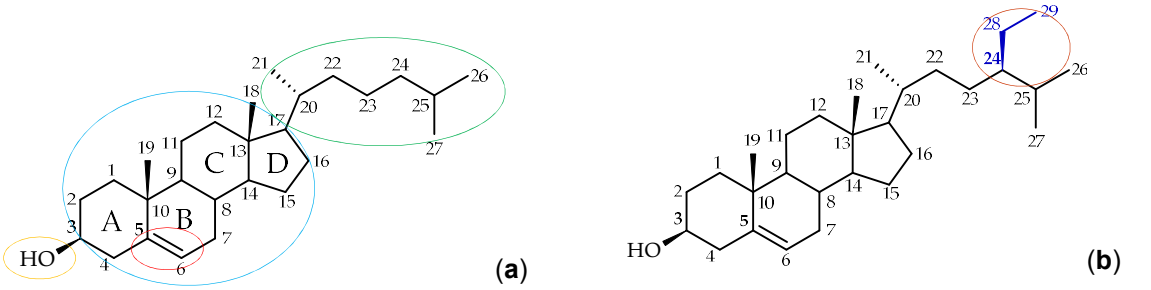
2.2.2. Molekularna struktura

Steroli se na osnovi svojih svojstava smatraju lipidima zbog svoje relativno velike, uglavnom nepolarne, a time i hidrofobne molekularne strukture, sa samo jednom funkcionalnom polarnom hidroksilnom skupinom. Zbog hidroksilne skupine, oni su i alkoholi. Zbog strukture na bazi izoprena pripadaju skupini triterpena (terpeni s 30 atoma ugljika), a zbog specifične strukture s karakteristična četiri prstena i alifatskim lancem pripadaju steroidima (Goodwin, 1985.; IUPAC, 1989.; Piironen i sur., 2000.).

Biljni steroli nastaju jedinstvenim biosintetskim putem u kojem 4,4′-dimetil-steroli i 4-metil-steroli služe kao prekursori 4-desmetil-sterola. Prema tome, ove tri skupine spojeva karakteriziraju određene zajedničke strukturne specifičnosti.

Skupina sterola ili 4α-desmetil-sterola

Osnovna struktura biljnih sterola s β-sitosterolom kao glavnim predstavnikom nalikuje kolesterolu i ima sljedeće karakteristike (**Slika 1**): (I) osnovni kostur koji se sastoji od četiri kondenzirana nearomatska prstena, od kojih tri prstena sa šest ugljikovih atoma i jedan prsten s pet ugljikovih atoma; (II) hidroksilnu skupinu na atomu ugljika na položaju 3 (C3) u prstenu A; (III) dvostruku vezu na položajima 5 i/ili 7 u prstenu B; i (IV) bočni alkilni lanac na položaju 17 u prstenu D, koji može sadržavati etil/metil/etiliden/metilensku skupinu spojenu na C24 u molekuli. Hidrogenirani (zasićeni) steroli nazivaju se stanoli (IUPAC, 1989.).



(**a**) **Kolesterol** (Δ^5-kolesten-3β-ol)

(**b**) **β-sitosterol** ((24R)-24-etil-Δ^5-kolesten-3β-ol)

Slika 1 Kemijske strukture (a) kolesterola i (b) β-sitosterola

Plava elipsa: osnovni kostur; narančasta elipsa: hidroksilna skupina na C3 ugljikovom atomu; crvena elipsa: dvostruka veza na C5 i/ili C7 atomu ugljika; zelena elipsa: bočni alkilni lanac na C17 atomu ugljika; smeđa elipsa: etilna skupina na C24 atomu ugljika.

Za sterolne spojeve karakterističan je stereokemijski raspored metilnih i drugih supstitucijskih skupina te atoma vodika takav da su prstenovi A, B i C u obliku ili konformaciji stolice, dok je prsten D obično planaran (**Slika 1**). Nadalje, atomi vodika i druge supstitucijske skupine stereokemijski su, prema konvenciji, raspoređeni s obzirom na kutnu metilnu skupinu vezanu na atom ugljika C10. Ako se zamisli ravnina u kojoj su položena četiri prstena sterolnog

kostura, supstituent na C10 je po definiciji iznad ravnine pa supstituenti ispod ravnine ravnine imaju α-orijentaciju, odnosno čine *trans*-konformaciju, a supstituenti iznad ravnine su β-orijentirani ili su u *cis*-konformaciji u odnosu na kutnu metilnu skupinu na položaju 10. Prema tome, u molekuli kolesterola hidroksilna skupina na C3, kutna metilna skupina na C13, bočni lanac na C17 i atom vodika na C8 su β-orijentirani (*cis*), dok su atomi vodika na ugljiku 9, 14 i 17 α-orijentirani (*trans*). Steroli koji nisu metilirani na položaju 4 nazivaju se desmetil-steroli (Belitz i sur., 2004.).

4-Desmetil-steroli mogu se na osnovi položaja i broja dvostrukih veza u prstenu B podijeliti na Δ^5-sterole (dvostruka veza na C5 atomu ugljika), Δ^7-sterole i $\Delta^{5,7}$-sterole (Nes, 1997.). Većina biljnih sterola ima Δ^5 strukturu s dodatnom funkcionalnom skupinom na C24 ugljiku od jednog ili dva atoma ugljika što je karakteristično za biljne sterole (Goodwin, 1985.). Ti supstituenti vežu se na osnovni dio molekule *trans*-metilacijom i mogu imati α- ili β-kiralnost. Većina 24-etil-sterola su 24α-epimeri, a većina 24-metil-sterola pojavljuje se kao smjesa 24α-epimera i 24β-epimera. Jedno od svojstava strukture biljnih sterola je česta pojava *trans*-Δ^{22} dvostrukih veza u bočnom lancu, dok se *cis* konformacija pojavljuje rjeđe. Neki od najzastupljenijih Δ^5 biljnih sterola u prirodi, pa tako i u maslini i maslinovom ulju, jesu β-sitosterol (24α-etil-kolest-5-en-3β-ol), kampesterol (24α-metil-kolest-5-en-3β-ol), stigmasterol (24α-etil-kolest-5,22-en-3β-ol) i Δ^5-avenasterol (*trans*-24-etiliden-kolest-5-en-3β-ol). Neki od predstavnika manje zastupljenih skupina jesu Δ^7-avenasterol (*trans*-24-etiliden-kolest-7-en-3β-ol), sitostanol (24α-etil-kolestan-3β-ol) i drugi.

Strukture najvažnijih sterola (4-desmetil-sterola) u maslinovom ulju prikazane su na **Slici 2**.

Skupine triterpenskih alkohola i triterpenskih diola

Među triterpenskim alkoholima u maslinovom ulju ističu se citrostadienol (kao najzastupljeniji predstavnik 4-metil-sterola) te cikloartenol i 24-metilen-cikloartenol (kao najzastupljeniji predstavnici 4,4'-dimetil-sterola). Ostali triterpenski alkoholi koji se pojavljuju u maslinovom ulju jesu: obtusifoliol, gramisterol, cikloeukalenol, različiti izomeri amirina, butirospermol i tarakserol (Piironen, 2000.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Azadmard-Damirchi i Dutta, 2006.).

Strukture najvažnijih triterpenskih alkohola (4-metil-sterola i 4,4'-dimetil-sterola) i diola u maslinovom ulju prikazane su na **Slici 2**. Pojedini triterpenski alkoholi i dioli dio su veće skupine pentacikličkih triterpenoida. Osnovu njihove strukture čini kostur sastavljen od šest izoprenskih jedinica. Najčešće strukture pentacikličkih terpena su one s pet šesteročlanih prstena, kao što su ursani, oleanani, gamacerani i lanostani ili s četiri šesteročlana i jednim peteročlanim prstenom, čiji su najvažniji predstavnici lupani i hopani. Spomenute skupine međusobno se razlikuju na osnovi broja i rasporeda dvostrukih veza i vrste funkcionalnih skupina vezanih s osnovnom strukturom. Grupe ursana i oleanana sadrže brojne važne triterpene, između ostalih i triterpenske alkohole, odnosno 4,4'-dimetil-sterole α-amirin i β-amirin, iz kojih enzimatski

kataliziranim reakcijama nastaju najvažniji triterpenski dioli iz maslinovog ulja uvaol i eritrodiol. Uvaol i eritrodiol imaju hidroksilne skupine na C3 i C28 atomima ugljika. Oksidacijom hidroksilne skupine na C28 atomu u karboksilnu, dio uvaola i eritrodiola dalje se transformira u ursolnu, odnosno oleanolnu kiselinu (Rufino-Palomares i sur., 2015.) (**Slika 2**). Od ostalih zastupljenijih pentacikličkih triterpenskih alkohola u maslinovom ulju, osnovna struktura cikloartenola, 24-metilen-cikloartenola i cikloeukalenola uključuje tri šesteročlana, jedan peteročlani i jedan tročlani, ciklopropanski prsten (zatvoren na C19 atomu ugljika). Tetracikličke strukture molekula obtusifoliola, gramisterola, citrostadienola i butirospermola imaju tri šesteročlana i jedan peteročlani prsten (**Slika 2**). Gramisterol, citrostadienol i butirospermol imaju Δ^7 strukturu (dvostruku vezu na C7 ugljiku), a obtusifoliol Δ^8 strukturu (Ruiz-Aracama i sur., 2017.).

Skupina alifatskih alkohola

Najzastupljeniji alifatski alkoholi iz maslinovog ulja jednostavni su linearni, zasićeni, primarni alkoholi s lancima koji sadrže paran broj atoma ugljika, od 22 do 28, ali se pronalaze i alifatski alkoholi s neparnim brojem atoma ugljika, od 23 do 27.

2.2.3. Razvoj i dozrijevanje ploda masline (*Olea europaea* L.)

Plod masline je koštunica koju karakteriziraju lignificirani endokarp (koštica) koja sadrži sjemenku, mesnati mezokarp (pulpa) gdje se nakuplja ulje i relativno tanki epikarp (pokožica). Nakon zametanja, plodovi masline rastu brzo tijekom 30 - 40 dana, uglavnom zbog umnožavanja stanica, a zatim se rast znatno usporava. Mjesec i pol dana nakon pune cvatnje, sjeme i endokarp dosegnu svoju konačnu veličinu i prestaju rasti, a endokarp se stvrdne (lignificira), dok se kod stanica mezokarpa razdioba stanica usporava. Do 90. dana odvija se umjeren rast, a zatim slijedi drugi period intenzivnog rasta ploda između 90. i 150. dana nakon pune cvatnje, uglavnom zbog širenja stanica i nakupljanja ulja. Početak faze dozrijevanja plodova započinje oko 150. dana nakon cvatnje. Dozrijevanje ploda okarakterizirano je smanjenjem sadržaja klorofila i nakupljanjem antocijana najprije u pokožici, a zatim u pulpi, uz omekšavanje pulpe. Proizvodnja ulja u pulpi započinje oko 45. dana nakon pune cvatnje. Stanice mezokarpa se povećavaju i kapljice ulja se izdvajaju iz protoplazme. Intenzivna biosinteza ulja odvija se između 60. i 120. dana, nakon čega se odvija smanjenim intenzitetom do 200. dana nakon pune cvatnje (Tombesi, 1994.).

2.2.4. Biosinteza sterola i triterpenskih alkohola

Biljni steroli proizvodi su biosintetskog puta izoprenoida, koji uključuje niz koraka kontroliranih enzimima (**Slika 2**). Osnovni građevni blokovi svih terpenoida, uključujući sterole kao

triterpenoide (C30), jesu molekule izopentenil pirofosfata (IPP) (C5) nastale u ciklusu mevalonske kiseline (C6) (McCaskill i Croteau, 1998.; Piironen i sur., 2000.). U sljedećim koracima, IPP konvergira u dimetilalkil difosfat koji služi kao prekursor za sintezu monoterpena, diterpena i tetraterpena koji se dalje prevodi u farnezil pirofosfat, iz kojeg nastaju triterpeni i seskviterpeni. Enzim skvalen-sintaza usmjerava daljnji put do sinteze sterola preko skvalena, dok kompetitivnu sintezu seskviterpena iz istog supstrata katalizira seskviterpen-ciklaza. Smatra se da je ključni ograničavajući korak za biosintezu biljnih sterola stvaranje IPP, u kojem enzim 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A reduktaza (HMGR) igra glavnu ulogu katalizirajući pretvorbu acetil koenzima A u mevalonsku kiselinu (Schaller, 2004.). S druge strane, neki autori dovode u pitanje ključnu ulogu ovog enzima (Piironen i sur., 2000.).

U sljedećim koracima skvalen se prevodi u 2,3-oksidoskvalen (ili skvalen-oksid), koji se ciklizira u triterpenski alkohol, odnosno 4,4'-dimetil-sterol cikloartenol, koji je prekursor svih biljnih sterola. Cikloartenol se dalje transformira u druge 4,4′-dimetil-sterole, koji se prevode u 4-metil-sterole, a oni se konačno demetiliraju te kao krajnji proizvod tog puta nastaju 4-desmetil-steroli, tj. steroli, i to sljedećim redoslijedom: Δ^7-steroli, $\Delta^{5,7}$-steroli te Δ^5-steroli (Schaller, 2004.) (**Slika 2**). Predloženo je nekoliko mehanizama transformacije cikloartenola u konačne biljne sterole, a kako većina biljnih enzima koji kataliziraju te reakcije ne pokazuje visoku selektivnost, oni uvijek nastaju kao smjesa različitih struktura (Piironen, 2000.).

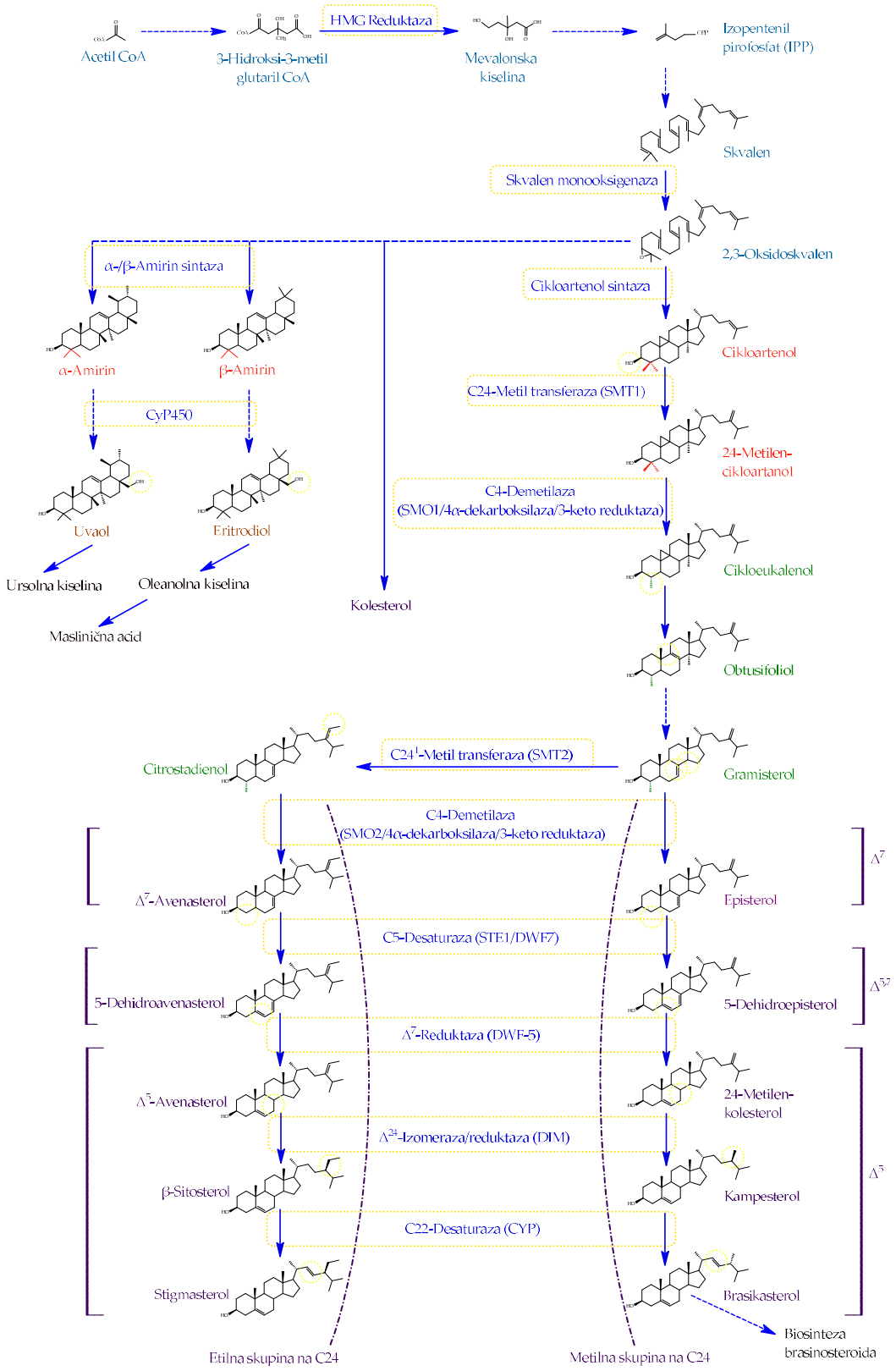
Post-skvalenska faza biosinteze sterola obuhvaća konverziju cikloartenola u glavne predstavnike sterola kroz dva stupnja metilacije što se smatra kritičnim korakom te druge faze. U određenoj točki biosinteze sterola dolazi do račvanja biosintetskog puta u dva smjera koje kataliziraju dva različita enzima, SAM-24-metilen-lofenol-C24-metiltransferaza 2 (SMT2) i C4α-sterol-metil-oksidaza 2 (SMO2), koji kroz nekoliko dodatnih pretvorbi dovode do odvojene sinteze glavnih 24-etilsterola maslinovog ulja s jedne strane (biosintetskim redoslijedom: Δ^5-avenasterol, β-sitosterol i stigmasterol), odnosno 24-metil-sterola (kampesterol) s druge strane i to iz zajedničkog prekursora gramisterola (**Slika 2**).

Određena istraživanja pokazala su da aktivnost metil-transferaza kao ključnih regulatornih enzima u sintezi biljnih sterola može imati značajniju ulogu od aktivnosti 3-hidroksimetil-3-glutaril koenzim A reduktaze u ranijoj fazi. Smatra se da aktivnost enzima ovisi i o dostupnosti supstrata te da u njihovom suvišku nastaju značajniji udjeli steril-estera koji se skladište kao rezerva u uljnim dijelovima između stanica (Piironen, 2000.).

U drugoj grani biosintetskog puta sterola određena frakcija 2,3-oksidoskvalena u nekoliko se koraka transformira u niz različitih pentacikličkih triterpena, uključujući 4,4'-dimetil-sterole kao što su α- i β-amirin (Hartmann, 1998.), koji se dalje prevode u druge pentacikličke triterpenoide, uključujući glavne triterpenske diole plodova masline i maslinovog ulja, uvaol i eritrodiol (Rufino-Palomares i sur., 2015.) (**Slika 2**).

2.2.5. Biosinteza alifatskih alkohola

Alifatski alkoholi sintetiziraju se u epidermalnim stanicama iz dugolančanih zasićenih masnih kiselina s 20 do 34 atoma ugljika u lancu. Prvo u plastidima nastaju palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0) masna kiselina čiji se lanci zatim produljuju u reakcijama kataliziranim višeenzimskim kompleksima iz staničnih membrana, poznatim pod nazivom elongaze masnih kiselina. Svako produljenje za dva atoma ugljika uključuje 4 reakcije: (I) kondenzaciju aciliranog substrata masne kiseline esterificiranog s koenzimom A i malonil-koenzimom A; (II) β-keto redukciju; (III) dehidraciju i (IV) enoil redukciju u kojoj nastaje dulja masna kiselina. Acil-koenzim A (acil-CoA) esteri reduciraju se u alifatske alkohole u dva koraka preko odgovarajućih aldehida kao međuproizvoda i to uz pomoć enzima acil-CoA reduktaze. Dio alkohola tvori estere (voskove) s masnim kiselinama dugog lanca u reakciji kataliziranoj acil-CoA alkohol transacilazom (Tinto i sur., 2015.). Voskovi čine dio kutikule plodova voća općenito pa tako i masline te imaju aktivnu funkciju barijere, sprječavajući prekomjeran gubitak vode i ulazak štetnih tvari i patogena u plod (Reina-Pinto i Yephremov, 2009.).



Slika 2 Shematski dijagram biosinteze biljnih sterola u biljkama (Piironen i sur., 2000.; Schaller, 2004., Rufino-Palomares i sur., 2015.) s posebnim naglaskom na sterole iz maslinovog ulja. Prikazane su glavne strukture 4-desmetil-sterola (ljubičasto), kao i 4-metil (zeleno) i 4,4′-dimetil-sterola (crveno) te njihovi prekursori. Također su prikazani paralelni putovi sinteze kolesterola i triterpenskih diola eritrodiola i uvaola. Isprekidane strelice predstavljaju nekoliko enzimskih koraka koji nisu prikazani.

2.3. BLAGOTVORNI UČINAK NA LJUDSKO ZDRAVLJE

Biološka aktivnost sterola i njihov pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi dokazani su u brojnim studijama (Manai-Djebalija i Oueslati, 2017.). Među korisnim učincima zabilježeno je zaštitno djelovanje protiv arteroskleroze, čira želuca i raznih upalnih procesa (Berger i sur., 2004.). Utvrđeno je da steroli mogu imati antitumorsko djelovanje (Woyengo i sur., 2009.; Ramprasath i Awad, 2015.). Biljni steroli, uključujući sterole iz maslinovog ulja, uglavnom se povezuju s pozitivnim učinkom na regulaciju koncentracije kolesterola vezanog za lipoproteine niske gustoće (tzv. LDL-kolesterol) u krvotoku, što se intenzivno istražuje od 1950-ih (Peterson, 1951.).

Biljni steroli i kolesterol

LDL-kolesterol nakuplja se na stijenkama krvnih žila i stvara naslage pa se njegova visoka koncentracija u krvi smatra jednim od glavnih uzroka mnogih bolesti krvožilnog sustava. S druge strane, kolesterol vezanog s lipoproteinima visoke gustoće (HDL-kolesterol) ima veću gustoću i bogatiji je proteinima te se preko tih molekula višak kolesterola iz perifernih tkiva prenosi u jetru, gdje ne izaziva negativne učinke. Budući da su biljni steroli strukturno slični kolesterolu, kada se unose hranom natječu se s LDL-kolesterolom u procesu apsorpcije u probavnom sustavu. Kao rezultat toga, apsorpcija LDL-kolesterola je djelomično blokirana i razina kolesterola u krvi je niža (Piironen i sur., 2000.). Pokazalo se da unos biljnih sterola u ljudski organizam u dnevnoj dozi od 2 g može sniziti razinu LDL-kolesterola do 10 % (Katan i sur., 2003.). Prirodni unos biljnih sterola je prilično nizak i varira između 167 i 437 mg dnevno (Ostlund, 2002.) pa odgovorna tijela u nekim zemljama preporučuju povećanje unosa biljnih sterola do 2 g dnevno putem dodataka prehrani ili hrane obogaćene biljnim sterolima, s ciljem sniženja koncentracije LDL-kolesterola te time i incidencije kardiovaskularnih bolesti (NCEP Adult treatment Panel III, 2001.). Učinci biljnih sterola na koncentraciju kolesterola u krvi i prevenciju kardiovaskularnih bolesti detaljno su dokumentirani u nedavnim preglednim člancima (Manai-Djebali i Oueslati, 2017.; Cabral i Klein, 2017.; Rysz i sur., 2017.).

Ostali korisni učinci sterola

Osim snižavanja razine kolesterola, pokazalo se da biljni steroli imaju antitumorsko, protuupalno i antioksidativno djelovanje, što ukazuje na njihovu važnost i u prehrani ljudi s normalnom koncentracijom LDL-kolesterola (Berger i sur., 2004.). Na primjer, nakon povećanog unosa biljnih sterola, pronađeno je sniženje razine proupalnih citokina, uključujući C-reaktivni protein (CRP) (Othman i sur., 2011.; Nashed i sur., 2005.) te smanjenje aterosklerotskih lezija u miševa (Nashed i sur., 2005.). Međutim, rezultati meta-analize čiji je cilj bio proučavanje učinka povećanog unosa hrane obogaćene biljnim sterolima na razine CRP-a objavljene u preglednom članku Roche i suradnika (Rocha i sur., 2016.) ukazali su na

relativno mali protuupalni učinak, za razliku od značajnog sniženja koncentracije LDL-kolesterola potvrđenog u istoj studiji.

Brojne objavljene studije o biološkom inhibicijskom učinku biljnih sterola na tumore pluća, želuca, jajnika, prostate, jetre i dojke sistematizirane su i predstavljene u preglednim člancima (Woyengo i sur., 2009.; Ramprasath i Awad, 2015.). Pretpostavlja se da biljni steroli djeluju kroz nekoliko mehanizama inhibicije, kao što su inhibicija nastanka i rasta tumorskih stanica, angiogeneze te prijenosa i nastanka metastaza. Oni također doprinose apoptozi tumorskih stanica promjenom strukture i funkcije stanične membrane te snižavanjem razine kolesterola u krvi. Povećan unos biljnih sterola također može povećati aktivnost antioksidativnih enzima te time općenito ublažiti oksidativni stres koji može potaknuti tumorska oboljenja (Woyengo i sur., 2009.).

Podaci sažeti u nedavno objavljenom preglednom članku Fenga i suradnika (2020.) potvrdili su da unos biljnih sterola, osim što snižava razinu kolesterola, utječe i na razine masnih kiselina, triglicerida i žučne kiseline, čime se ublažavaju negativni učinci raznih bolesti i stanja, uključujući ne-alkoholnu masnu jetru, upalne bolesti crijeva i pretilost. S druge strane, autori su istaknuli potrebu za određenom dozom opreza jer je uočena povezanost između biljnih sterola i pogoršanja određenih bolesti jetre tijekom parenteralne (intravenozne) prehrane. Isto tako, posljednjih godina intenzivno se istražuju negativni citotoksični i upalni učinci proizvoda oksidacije sterola.

Nekoliko istraživanja pokazalo je blagotvorno djelovanje biljnih sterola, posebno β-sitosterola, na prevenciju ili ublažavanje dijabetesa (Gupta i sur., 2011.; Radika i sur., 2013.). Brojni farmakološki učinci β-sitosterola obrađeni su u preglednim člancima (Saeidnia i sur., 2014.; Bin Sayeed i sur., 2016.).

Blagotvorni učinci alifatskih i triterpenskih alkohola

Nekoliko studija pokazalo je da alifatski alkoholi duljeg lanca također pokazuju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, uključujući hipokolesterolemijsko i protuupalno djelovanje (Fernández-Arche i sur., 2009.; Weerawatanakorn i sur., 2019.). Mogu imati i učinak na snižavanje koncentracije LDL-kolesterola (Taylor i sur., 2003.). Iako postoje i studije s drugačijim rezultatima (Francini-Pesenti i sur., 2008.), smjesa alifatskih alkohola duljeg lanca, poznata i pod (komercijalnim) nazivom polikozanol, odobrena je za korištenje kao lijek za snižavanje razine kolesterola u krvi u mnogim državama (Carbajal i sur., 1998.). Polikozanol je pokazao i učinak sprječavanja zgrušavanja krvi, slično aspirinu (Arruzazabala i sur., 2002.; Carbajal i sur., 1998.).

Za glavne triterpenske diole iz maslinovog ulja također je utvrđeno da pokazuju biološku aktivnost. Uvaol je bio učinkovit u poticanju ubrzanog i poboljšanog zacjeljivanja rana (Carmo i sur., 2020.) i ublažavanju upalnih bolesti crijeva kod miševa (Du i sur., 2020.) te je pokazao

protutumorsko djelovanje kod ljudi (Rufino-Palomares i sur., 2015.; Bonel-Pérez i sur., 2020.). Eritrodiol je pokazao sličnu antiproliferativnu i apoptoznu aktivnost protiv adenokarcinoma (Juan i sur., 2008.) te je pospješio snižavanje koncentracije LDL-kolesterola u ljudskoj krvi (Wang i sur., 2017.).

Triterpenski alkoholi također privlače pažnju znanstvenika jer pokazuju protumikrobno, protutumorsko, protuvirusno, protuupalno, citotoksično, analgetsko, protugljivično, imunomodulatorno i insekticidno djelovanje (Stiti i Hartman, 2012.; Dzubak i sur., 2006.; Muffler i sur., 2011.; Akihisa i sur., 1996.).

2.4. UTJECAJ RAZLIČITIH ČIMBENIKA NA SASTAV STEROLA TE ALIFATSKIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA U DJEVIČANSKOM MASLINOVOM ULJU

Na koncentraciju i relativne udjele sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola u maslinovom ulju utječu brojni ekološki, agronomski i tehnološki čimbenici. U narednim poglavljima predstavljena je većina glavnih čimbenika, s posebnim naglaskom na utjecaj sorte i stupnja zrelosti masline.

2.4.1. Utjecaj sorte

Do danas je objavljen relativno velik broj studija koje su istraživale utjecaj sorte na sastav sterola i triterpenskih diola u maslinovim uljima. Očekivano, najveći broj studija istraživao je sorte podrijetlom iz zemalja najvećih proizvođača maslinovog ulja s Mediterana (**Prilog 1**), kao što su Španjolska (Stefanoudaki i sur., 2000.; Rivera del Álamo i sur., 2004.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Galeano Diaz i sur., 2005.; Allouche i sur., 2009.; Lerma-García i sur., 2009., 2011.; López-Cortés i sur., 2013.; Pardo i sur., 2013.; Gómez-Coca i sur., 2014.; Fuentes i sur., 2015.; Sena-Moreno i sur., 2015.; Kyçyk i sur., 2016.; Salazar-García i sur., 2019.; Pardo i sur., 2020.), Italija (Stefanoudaki i sur., 2000.; Bianchi i sur., 2001.; Ranalli i sur., 2002.; Giansante i sur., 2003.; Marini i sur., 2004.; Sivakumar i sur., 2006.; Giuffrè i sur., 2012.; Giuffrè i Louadj, 2013.; Ghisoni i sur., 2019.; Deiana i sur., 2019.), Grčka (Stefanoudaki i sur., 2000.; Vekiari i sur., 2010.; Skiada i sur., 2019.; Skiada i sur., 2020.a, 2020.b) i Portugal (Alves i sur., 2005.; Cunha i sur., 2006.; Matos i sur., 2007.) među EU proizvođačima te Turska (Ilyasoglu i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i sur., 2017.; Demirag i Konuskan, 2021.) i Tunis (Haddada i sur., 2007.; Oueslati i sur., 2009.; Krichène i sur., 2010.; Manai-Djebali i sur., 2012.) među proizvođačima izvan EU, iako su istraživane i različite sorte u zemljama tzv. novim proizvođačima s drugih kontinenata, Argentini (Ceci i Caerelli, 2007.), Australiji (Mailer i sur., 2010.) i Sjedinjenima Američkim

Državama (Olmo-García i sur., 2019.). Proučavan je veliki broj sorti, uključujući one globalno gospodarski i tradicijski najvažnije, kao i sorte od lokalnog značaja.

Studija u kojima je istraživan utjecaj sorte na alifatske alkohole bilo je značajno manje. Istraživana su maslinova ulja različitih sorti proizvedena u Španjolskoj (Stefanoudaki i sur., 2000.; Rivera del Álamo i sur., 2004.), Italiji (Stefanoudaki i sur., 2000.; Bianchi i sur., 2001.; Aparicio i Luna, 2002.; Ranalli i sur., 2002.; Giansante i sur., 2003.; Giuffrè, 2014.a; Giuffrè, 2014.b), Grčkoj (Stefanoudaki i sur., 2000.; Aparicio i Luna, 2002.), Tunisu (Lazzez i sur., 2008.; Krichene i sur., 2010.) i Alžiru (Boulkroune i sur., 2017.). Utjecaj sortnog podrijetla na koncentracije i relativne udjele triterpenskih alkohola, odnosno 4-metil-sterola i 4,4'-dimetil-sterola, također je izučavan relativno rijetko (Stefanoudaki i sur., 2000.; Bianchi i sur., 2001.; Aparicio i Luna, 2002.; Ranalli i sur., 2002.; Giansante i sur., 2003.).

Najzastupljeniji steroli u svim ranije istraživanim maslinovim uljima bili su, očekivano, β-sitosterol, a zatim Δ^5-avenasterol, kampesterol i stigmasterol. Utvrđena je velika varijabilnost sadržaja i sastava sterola i triterpenskih diola među istraživanim uljima. Na primjer, postotak jednog od najvažnijih sterola maslinovog ulja, Δ^5-avenasterola, kretao se od 1,82 % u maslinovom ulju turske sorte Buyuk Topak Ulak (Demirag i Konuskan, 2021.) do 31 % u maslinovom ulju tuniške sorte El Hor (Krichene i sur., 2010.). Sadržaj ukupnih sterola također je pronađen u širokom rasponu od vrijednosti daleko ispod propisane najniže granične vrijednosti od 1000 mg/kg (EK, 2019.), kao što je 358 mg/kg u ulju turske sorte Sarı Hasebi (Yorulmaz i Konuskan, 2017.) do više od 4500 mg/kg u ulju također turske sorte Buyuk Topak Ulak (Demirag i Konuskan, 2021.), s iznimkom istraživanja u kojem je izvješteno o ekstremnim koncentracijama višim i od 7000 mg/kg (Sivakumar i sur., 2006.). Većina izučavanih ulja imala je koncentraciju ukupnih sterola u rasponu od 1000 do 3000 mg/kg. Kyçyk i suradnici (2016.) predložili su sljedeću klasifikaciju djevičanskih maslinovih ulja na temelju koncentracije ukupnih sterola: kategorija I - vrlo visoka koncentracija (>2200 mg/kg), kategorija II: visoka koncentracija (1999-2200 mg/kg), kategorija III - srednja koncentracija (1650-1999 mg/kg), kategorija IV - niska koncentracija (1300-1650 mg/kg) i kategorija V - vrlo niska koncentracija sterola (<1300 mg/kg). Triterpenski dioli također su pokazali velike varijacije, s postotkom eritrodiola + uvalola u rasponu od 0,0 do 6,1 % (Lerma-García i sur., 2011.). Allouche i suradnici (2009.) utvrdili su da je eritrodiol odgovoran za 96 % varijance u razlikovanju 40 monosortnih djevičanskih maslinovih ulja pa su predložili klasifikaciju maslinovih ulja isključivo na temelju njegovog sadržaja, zanemarujući utjecaj drugog glavnog triterpenskog diola, uvalola, na sljedeći način: skupina I: vrlo visok udio, skupina II: visok udio, skupina III: srednji udio, skupina IV: srednji do niski udio i skupina V: nizak relativni udio eritrodiola.

Snažna negativna korelacija između dva najistaknutija sterola, β-sitosterola i Δ^5-avenasterola, zabilježena je u vrlo velikom broju istraživanja: pojedine sorte davale su ulja s visokim udjelom β-sitosterola i niskim udjelom Δ^5-avenasterola, a druge obrnuto (Giuffrè i sur., 2012.; Sánchez

Casas i sur., 2004.; Fuentes i sur., 2015.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Vekiari i sur., 2010.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Demirag i Konuskan, 2021.; Haddada i sur., 2007.; Oueslati i sur., 2009.; Alves i sur., 2005.; Boulkroune i sur., 2017.; Noorali i sur., 2014.). Kyçyk i sur. (2016.) diferencirali su djevičanska maslinova ulja od 43 različite sorte iz Svjetske banke germoplazme maslina u pet skupina na temelju omjera β-sitosterola i Δ^5-avenasterola.

Koncentracija ukupnih alifatskih alkohola u maslinovim uljima istraživanim u prethodnim studijama kretala se u relativno širokom rasponu od 2,1 do 36,1 mg/100 g (Rivera del Álamo i sur., 2004.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Bianchi i sur., 2001.; Aparicio i Luna, 2002.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Giuffrè, 2014.a, 2014.b; Giansante i sur., 2003.; Ranalli i sur., 2002.; Aparicio i Luna, 2002.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Lazzez i sur., 2008.; Krichene i sur., 2010.; Boulkroune i sur., 2017.). Na primjer, maslinovo ulje od talijanske sorte Coratina sadržavalo je koncentracije od 5,8 do 6,9 mg/100 g (Aparicio i Luna, 2002.; Stefanoudaki i sur., 2000.), ulje od grčke sorte Koroneiki koncentracije od 15,2 do 26,7 mg/100 (Aparicio i Luna, 2002.; Stefanoudaki i sur., 2000.), a ulje od španjolske sorte Picual koncentraciju od 11,6 mg/100 g (Stefanoudaki i sur., 2000.). Koncentracije u uljima španjolskih sorti Cornicabra, Arbequina, Picual i Hojiblanca kretale su se u rasponu od 4,4 do 29,1 mg/100 g (Rivera del Álamo i sur., 2004.), dok su se koncentracije u uljima tuniške sorte Chemlali, ovisno o stupnju zrelosti maslina, kretale od približno 5 do 32 mg/100 g. Najviša zabilježena koncentracija ukupnih alifatskih alkohola od čak 36,1 mg/100 g pronađena je u ulju sorte Farga (Aparicio i Luna, 2002.), dok je Giuffrè (2014.a) pronašao najmanje alifatskih alkohola, samo 2,1 mg/100 g, u ulju dobivenom uglavnom od crnih plodova sorte maslina Nocellara Mesinese. Prirodno je s obzirom na način biosinteze, da se alifatski alkoholi s parnim brojem ugljikovih atoma od C22 do C28 nalaze u značajno višim koncentracijama u odnosu na alkohole s neparnim brojem atoma ugljika u molekuli (C23 do C27), kako je i pronađeno u spomenutim istraživanjima. Najzastupljeniji alifatski alkohol uglavnom je bio heksakozanol, dok je dokozanol pronađen u najnižim relativnim udjelima u odnosu na druge glavne alifatske alkohole s parnim brojem atoma ugljika (Stefanoudaki i sur., 2000.; Aparicio i Luna , 2002.; Lazzez i sur., 2008.; Sakouhi i sur., 2010a; Giuffrè, 2014.b).

Među triterpenskim alkoholima, najzastupljeniji 4-metil-sterol u ranije istraživanim uljima bio je citrostadienol, dok su najzastupljeniji 4,4′-dimetil-steroli bili 24-metilencikloartenol i cikloartenol. Istražena su ulja od maslina sorti Picholine i Sayali uzgojenih u Tunisu (Sakouhi i sur., 2009.b; 2010.a), ulja talijanskih sorti Bosana, Coratina, Dritta, Frantoio, Moraiolo, Provenzale i Leccino (Bianchi i sur., 2001.; Giansante i sur., 2003.) te različita španjolska maslinova ulja (Itoh i sur., 1981.). U vrlo rijetkim studijama u kojima su objavljeni podaci o većem broju triterpenskih alkohola, a ne samo o glavnim predstavnicima, utvrđen je prosječni

relativni omjer koncentracija ukupnih 4,4'-dimetil-sterola i 4-metil-sterola od približno 3:1 (Sakouhi i sur., 2009.b, 2010.a).

U velikoj većini objavljenih studija, koncentracije i/ili relativni udjeli sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola u maslinovim uljima različitih sorti statistički su uspoređeni analizom varijance (ANOVA) i različitim post-hoc testovima. U velikom broju studija primjenjene su multivarijantne tehnike statističke analize, uglavnom analiza glavnih sastavnica (engl. *Principal Component Analysis*, *PCA*) (Bianchi i sur., 2001.; Ranalli i sur., 2002.; Giansante i sur., 2003.; Rivera del Álamo i sur., 2004.; Galeano Diaz i sur., 2005.; Alves i sur., 2005.; Matos i sur., 2007.; Ceci i Caerelli, 2007.; Allouche i sur., 2009.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Salazar-García i sur., 2011.; Manai-Djebali i sur., 2012.; Giuffrè i sur., 2012.; López-Cortés i sur., 2013.; Yorulmaz i sur., 2014.; Noorali i sur., 2014.; Sena-Moreno i sur., 2015.; Kyçyk i sur., 2016.; Boulkroune i sur., 2017.; Olmo-García i sur., 2019.; Pardo i sur., 2020.; Skiada i sur., 2020.a, 2020.b), linearna diskriminantna analiza (engl. *Linear Discriminant Analysis*, *LDA*) (Giansante i sur., 2003.; Marini i sur., 2004.; Rivera del Álamo i sur., 2004.; Sánchez Casas i sur., 2004., Lerma-García i sur., 2009., 2011., Salazar-García i sur., 2011., Ilyasoglu i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014., Boulkroune i sur., 2017.) i hierarhijska klaster analiza (engl. *Hierarchical Cluster Analysis*, *HCA*) (Stefanoudaki i sur., 2000.; Ranalli i sur., 2002.; Haddada i sur., 2007.; Matos i sur., 2007.; Ceci i Caerelli, 2007.; Allouche i sur., 2009.; Krichène i sur., 2010.; Manai-Djebali i sur., 2012.; Kyçyk i sur., 2016., Ghisoni i sur., 2019.), te druge metode, kako bi se pronašle kombinacije varijabli i izgradili modeli koji omogućuju najbolje moguće razlikovanje maslinovih ulja na osnovi sortnog podrijetla.

Treba napomenuti da su se objavljene studije uvelike razlikovale u eksperimentalnom dizajnu, prema broju uspoređenih sorti, vrsti uzoraka (eksperimentalno ili industrijski proizvedena te komercijalno dostupna maslinova ulja) i broju uzoraka, interakciji s drugim čimbenicima (sezona berbe ili zemljopisno podrijetlo, stupanj zrelosti maslina, parametri uzgoja ili prerade i drugi) i tako dalje. Tako su, na primjer, Salazar-García i suradnici (2019.) usporedili ulja 31 sorte maslina iz 11 španjolskih regija proizvedena od plodova približno jednakog stupnja zrelosti u laboratorijskom mjerilu (ukupno 155 uzoraka), dok su, na primjer, Skiada i suradnici (2020.b) utvrdili razlike između industrijski proizvedenih komercijalno dostupnih ulja dvije grčke sorte, Koroneiki i Mastoides, na osnovi analize 112 uzoraka.

Steroli koji su pokazali najznačajniji potencijal za razlikovanje maslinovih ulja na osnovi sorte u najvećem broju istraživanja bili su β-sitosterol (Lerma-García i sur., 2011.; Galeano Diaz i sur., 2005.; López-Cortés i sur., 2013.; Salazar-García i sur., 2019.; Kyçyk i sur., 2016.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Marini i sur., 2004.; Giuffrè i Louadj, 2013.; Vekiari i sur., 2010.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Manai-Djebali i sur., 2012.; Ceci i Caerelli, 2007.; Olmo-García i sur., 2019.; Noorali i sur., 2014.), kampesterol (Lerma-García i sur., 2011.; Rivera del Álamo i sur., 2004.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Galeano Diaz i sur., 2005.; López-

Cortés i sur., 2013.; Salazar-García i sur., 2019.; Pardo i sur., 2020.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Marini i sur., 2004.; Yorulmaz i sur., 2014.; Alves i sur., 2005.; Boulkroune i sur., 2017.; Noorali i sur., 2014.), Δ^5-avenasterol (Rivera del Álamo i sur., 2004.; Galeano Diaz i sur., 2005.; Kyçyk i sur., 2016.; Giansante i sur., 2003.; Marini i sur., 2004.; Giuffrè i Louadj, 2013.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Matos i sur., 2007.; Olmo-García i sur., 2019.; Noorali i sur., 2014.) i stigmasterol (Galeano Diaz i sur., 2005.; López-Cortés i sur., 2013.; Salazar-García i sur., 2019.; Marini i sur., 2004.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Matos i sur., 2007.; Noorali i sur., 2014.), dok su Δ^7-avenasterol (Stefanoudaki i sur., 2000.; Giuffrè i Louadj, 2013.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Matos i sur., 2007.; Boulkroune i sur., 2017.), klerosterol (Marini i sur., 2004.; Manai-Djebali i sur., 2012.; Alves i sur., 2005.; Boulkroune i sur., 2017.; Noorali i sur., 2014.), Δ^7-stigmastenol (Lerma-García i sur., 2011.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Manai-Djebali i sur., 2012.; Boulkroune i sur., 2017.) i $\Delta^{5,24}$-stigmastadienol (Lerma-García i sur., 2011.; Marini i sur., 2004.; Giuffrè i Louadj, 2013.; Yorulmaz i sur., 2014.) također bili korisni u više slučajeva. Sporadično su se isticali i drugi steroli i triterpenski dioli. U studiji u kojoj su autori primijenili neciljanu metabolomsku analizu s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, *UPLC*) vezanu s hibridnim spektrometrom masa na principu kvadrupola i vremena preleta iona nakon elektroraspršenja (engl. *Electron Spray Ionisation/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*, *ESI/QTOF-MS*) identificiran je mnogo veći broj sterola nego što je to moguće standardnom metodom. Veći broj do tada neidentificiranih sterolnih spojeva prisutnih u tragovima pokazao je potencijal za razlikovanje izučavanih maslinovih ulja na osnovi sorte multivarijatnim statističkim analizama (Ghisoni i sur., 2019.).

Uz kemijske spojeve iz ostalih skupina, među alifatskim alkoholima su se kao korisne varijable u multivarijatnoj analizi s ciljem razlikovanja maslinovih ulja na osnovi sorte pokazali dokozanol, pentakozanol i heptakozanol (Boulkroune i sur., 2017.), odnosno tetrakozanol i heksakozanol (Giansante i sur., 2003.). U istraživanjima u kojima su triterpenski alkoholi bili uključeni u multivarijatnu analizu, analizirani su uglavnom samo glavni predstavnici citostadienol, cikloartenol i 24-metilencikloartenol, te su oni poslužili kao korisne varijable za sortno razlikovanje maslinovih ulja (Bianchi i sur., 2001.; Ranalli i sur. 2002.; Giansante i sur. 2003.).

Multivarijantni modeli razvijeni za razlikovanje maslinovih ulja na osnovi sorte u najvećem broju slučajeva bili su uspješni ili uspješniji samo kada su uključivali i druge parametre maslinovog ulja u kombinaciji sa sterolima i triterpenskim diolima (Bianchi i sur., 2001.; Rivera del Álamo i sur., 2004.; Galeano Diaz i sur., 2005.; Sena-Moreno i sur., 2015.; Salazar-García i sur., 2019.; Pardo i sur., 2020.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Giansante i sur., 2003.; Marini i sur., 2004.; Skiada i sur., 2020.b, Koutsaftakis i sur., 1999.; Boulkroune i sur., 2017.), odnosno alifatskim

(Bianchi i sur., 2001.; Ranalli i sur., 2002.; Boulkroune i sur., 2017.; Giansante i sur., 2003.) ili triterpenskim alkoholima (Bianchi i sur., 2001.; Ranalli i sur., 2002.; Giansante i sur., 2003.). Broj uspješnih multivarijatnih modela koji su koristili isključivo podatke o sastavu sterola i triterpenskih diola bio je manji (Lerma-García i sur., 2009., 2011.; Sánchez Casas i sur., 2004.; López-Cortés i sur., 2013.; Ranalli i sur., 2002.; Skiada i sur., 2020.a. 2020.b; Alves i sur., 2005.; Matos i sur., 2007.), dok u literaturi nisu pronađeni uspješni multivarijatni modeli s isključivo podacima o sastavu alifatskih ili triterpenskih alkohola. Objavljene su studije u kojima su steroli služili kao bolji parametri za razlikovanje maslinovih ulja na osnovi sorte u odnosu na fenole i tokoferole (Ilyasoglu i sur., 2010.), odnosno trigliceride i masne kiseline (Yorulmaz i sur., 2014.). Bianchi i suradnici (2001.) su na osnovi analize varijance pokazali da glavni triterpenski alkoholi, citrostadienol, cikloartenol i 24-metilen-cikloartenol, mogu poslužiti kao varijable s boljim potencijalom za razlikovanje ulja različitih sorti u odnosu na sterole, triterpenske diole i alifatske alkohole. Pokazalo se da učinak sorte može djelovati u interakciji s drugim čimbenicima, kao što su godina berbe (Ilyasoglu i sur., 2010.; Giuffrè i Louadj, 2013.; Pardo i sur., 2013.; Fuentes i sur., 2015.; Sena-Moreno i sur., 2015.), stupanj zrelosti plodova (Vekiari i sur., 2010.; Fuentes i sur., 2015.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016., Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Boulkroune i sur., 2017.) i regija uzgoja maslina (Noorali i sur., 2014.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Navas-López i sur., 2020.; Demirag i Konuskan, 2021.). U studiji koja je uključivala sedam španjolskih sorti i pet regija uzgoja, u izravnoj usporedbi, sorta je pokazala snažniji utjecaj (izražen kao postotak varijance) od zemljopisnog podrijetla na razine β-sitosterola, Δ^5-avenasterola i ukupnih sterola (Navas-López i sur., 2020.). Postoje i rijetke studije koje su uspjele razviti robusne multivarijatne modele u kojima razlikovanje na osnovi sorte samo na osnovi podataka o sastavu sterola i triterpenskih diola nije bilo kompromitirano utjecajem drugih čimbenika, kao što su stupanj zrelosti (Sánchez Casas i sur., 2004.; Matos i sur., 2007.), godina berbe (Lerma-García i sur., 2009., 2011.) ili zemljopisno područje uzgoja (Lerma-García i sur., 2009., 2011.; Skiada i sur., 2020.a, 2020.b)

U djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od brojnih sorti maslina pronađene su koncentracije i/ili relativni udjeli pojedinih i/ili ukupnih sterola i/ili triterpenskih diola viši ili niži od granica propisanih važećom regulativom (EK, 2019.). Za pojedine uzorke maslinovog ulja španjolskih sorti Cornicabra (Rivera del Álamo i sur., 2004.; Salvador i sur., 1998.) i Benizal (Pardo i sur., 2013.; Sena-Moreno i sur., 2015.) u nekoliko studija je pronađen relativni udio kampesterola viši od 4,0 %, za što su autori istaknuli mogućnost da je u pitanju karakteristika sorte. Slično je utvrđeno u pojedinim uzorcima grčke sorte Koroneiki (Skiada i sur., 2019.) i turske sorte Memecik (Ilyasoglu i sur., 2010.) te u cijelom nizu ulja manje poznatih sorti u raznim mediteranskim zemljama (Lerma-García i sur., 2011.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Yorulmaz i sur., 2014., Kyçyk i sur., 2016.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Salazar-García i sur., 2019.; Deiana i sur., 2019.). Među sortama koje se uzgajaju izvan područja

Mediterana, ulja od sorte maslina Barnea uzgojenih u Australiji (Mailer i sur., 2010.) i Argentini (Ceci i Caerelli, 2007.) pokazala su jednako ponašanje. Među više sorti maslina od kojih su proizvedena autentična ulja zabilježen je značajan broj slučajeva s nedovoljno visokom koncentracijom ukupnih sterola u odnosu na najnižu dopuštenu vrijednost od 1000 mg/kg prema Uredbi Komisije (EK, 2019.) (Pardo i sur., 2013.;. Sena-Moreno i sur., 2015.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Deiana i sur., 2019.; Pardo i sur., 2020.; Demirag i Konuskan, 2021.), kao npr. ulja sorte Koroneiki u Grčkoj (Stefanoudaki i sur., 2000.; Skiada i sur., 2020.a, 2020.b) i Australiji (Mailer i sur., 2010.).

2.4.2. Utjecaj dozrijevanja

Dozrijevanje plodova masline primjećuje se kao povećanje veličine i težine ploda, povećanje omjera pulpe i koštice te promjena boje od zelene prema tamno ljubičastoj i crnoj. Ulje se akumulira tijekom većeg dijela razdoblja dozrijevanja masline, ali sinteza u određenom trenutku prestaje, nakon čega se udio ulja često nastavlja povećavati na račun gubitka vlage. Istodobno s biosintezom triglicerida odvija se i sinteza drugih fitokemikalija u maslini, uključujući pigmente odgovorne za promjenu boje, prekursore fenola i hlapljivih tvari koji su zajedno ključni za okus i miris maslinovog ulja, kao i sterole te alifatske i triterpenske alkohole, i to u okviru brojnih biokemijskih reakcija kataliziranih multienzimskim kompleksima kodiranim genima (Tombesi, 1994.; Beltrán i sur., 2004.; Avidan i sur., 2007.).

Za maslinare i uljare od velikog je značaja prikupljanje, odnosno berba plodova u trenutku dozrijevanja u kojem su i količina ulja, ali i kvaliteta najbliže vrhuncu. U praksi se termin berbe tradicionalno određuje na temelju boje ploda, što nije uvijek pouzdano. Indeks dozrijevanja (engl. *ripening index, RI* ili *maturation indeks, MI*) pouzdanija je mjera za procjenu stupnja zrelosti plodova maslina. Određuje se procjenom boje kožice i pulpe 100 maslina iz slučajnog uzorka kao reprezentativnih za ukupnu količinu (Beltrán i sur., 2004.; Uceda i Frias, 1975.). Međutim, utvrđeno je da razvoj i dozrijevanje ploda masline i sadržaj raznih kemijskih spojeva koji se biosintetiziraju nisu uvijek u korelaciji jer značajno ovise o sorti, području uzgoja i godini berbe, kao i drugim čimbenicima. Iz tih je razloga istraživanje promjena u prinosu i kemijskom sastavu ulja tijekom dozrijevanja masline, uključujući sadržaj i sastav sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola, sve veće područje znanstvenog interesa koje je i od velike praktične važnosti (Beltrán i sur., 2004.; Giuffrè, 2017.).

Značajan utjecaj stupnja zrelosti maslina na koncentraciju i relativne udjele sterola i triterpenskih diola u maslinovom ulju zabilježen je u mnogim istraživanjima. Veći broj objavljenih studija obuhvaćao je tri stupnja zrelosti, pri čemu su masline korištene za proizvodnju ulja u većini slučajeva bile opisane kao „zelene“ (ranija berba), „prošarane“ (standardna berba) i „zrele“, odnosno „ljubičaste“ ili „crne“ (kasnija berba) (Sánchez Casas i

sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Kaliora i sur., 2013.; Mendoza i sur., 2013.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Fuentes de Chtourou i sur., 2017.; Wang i sur., 2021.) ili slično, kao na primjer, „nezrele“, „normalne“ i „prezrele“ (Koutsaftakis i sur., 1999.). Indeks dozrijevanja „zelenih“ maslina kretao se uglavnom u rasponu od 0 do 2,5, „prošaranih“ od 2,5 do 4,0, dok je indeks dozrijevanja „zrelih“ maslina uglavnom bio viši od 4,0 (Koutsaftakis i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004. ; Vekiari i sur., 2010. ; Yorulmaz i Konuskan, 2017. ; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Chtourou i sur., 2017.; Kaliora i sur., 2013.; Wang i sur., 2021.). Druge studije uključivale su uzorke proizvedene od maslina ubranih u različitim terminima koji su bili karakterizirani razdobljem proteklim od cvatnje, datumom berbe i/ili indeksom zrelosti plodova masline (Guillaume i sur., 2012., Gutiérrez i sur., 1999.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Matos i sur., 2007.; Boulkroune i sur., 2017.; Ajana i El Antari, 1998.; Sönmez i sur., 2018.; Lazzez i sur., 2008.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmaz i sur., 2013; Lazzez i sur., 2011.; Salvador i sur., 2001.; Fernández-Cuesta i sur., 2013.; Boulkroune i sur., 2017.; Giuffrè i sur., 2014.a; Ranalli i sur., 1998.; Stiti i sur., 2007.; Sakouhi i sur., 2009.b). Objavljena istraživanja razlikovala su se s obzirom na zemlju i regiju u kojoj su provedena, što znači da je svaka studija bila okarakterizirana vlastitim agroekološkim uvjetima predodređenim zemljopisnim podrijetlom i položajem. Nadalje, vremenski raspon u kojem su istraživanja provedena bio je relativno širok (nekoliko desetljeća) te je obuhvaćao velik broj sezona berbe, od kojih je svaka bila obilježena neponovljivim vremnskim uvjetima. Također, vremenski okviri proučavanih razdoblja dozrijevanja bili su različiti, od duljih, kao na primjer od kolovoza do veljače s 11 termina berbe (Ajana i El Antari, 1998.), do kraćih koji su, na primjer, uključivali tri termina berbe u listopadu i studenom (Yorulmaz i Konuskan, 2017.). U većini studija prikazane su promjene relativnih udjela sterola i triterpenskih diola, dok je manji broj studija prikazao promjene njihovih koncentracija.

Brojna istraživanja uključivala su nekoliko sorti maslina praćenih u istim ili barem vrlo sličnim uvjetima dozrijevanja te su se u većini takvih slučajeva obrasci promjena udjela i koncentracija sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola tijekom dozrijevanja značajno razlikovali među sortama (Sánchez Casas i sur., 2004., Matos i sur., 2007.; Guillaume i sur., 2012.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Fernández-Cuesta i sur., 2013.; Giuffrè i sur., 2014.a; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Boulkroune i sur., 2017.). Osim sa sortom, zabilježene su i interakcije stupnja zrelosti s učincima drugih čimbenika, kao što su godina berbe (Koutsaftakis i sur., 1999., Salvador i sur., 2001.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Giuffrè i sur., 2014.a; Chtourou i sur., 2017.; Mena i sur., 2018.) i zemljopisno područje (Gutiérrez i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Lazzez i sur., 2008.; Lazzez i sur., 2011.; Mena i sur., 2018.). Na primjer, u studiji koja je uključivala četiri godine berbe, koncentracija ukupnih sterola u maslinovim uljima španjolske sorte Cornicabra neznatno se snizila tijekom dozrijevanja u dvije

godine istraživanja, u trećoj je zabilježen značajniji pad, dok je u četvrtoj utvrđen značajan porast (Salvador i sur., 2001.).

Za većinu sterola i triterpenskih diola u prethodnim je istraživanjima uočena velika varijabilnost u dinamici akumulacije tijekom dozrijevanja, dok je kod nekih uočena sklonost određenim ponavljajućim obrascima unatoč interferirajućim čimbenicima. U većini istraživanja utvrđeno je da je razina kolesterola uglavnom konstantna tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja (Rivera del Álamo i sur., 2004.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Yorulmaz i sur., 2013.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.) iako je bilo i iznimki (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Chtourou i sur., 2017.; Sönmez i sur., 2018.). Promjene razina brasikasterola, jednog od najmanje zastupljenih sterola u maslinama i maslinovom ulju, praćeno je u relativno malom broju studija. Utvrđeno je da su one uglavnom konstantne tijekom dozrijevanja (Yorulmaz i sur., 2013.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.), iako je kod nekih sorti zamijećen porast u kasnijim fazama dozrijevanja (Yorulmaz i sur., 2013.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.). U većini studija zabilježena je prilično stabilna razina 24-metilenkolesterola u različitim fazama zrelosti (Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Lazzez i sur., 2008.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmaz i sur., 2013.), iako je utvrđen i porast koncentracija tijekom većeg dijela razdoblja dozrijevanja (Sánchez Casas i sur., 2004.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.). Razina jednog od glavnih sterola, kampesterola, bila je konstantna ili varijabilna tijekom dozrijevanja u većini istraživanja (Gutiérrez i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Matos i sur., 2007.; Boulkroune i sur., 2017.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmazi sur., 2013.) i tek je rijetko otkriveno da se povećava. Sniženje koncentracije ili relativnog udjela kampesterola češće je zabilježeno u drugoj polovici ciklusa dozrijevanja (Koutsaftakis i sur., 1999.; Vekiari i sur., 2010.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.; Yorulmazi sur., 2013.). Promjene u razini kampestanola tijekom dozrijevanja zabilježene u ranijim istraživanjima također su bile raznolike te su zabilježeni i porast (Boulkroune i sur., 2017.) i sniženje (Yorulmaz i Konuskan, 2017.), kao i relativno stabilne razine (Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Boulkroune i sur., 2017.; Taticchi i sur., 2019.). Razine Δ^7-kampesterola bile su prilično konstantne ili nepravilno promjenjive tijekom dozrijevanja (Guillaume i sur., 2012.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Chtourou i sur., 2017.). U prethodnim istraživanjima utvrđeni su i porast (Guillaume i sur., 2012.; Boulkroune i sur., 2017.; Sönmez i sur., 2018.) i sniženje (Koutsaftakis i sur., 1999.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Chtourou i sur., 2017.) i relativno konstantne ili neravnomjerno promjenjive razine stigmasterola (Gutiérrez i sur., 1999.; Yorulmazi sur., 2013.; Kaliora i sur., 2013.; Boulkroune i sur., 2017.; Taticchi i sur., 2019.). U većini dosadašnjih studija zabilježene

su relativno slabe i nejednake promjene razine klerosterola tijekom dozrijevanja (Sánchez Casas i sur., 2004.; Lazzez i sur., 2008.; Yorulmazi sur., 2013.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Boulkroune i sur., 2017.; Taticchi i sur., 2019.), iako su u određenim fazama uočeni i porast (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.) i sniženje (Koutsaftakis i sur., 1999.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Chtourou i sur., 2017.). Porast koncentracije β-sitosterola koji je zabilježen u ranijoj fazi razvoja ploda masline (Vekiari i sur., 2010.; Yorulmazi sur., 2013.; Wang i sur., 2021.) nije nastavljen do kraja razdoblja dozrijevanja, kada je ustanovljena stabilizacija (Yorulmazi sur., 2013.) ili sniženje koncentracije (Vekiari i sur., 2010.; Wang i sur., 2021.). Chtourou i sur. (2017) zabilježili su sniženje nakon čega je uslijedio porast, dok su u drugim studijama utvrđene neujednačene fluktuacije koncentracije β-sitosterola (Matos i sur., 2007.; Boulkroune i sur., 2017.; Lazzez i sur., 2008.; Kaliora i sur., 2013.). Brojna istraživanja izvjestila su o sniženju relativnog udjela β-sitosterola tijekom dijela ili kroz cijelo razdoblje dozrijevanja (Koutsaftakis i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Guillaume i sur., 2012.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.), dok su drugi autori zabilježili veće ili manje neujednačene promjene (Gutiérrez i sur., 1999.; Salvador i sur., 2001., Lazzez i sur., 2008.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Taticchi i sur., 2019.). Za sorte Picholine (Ajana i El Antari, 1998.), Halhalı (Yorulmaz i Konuskan, 2017.) i Ayvalik (Wang i sur., 2021.) utvrđeno je konstantno sniženje koncentracije β-sitosterola tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja. Razina sitostanola tijekom dozrijevanja u većini je prijašnjih studija bila relativno postojana (Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Lazzez i sur., 2008.; Yorulmazi sur., 2013.) ili se snižavala (Koutsaftakis i sur., 1999.; Guillaume i sur., 2012.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.), dok je njeno povišenje zabilježeno samo u studiji Vekiari i suradnika (2010.). Razina Δ^5-avenasterola bila je u porastu u ranijim fazama ciklusa dozrijevanja maslina u većini prethodnih studija (Koutsaftakis i sur., 1999.; Guillaume i sur., 2012.; Gutiérrez i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Matos i sur., 2007.; Boulkroune i sur., 2017.; Ajana i El Antari, 1998.; Sönmez i sur., 2018.; Yorulmazi sur., 2013.; Fernández-Cuesta i sur., 2013.), dok je sniženje bilježeno rijetko (Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.). U nekoliko studija uočen je nastavak povišenja razine Δ^5-avenasterola i u kasnijoj fazi dozrijevanja (Koutsaftakis i sur., 1999.; Gutiérrez i sur., 1999.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Ajana i El Antari, 1998.; Sönmez i sur., 2018.). Kao i u slučaju β-sitosterola, u pojedinim studijama zabilježena je promjena dinamike akumulacije s obzirom na obrazac uočen u prethodnoj fazi dozrijevanja (Guillaume i sur., 2012.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Fernández-Cuesta i sur., 2013.). Pojedini autori zabilježili su relativno stabilne ili nejednoliko fluktuirajuće razine Δ^5-avenasterola tijekom dozrijevanja (Matos i sur., 2007.; Salvador i sur., 2001.). Razine $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola, Δ^7-stigmastenola i

Δ^7-avenasterola pokazale su raznoliko ponašanje tijekom dozrijevanja, u većini slučajeva s manjim ili nepravilnim promjenama (Guillaume i sur., 2012.; Vekiari i sur., 2010.; Koutsaftakis i sur., 1999.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Lazzez i sur., 2008.; Lazzez i sur., 2011.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmazi sur., 2013.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Boulkroune i sur., 2017.; Chtourou i sur., 2017.).

Većina autora prikazala je promjene zbroja relativnih udjela dva glavna triterpenska diola, eritrodiola i uvaola, tijekom dozrijevanja. Utvrđena je uglavnom promjenjiva dinamika, sa sniženjem ili konstantnim razinama nakon čega je uslijedio porast (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.) ili obrnuto (Boulkroune i sur., 2017.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmazi sur., 2013.), ali su zabilježene i relativno stabilne koncentracije ili relativni udjeli tijekom cijelog razdoblja (Sánchez Casas i sur., 2004.). Za eritrodiol je zabilježen porast (Koutsaftakis i sur., 1999.) pa sniženje u završnom dijelu promatranog razdoblja dozrijevanja (Fuentes de Mendoza i sur., 2013.), dok su za uvaol uglavnom utvrđeni promjenjivi obrasci promjena ili relativno stabilne razine tijekom dozrijevanja maslina (Koutsaftakis i sur., 1999.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Chtourou i sur., 2017.).

Prethodna istraživanja izvijestila su o porastu nakon kojeg je uslijedio pad razine ukupnog β-sitosterola tijekom dozrijevanja (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.). Za neke sorte uočen je i konstantan porast njegovog relativnog udjela (Yorulmaz i Konuskan, 2017.), dok su drugi autori utvrdili relativno stabilne vrijednosti tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja (Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.). U nekoliko studija uočeno je da koncentracija ukupnih sterola u određenom trenutku tijekom dozrijevanja dostiže određenu razinu nakon čega se smanjuje ili ne mijenja (Guillaume i sur., 2012.; Matos i sur., 2007.; Sönmez i sur., 2018.; Lazzez i sur., 2008.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmazi sur., 2013.). Objavljeni su i rezultati koji su za pojedine sorte prikazali konstantan porast (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Fernández-Cuesta i sur., 2013.) ili konstantno sniženje (Gutiérrez i sur., 1999.; Matos i sur., 2007.; Taticchi i sur., 2019.), dok su utvrđene i relativno stabilne vrijednosti ukupnih sterola tijekom cijelog ciklusa dozrijevanja (Gutiérrez i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Boulkroune i sur., 2017.; Sönmez i sur., 2018.; Kaliora i sur., 2013.). U pojedinim studijama utvrđene su uglavnom neravnomjerne fluktuacije koncentracije ukupnih sterola (Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Matos i sur., 2007.; Boulkroune i sur., 2017.).

Za razliku od većine studija u kojima su zaključci doneseni na temelju sadržaja i/ili sastava sterola i triterpenskih diola u ekstrahiranim uljima, Fernández-Cuesta i suradnici (2013.) pratili su razvoj skvalena i sterola tijekom dozrijevanja maslina izravno u pulpi masline. Zabilježili su porast količine ukupnih sterola tijekom cijelog razdoblja od rujna do prosinca kroz četiri stupnja

zrelosti, s indeksom zrelosti koji se kretao u rasponu od 0,3 do 3,9. Udio β-sitosterola se snižavao, a udio Δ^5-avenasterola povećavao istovremeno s povećanjem udjela ulja u plodu, dok se u posljednjoj fazi, kada je nakupljanje ulja prestalo, a masa svježeg ploda postala konstantna ili je čak neznatno smanjena zbog isparavanja vode, omjer β-sitosterola i Δ^5-avenasterola ujednačio. Studija je uključivala četiri sorte te su uočene određene razlike u obrascima promjene udjela sterola i triterpenskih diola među sortama, ali uglavnom neznatne. S druge strane, kvantitativne razlike između koncentracija sterola u uljima različitih sorti bile su značajne. Sakouhi i suradnici (2011.) utvrdili su maksimalnu razinu skvalena u 21. tjednu nakon cvatnje, nakon čega je uslijedilo dramatično sniženje izmjereno tijekom pet sljedećih tjedana, da bi konačno deset puta niža koncentracija od maksimalne bila zabilježena u 38. tjednu nakon cvatnje. Autori su objasnili sniženje koncentracije skvalena kao posljedicu njegove potrošnje kao prekursora u biosintezi sterola i drugih triterpenoida, što je potkrijepljeno značajnim porastom koncentracije ukupnih sterola zabilježenim u istom razdoblju (21. i 26. tjedan nakon cvatnje), nakon čega je uočeno prilično oštro sniženje njihove koncentracije (Sakouhi i sur., 2011.). Orozco-Solano i suradnici (2010.) analizirali su plodove triju sorti maslina u razdoblju od rujna do siječnja u pet stupnjeva zrelosti plodova („zelene“, „zeleno-žute“, „žuto-ljubičaste“, „ljubičaste“ i „crne“ masline) i uočili različito ponašanje većine sterola ovisno o sorti.

Mnoga istraživanja su potvrdila da različite sorte pokazuju različitu dinamiku nakupljanja sterola i triterpenskih diola tijekom dozrijevanja. Međutim, nekoliko njih pokazalo je, barem kada su učinci drugih čimbenika bili ograničeni ili umanjeni, značajnu sličnost relativnih promjena u obrascima dozrijevanja unatoč kvantitativnim razlikama u sadržaju sterola. Fuentes de Mendoza i suradnici (2013.) pokazali su da je moguće razlikovati maslinova ulja prema stupnju zrelosti korištenjem LDA analize s određenim masnim kiselinama, trigliceridima i sterolima kao varijablama unatoč tome što su uzorci pripadali dvjema različitim sortama. Među ostalim spojevima, LDA modeliranjem odabrani su i β-sitosterol i Δ^5-avenasterol kao varijable sa značajnom moći razlikovanja maslinovih ulja na osnovi stupnja zrelosti. Orozco-Solano i suradnici (2010.) primijetili su određeni stupanj grupiranja uzoraka maslinovog ulja od tri različite sorte na osnovi stupnja zrelosti primjenom PCA analize s podacima o sastavu sterola i alifatskih alkohola. U drugom istraživanju, primjenom PCA i LDA analize postignuto je relativno uspješno razlikovanje ulja na osnovi stupnja zrelosti, iako je uočena značajna interakcija sa starosti stabala maslina. Osim sterola i triterpenskih diola, u toj su studiji kao varijable u provođenju multivarijatne statističke analize korišteni podaci za druge spojeve, kao što su skvalen, klorofili, karotenoidi i alifatski alkoholi (Chtourou i sur., 2017.). Koutsaftakis i sur. (1999.) uspjeli su grupirati maslinova ulja sorte Koroneiki na osnovi stupnja zrelosti koristeći kanoničku diskriminantnu analizu (*engl. Canonical Discriminant Analysis, CDA*)

isključivo s podacima o sastavu sterola, unatoč tome što su uzorci bili iz dvije uzastopne godine berbe.

Giuffrè (2014.a) je tijekom dozrijevanja maslina zabilježio sniženje koncentracija i relativnih udjela alifatskih alkohola duljeg lanca od pentakozanola do oktakozanola u maslinovim uljima većine sorti uključenih u istraživanje, dok je za alkohole kraćih lanaca od dokozanola do tetrakozanola utvrdio nedosljedne obrasce promjena koncentracija. S druge strane, za sortu Sinapolese utvrdio je drugačiji obrazac za većinu alifatskih alkohola, sa sniženjem i ponovnim porastom koncentracija. Orozco-Solano i suradnici (2010.) utvrdili su uglavnom nelinearne varijacije koncentracija alifatskih alkohola u plodovima i listovima maslina različitih sorti tijekom petomjesečnog razdoblja dozrijevanja od rujna do siječnja, s maksimumom postignutim u relativno zrelim maslinama ljubičaste i crne boje. Slično su primijetili Ranalli i suradnici (1998.) za druge sorte. S druge strane, Orozco-Solano i suradnici (2010.) su u maslinama sorte Picual utvrdili varijacije udjela alkohola kraćeg lanca dokozanola, trikozanola i tetrakozanola obrnuto proporcionalne onima pentakozanola, heksakozanola, heptakozanola i oktakozanola. Sakouhi i suradnici (2010.b) utvrdili su istovremeni porast ili sniženje koncentracija svih pojedinačnih kao i ukupnih alifatskih alkohola u različitim fazama dozrijevanja maslina sorte Meski, s najvišim razinama utvrđenim u u 26. tjednu, a najnižim u 38. tjednu nakon cvatnje. Boulkroune i suradnici (2017.) zabilježili su konstantno opadanje koncentracija ukupnih alifatskih alkohola u uljima proizvedenim od maslina različitih stupnjeva zrelosti, od rujna/listopada do prosinca/siječnja. Za pojedinačne alifatske alkohole utvrdili su uglavnom slične promjene, ali su u pojedinim razdobljima dozrijevanja određene sorte pokazivale različite obrasce.

Stiti i suradnici (2007.) utvrdili su konstantan porast koncentracija slobodnih i esterificiranih triterpenskih alkohola u plodu masline tijekom dozrijevanja te izraženiji porast koncentracija 24-metilencikloartenola i cikloartenola u razdoblju promjene boje pokožice ploda iz zelene u prošaranu. Ovu pojavu autori su objasnili kao posljedicu preusmjeravanja biosinteze ka stvaranju sterola, pri čemu je cikloartenol prekursor 24-metilencikloartenola i jedan od glavnih biosintetskih međuproizvoda u sintezi sterola. Sakouhi i suradnici (2009.b) primijetili su drugačiju dinamiku promjena koncentracija triterpenskih alkohola tijekom dozrijevanja maslina, s puno više fluktuacija i s obrnuto proporcionalnim koncentracijama cikloartenola i 24-metilencikloartenola tijekom cijelog praćenog razdoblja.

2.4.3. Utjecaj skladištenja

Utjecaj skladištenja na sadržaj i sastav sterola i triterpenskih diola nije opsežno istraživan. Thanh i suradnici (2006.) otkrili su da se razina β-sitosterola u maslinovom ulju snizila za 16,5 % nakon 6 mjeseci skladištenja na sobnoj temperaturi. Razine kampesterola, β-sitosterola i stigmasterola bile su prilično stabilne nakon nekoliko tjedana zagrijavanja na 55 °C, nisu se

promijenile nakon 1 h na 100 °C, ali su se snizile za oko 60 % nakon jednosatnog zagrijavanja na 200 °C. Abu-Alruz i suradnici (2011.) zabilježili su povišenje razine Δ^7-stigmastenola nakon 6 mjeseci skladištenja u različitim spremnicima.

U postojećoj literaturi nisu pronađeni podaci o promjenama alifatskih i triterpenskih alkohola tijekom skladištenja maslinovog ulja i sličnih matrica.

2.4.4. Ostali čimbenici

Sorta i stupanj zrelosti svakako su među najvažnijim, ako ne i najvažniji čimbenici koji utječu na sadržaj i sastav sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola u maslinovom ulju. Međutim, pokazalo se da važan utjecaj imaju i godina berbe i zemljopisno podrijetlo, neraskidivo povezani s predodređenim pedoklimatskim uvjetima, kao i primijenjenim agronomskim i tehnološkim parametrima.

Mnoge objavljene studije izvjestile su o utjecaju zemljopisnog područja uzgoja i agro-klimatskih uvjeta na sadržaj i sastav sterola i triterpenskih diola. Utvrđeno je da se razine pojedinih glavnih sterola, poput β-sitosterola, kampesterola i stigmasterola, kao i ukupnih sterola, snizuju na višim nadmorskim visinama, dok je za određene triterpenske alkohole, uključujući prekursor sterola cikloartenol, utvrđeno suprotno, što je ukazivalo na moguće usporavanje biosinteze sterola u takvim uvjetima (Ferreiro i Aparicio, 1992.). Pokazalo se da ukupni steroli negativno koreliraju s postotkom vapnenca u tlu (Ranalli i sur., 1999.a). Viša razina Δ^7-stigmastenola pronađena je u uljima proizvedenim od maslina uzgojenih na crvenoj glinenoj zemlji u usporedbi s bijelim vapnencem (Abu-Alruz i sur., 2011.). Različiti vremenski uvjeti na pojedinom području uzgoja, kao što su količina oborina, temperatura i vlažnost, kao i svojstva tla, posebice pH, sadržaj vapnenca i nedostatak određenih elemenata značajni su čimbenici koji utječu na sastav maslinovog ulja (Rallo i sur., 2018.).

Lazzez i suradnici (2011.) usporedili su maslinova ulja sorte Chemlali tijekom četiri godine berbe proizvedena od maslina šest stupnjeva zrelosti u tri uzgojna područja s različitim pedo-klimatskim uvjetima na osnovi koncentracije sterola. Utvrdili su da je zemljopisno područje uzgoja uzrok veće varijabilnosti od stupnja zrelosti te da ta dva čimbenika značajno međudjeluju. Godina berbe nije imala značajan učinak. U drugim studijama godina berbe imala je značajan utjecaj na razine pojedinih i ukupnih sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola, iako u značajnoj interakciji s drugim čimbenicima (Ilyasoglu i sur., 2010.; Anastasopoulos i sur., 2011.; Guillaume i sur., 2012.; Giuffrè i Louadj, 2013.; Pardo i sur., 2013.; Fuentes i sur., 2015.; Sena-Moreno i sur., 2015.; Chtourou i sur., 2017.). U istraživanju maslinovih ulja od sedam španjolskih sorti maslina uzgojenih u pet različitih regija, sorta je imala veći utjecaj, izražen kao postotak varijance, od zemljopisnog položaja na razine β-sitosterola i Δ^5-avenasterola te koncentraciju ukupnih sterola (Navas-López i sur., 2020.). U istraživanju

australskih maslinovih ulja proizvedenih od maslina iz četiri regije s različitim ekstremnim pedoklimatskim uvjetima, utvrđeno je da zemljopisno područje i sorta imaju značajniji utjecaj od godine berbe i stupnja zrelosti. Čimbenici sorta i područje uzgoja bili su u interakciji (Mailer i sur., 2010.). Značajan utjecaj zemljopisnog podrijetla na razine sterola i alifatskih alkohola, promjenjiv je ovisno o sorti i stupnju zrelosti maslina, utvrdili su Lazzez i sur. (2008.). Brojna druga istraživanja potvrdila su značajan utjecaj zemljopisnog podrijetla na koncentracije i relativne udjele sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola te su među njima multivarijatnim metodama statističke analize potvrđeni različiti markeri (Temime i sur., 2008.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Longobardi i sur., 2012.a, 2012.b; Noorali i sur., 2014.; Bajoub i sur., 2015.; Alberghina i sur., 1991.).

Pojedina istraživanja proučavala su razlike između maslinovih ulja podrijetlom iz različitih zemalja. Giacalone i suradnici (2015.) su koristeći multivarijatne metode statističke analize podataka utvrdili da je moguće razlikovati ekstra djevičanska maslinova ulja iz Italije od ulja porijeklom iz drugih zemalja (Španjolska, Tunis te mješovito podrijetlo iz EU) na osnovi koncentracije i sastava slobodnih i esterificiranih sterola. Pokazalo se da su esterificirani steroli korisniji za tu svrhu. U drugoj studiji, maslinova ulja iz Tunisa i Italije uspoređena su obradom podataka multivarijatnim tehnikama nakon UHPLC-ESI/QTOF-MS analize sterola te je utvrđeno da mnogi, u toj studiji po prvi put identificirani steroli, mogu poslužiti za razlikovanje maslinovih ulja na osnovi države podrijetla (Mohamed i sur., 2018.). Sličan pristup temeljen na metabolomici primijenjen je u drugoj studiji u kojoj su diferencirana djevičanska maslinova ulja iz šest talijanskih regija (Ghisoni i sur., 2019.).

Uz stupanj zrelosti odnosno termin berbe maslina, agronomski parametri koji se primjenjuju u masliniku također značajno utječu na kvalitetu plodova, a time i na konačnu kakvoću svježeg maslinovog ulja (Rallo i sur., 2018.).

Za određeni broj sterola utvrđen je značajan učinak ekološkog načina uzgoja, iako ovisan o godini berbe i stupnju zrelosti plodova (Anastasopoulos i sur., 2011.). Chtourou i suradnici (2017.) uspoređivali su maslinova ulja dobivena od maslina ubranih u tri stupnja zrelosti s 'mladih' (pet godina) i 'starijih' stabala (50 godina) posađenih u istim pedoklimatskim uvjetima, tijekom dvije godine berbe. Učinci sva tri čimbenika (stupnjevi zrelosti, starost stabala i godina berbe) bili su značajni za većinu sterola i alifatskih alkohola. Multivarijatnom analizom ulja su uspješno razlikovana na osnovi stupnja zrelosti, s podgrupama formiranim u odnosu na starost stabala za svaki od tri indeksa dozrijevanja.

Pokazalo se da stres uzrokovan sušom odnosno navodnjavanje također imaju značajan utjecaj na koncentraciju i sastav sterola te triterpenskih i alifatskih alkohola u maslinama i maslinovom ulju (Inglese i sur., 1996.; Stefanoudaki i sur., 2001.; Stefanoudaki i sur., 2009.; Guillaume i sur., 2012.).

Utvrđeno je da vrijeme skladištenja ploda, odnosno vrijeme proteklo između berbe i prerade maslina značajno utječe na koncentracije nekih sterola, a posebno triterpenskih diola. Razine eritrodiola + uvalola i stigmasterola su se povisile, a razina kampesterola snizila nakon duljeg razdoblja skladištenja ploda (Guillaume i sur., 2012.). Slično povišenje uočeno je za Δ^7-stigmastenol (Abu-Alruz i sur., 2011.).

Među proizvodnim parametrima, pokazalo se da uvjeti malaksacije (miješenja) paste maslina imaju određen utjecaj na koncentracije i sastav sterola i triterpenskih diola, ali općenito u manjoj mjeri od onog uzrokovanog sortom, stupnjem zrelosti te okolišnim i agronomskim čimbenicima. U studiji Guillaumea i suradnika (2012.), eritrodiol + uvalol, stigmasterol i Δ^7-stigmastenol bili su jedini spojevi na koje je duljina malaksacije paste maslina imala utjecaja (porast), dok je viša temperatura malaksacije uzrokovala povišenje njihovih udjela, kao i povišenje koncentracije ukupnih sterola. U drugoj studiji, viša temperatura malaksacije također je uzrokovala povišenje stigmasterola (Koutsaftakis i sur., 1999.). Više temperature prešanja u tradicionalnom sustavu prerade maslina rezultirale su povišenim udjelom Δ^7-stigmastenola u maslinovom ulju (Abu-Alruz i sur., 2011.).

Ranalli i suradnici (1999.b) usporedili su kvalitetu i sastav različitih frakcija ulja dobivenih tijekom prerade maslina, odnosno prve frakcije ulja dobivenog perkolacijom (način izdvajanja ulja koji se zasniva na adheziji ulja za čelične lamele nakon uranjanja u pastu maslina te cijeđenju ulja u drugu posudu) i druge frakcije ulja dobivenog ekstrakcijom naknadnim centrifugiranjem. Prvu frakciju maslinovog ulja karakterizirao je viši omjer kampesterola i stigmasterola i niža koncentracija ukupnih sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola. Koutsaftakis i suradnici (1999.) utvrdili su da ulja dobivena dvofaznim ili trofaznim centrifugalnim sustavima sadrže viši udio kampesterola, dok su ulja dobivena tradicionalnim sustavom prešanja bila karakterizirana višim razinama β-sitosterola i stigmasterola. Valja istaknuti da su uočene razlike bile neznatne. Ranalli i Angerosa (1996.) utvrdili su da su maslinova ulja talijanskih sorti Coratina i Nebbio dobivena uporabom trofaznog sustava sadržavala više koncentracije pojedinačnih i ukupnih alifatskih alkohola od onih dobivenih uporabom dvofaznog sustava ekstrakcije, dok su za ulja sorte Grossa di Cassano utvrđene podjednake razine. Slično je utvrđeno i za glavne triterpenske alkohole. U novijoj studiji Cercaci i suradnici (2007.) usporedili su različite sustave ekstrakcije (prešanje te centrifugiranje sa i bez recikliranja otpadnih voda iz mlina) u preradi maslina različitih stupnjeva zrelosti. Uočen je relativno slab učinak ekstrakcijske tehnologije na sastav sterola i triterpenskih diola u odnosu na stupanj zrelosti, a učinci dvaju čimbenika međusobno su interagirali. Učinkovitost inovativnog sustava ekstrakcije potpomognutog ultrazvukom ispitana je u industrijskom mjerilu te je utvrđeno da se ultrazvučnim sustavom ekstrahiralo više ukupnih sterola od standardnog načina prerade samo u kasnijoj fazi dozrijevanja, što su autori objasnili kao posljedicu

omekšavanja tkiva masline zbog povišene razine aktivnosti depolimerizirajućih enzima u kasnijem stadiju zrelosti plodova (Taticchi i sur., 2019.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadaci u ovom istraživanju su:

- okarakterizirati i usporediti djevičanska ulja važnih hrvatskih autohtonih sorti maslina u Istri na osnovi sastava i koncentracija sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola, odnosno utvrditi postoji li i koji su razmjeri utjecaja sorte;
- utvrditi utjecaj stupnja zrelosti plodova maslina važnih hrvatskih autohtonih sorti maslina u Istri na sastav i koncentracije sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola u proizvedenim djevičanskim uljima, odnosno utvrditi postoji li i koji su razmjeri utjecaja zrelosti plodova masline;
- istražiti utjecaj različitih temperatura čuvanja djevičanskog maslinovog ulja na sastav i koncentraciju spomenutih spojeva;
- utvrditi analitičke pokazatelje sortnog podrijetla neovisne o utjecaju stupnja zrelosti, odnosno utvrditi analitičke pokazatelje stupnja zrelosti plodova neovisne o utjecaju sorte među ispitivanim spojevima iz djevičanskog maslinovog ulja, te ispitati njihovu stabilnost i pouzdanost nakon određenog razdoblja čuvanja/skladištenja ulja u različitim uvjetima.

3.2. PLAN POKUSA

3.2.1. Odabir sorti

Na važećem Popisu sorti voćnih vrsta kojeg vodi Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (HAPIH) (HAPIH, 2021.) nalazi se trenutno 28 sorti maslina registriranih na temelju službeno priznatog opisa. Popis uključuje autohtone hrvatske i introducirane sorte maslina, ali nema podatka o zastupljenosti.

Prema podacima Agencije za upravljanje poljoprivrednim zemljištem od srpnja 2017. godine, zastupljenost sorti u maslinicima Republike Hrvatske je sljedeća: Oblica 66 %, Leccino 10 %, Lastovka 4 % i Buža 4 % dok su ostale sorte zastupljene u manjem postotku (DZS, 2018.a).

Odabrane su autohtone hrvatske sorte s područja istarskog poluotoka koje po svojoj zastupljenosti i/ili priznatoj kvaliteti predstavljaju velik potencijal za dodatnu valorizaciju i razvoj proizvoda. Sorta Buža odabrana je poglavito jer je cijenjena zbog svojih izvrsnih senzornih karakteristika. Sorte Črna i Rosinjola odabrane su zbog visokog udjela ulja u plodu i nutritivne vrijednosti s obzirom na potencijal nakupljanja visokog udjela fenolnih spojeva (Sladonja i sur., 2006. Brkić i sur., 2006, Poljuha i sur., 2008.; Lukić i sur., 2018.) koji su zaslužni za njihovo pozitivno snažno antioksidacijsko djelovanje.

3.2.2. Identifikacija istraživanih sorti

Sorte maslina uključene u ovo istraživanje navedene su na Popisu sorti voćnih vrsta (HAPIH, 2021.) kao:

Buža, sa sinonimima: *Buga*, *Burgaca*, *Morgaca*, *Domaća*, *Gura*,

Črna pod nazivom *Porečka rosulja*, te

Rosinjola pod nazivom Rošinjola, sa sinonimima: *Rosulja*, *Rovinješka*, *Rušinjola*.

S obzirom da se identifikacija sorti u ovom Popisu bazira pretežno na morfološkom opisu stabla i ploda, za autohtone hrvatske sorte pa tako i za sorte odabrane za ovo istraživanje koegzistiraju brojni sinonimi i homonimi, koji su prisutni ne samo u usmenoj predaji (Milotić i sur., 2005.; Poljuha i sur., 2008.b) već i u stručno-znanstvenim izvorima, što je ujedno i odraz trenutne situaciju u maslinarstvu u Hrvatskoj gdje je vrlo velik problem nabave i proizvodnje sadnica certificiranog sadnog materijala, naročito autohtonih sorti maslina.

U okviru projekta „Karakterizacija autohtonih sorti maslina u Istri“ (MB: MZOS-147-0000000-3605)“ (Centar za znanstvene informacije, 2022.) provedene su aktivnosti prikupljanja biljnog materijala s područja hrvatskog dijela istarskog poluotoka nakon pomnog promatranja, istraživanja distribucije i zastupljenosti. Provedeno je morfološko opisivanje uzoraka uzetih sa 64 izabrana stabla starih i najvažnijih sorti, tijekom tri godine, prema međunarodnoj standardiziranoj metodologiji. Morfološki su uzorci svrstani u 6 klastera. Tijekom istraživanja potvrđen je problem postojanja brojnih homonima i sinonima za autohtone sorte maslina, koji su posljedica ne samo tisućljetne prisutnosti maslina u Istri već i fenotipske varijabilnosti između genetički srodnih jedinki, kao posljedica okolišnih uvjeta uzgoja (Milotić i sur., 2005.; Poljuha i sur., 2008.b). Usporedno s morfološkom karakterizacijom provedena je genetička analiza. Morfološki opis sorti odabranih za ovo istraživanje objavljen je u radu Milotića i suradnika (2005.), a njihova genetička identifikacija pohranjena je u Hrvatskoj bazi podataka biljnih genetskih izvora (HAPIH, 2022.). Stabla izabrana za ovo istraživanje nalazila su se u nasadima u kojima je provedena i genetička identifikacja te su pojedina stabla identificirana morfološki kao sorte Buža, Črna, i Rosinjola. Odgovarajući genetički profili za sorte Buža, Črna, i Rosinjola nalaze u Hrvatskoj bazi podataka biljnih genetskih izvora (HAPIH, 2022.) (**Prilog 2**).

3.2.3. Karakteristike istraživanih sorti

Sorta Buža poznata je kao dobra uljna i stolna sorta. Osjetljiva je na nepovoljne vremenske uvjete tijekom cvatnje i time povezanim nepostojanim i neujednačenim prinosom ploda. Buža ima listove eliptično-kopljastog oblika, ravne (nisu uvinuti kao kod nekih sorti). Plod je kuglastog oblika i simetričan tako da je najveći promjer po sredini ploda. U cvatnji se odlikuje oskudnim brojem cvjetova, a plod tijekom dozrijevanja počinje ujednačeno mijenjati boju

pokožice. Karakteristike koštice ploda Buže su ovalni oblik s najvećim promjerom u sredini i zaobljenim vrhom i bazom. Površina koštice je hrapava (Milotić i sur., 2005.).

Listovi sorte Črna su eliptično-kopljastog oblika i također su ravni. Plod je ovalnog oblika i simetričan te ima najveći promjer po sredini ploda. U cvatnji se odlikuje oskudnim brojem cvjetova, a plod tijekom dozrijevanja počinje ujednačeno mijenjati boju pokožice. Karakteristike koštice ploda Črne su ovalni oblik s najveći promjerom u sredini i zaobljenim vrhom i šiljastom bazom. Površina koštice je naborana (Milotić i sur., 2005.).

Sorta Rosinjola daje ujednačen prinos i pogodna je za proizvodnju ulja. Otporna je na slanost i dobro uspijeva u tlu crvenici (*terra rossa*), vrsti crvenog glinenastog tla na karbonatnoj stijeni, što je karakteristično za istarski poluotok. Rosinjola ima ravan eliptičan list i simetričan, ovalni plod kojem je najveći promjer po sredini. U cvatnji se odlikuje oskudnim brojem cvjetova, a plod tijekom dozrijevanja počinje ujednačeno mijenjati boju pokožice. Karakteristike koštice ploda Rosinjole su eliptični oblik s najvećim promjerom prema vrhu. Vrh koštice je zaobljen dok je baza šiljasta, a površina koštice je hrapava (Milotić i sur., 2005.).

U usporedbi s drugim svjetskim sortama maslina, sorte maslina iz hrvatskog dijela istarskog poluotoka i sastav njihovog ulja do sada su samo djelomično istraženi (Koprivnjak, 1996.; Škevin i sur., 2003.; Koprivnjak i sur., 2005.; Milotić i sur., 2005.; Poljuha i sur., 2008.a, 2008b; Brkić Bubola, 2011.; Brkić Bubola i sur., 2012., 2018.).

3.2.4. Odabir i opis nasada

Sorta maslina Buža raspoređena je diljem istarskog poluotoka, s najvećom gustoćom na području Vodnjana te Rovinja i Pule. Črna je sorta koja je više zastupljena duž sjeverne obale istarskog poluotoka i u njegovoj unutrašnjosti uzduž kanala kojeg do mora otvara rijeka Mirna. Sorta Rosinjola tipično se nalazi na području Rovinja.

S obzirom na prirodnu rasprostranjenost u proizvodnim zonama karakterističnim za pojedinu istraživanu sortu, odabrana su dva reprezentativna nasada maslina odnosno maslinika na području istarskog poluotoka unutar relativno malog radijusa od 18 km, nenavodnjavana i sa sličnim pedoklimatskim uvjetima. Za potrebe ovog istraživanja izabrana su stara stabla autohtonih maslina.

Odabrani nasadi bili su karakterizirani sličnim agro-klimatskim uvjetima. Uzorci su prikupljeni 2006. godine (sezona ili berba 2006./2007.) u razdoblju berbe maslina tijekom mjeseci listopada i studenog.

Maslinik u kojem su uzorkovani plodovi Buže i Rosinjole smješten je četiri kilometra sjeverno od grada Rovinja (područje Valalta; približne koordinate: 45°7'31"N; 13°37'35"E), na ulasku u Limski kanal, u neposrednoj blizini mora i na nadmorskoj visini do 10 m iznad razine mora.

Blaga nagnutost terena prema zapadu i moru osigurava dobru osunčanost i prozračnost maslinika. Tlo u nasadu je tipična crvenica, srednje duboka.

Plodovi sorte Črna uzorkovani su u nasadu smještenom tri kilometra južno od naselja Brtonigla i 500 metara sjeverno od doline rijeke Mirne (naselje Čendaki; ARKOD ID: 1220091; približne koordinate: 45°20'52"N; 13°37'42"E), na nadmorskoj visini 110 m iznad razine mora. Blaga nagnutost terena prema jugu i dolini rijeke Mirne nasadu osigurava dobru osunčanost i drenažu hladnog zraka. Tlo u nasadu je crvenica, tipičnih fizikalno-kemijskih karakteristika, srednje duboka.

Srednja mjesečna temperatura zraka u vegetacijskom razdoblju za maslinu bila je minimalna u studenome (12 °C) i maksimalna u srpnju (25 °C), bez nepravilnosti ili ekstrema u razdoblju cvatnje i zrenja ploda. Najviša mjesečna količina padalina od 180 mm zabilježena je u svibnju, odnosno 170 mm u kolovozu. U preostalim mjesecima od travnja do studenog kretala se oko 50 mm, osim u lipnju kada je količina padalina bila 0 mm. Temperatura i padaline izmjereni su u meteorološkoj postaji Poreč koja se nalazi 11 km sjeverno od nasada Valalta, Rovinj i 14 km južno od nasada Čendaki, Brtonigla.

Za svaku od tri sorte odabrano je i obilježeno po devet stabala maslina (ukupno 27), s ciljem da se sa tri stabla maslina prikupi oko 100 kg ploda koliko je potrebno za pojedinu šaržu prerade u pojedinom stupnju zrelosti.

3.2.5. Određivanje stupnjeva zrelosti plodova maslina

Za potrebe provođenja ovog istraživanja praćeno je dozrijevanje plodova maslina na stablu na osnovi promjene boje pokožice, uzimajući u obzir dinamiku dozrijevanja poznatu iz iskustva. Nisu izabrani ekstremni stupnjevi zrelosti, već oni unutar vremenskog raspona koji je uobičajen za berbu maslina u Istri, a to je razdoblje od kraja rujna/početka listopada do sredine prosinca, ovisno o klimatskim uvjetima u pojedinoj godini. U praksi, kada se donosi odluka o proizvodnji ulja od plodova određenog stupnja zrelosti, trenutak berbe određuje se na osnovi obojenja pokožice i/ili pulpe plodova pri čemu općenito vrijedi da rani stupanj zrelosti odgovara plodovima koji su izvana zeleni ili žućkasti, srednji stupanj zrelost odgovara maslinama koje su počele mijenjati boju iz zelene u ljubičastu, a kao kasniji rok smatra se razdoblje u kojem su masline potpuno promijenile boju pokožice u ljubičasti ili crnu, s pulpom koja može biti manje ili više obojena.

Promjena boje pokožice ploda ne odvija se kod svih sorti jednako, što je za sorte na području Istre potvrđeno kroz istraživanje provedeno od Milotića i suradnika (2005.), niti se na istom stablu promjena boje ne odvija kod svih plodova istovremeno, pa je za preciznije određivanje stupnja zrelosti uveden tzv. indeks zrelosti (engl. *ripening index* ili *maturation index*) kako je predloženo od Uceda i Friasa (1975.) i opisano od strane Beltrána i suradnika (2004.). Ova

metoda zasniva se na procjeni obojenja pokožice i pulpe 100 plodova uzetih slučajnim odabirom. Vrijednosti stupnja odnosno indeksa zrelosti kreću se od 0 (intenzivno zelena pokožica i bijela pulpa) do 7 potpuno crna pokožica i ljubičasta pulpa ploda (**Tablica 2**). Nakon procjene boje 100 plodova i bilježenja odgovarajućeg broja (*A*), indeks zrelosti (*IZ*) izračunat je korištenjem formule (1):

$$\boldsymbol{IZ} = \frac{\sum(\boldsymbol{A_i n_i})}{\boldsymbol{100}} \quad (1),$$

gdje je:

A – oznaka za broj koji odgovara opisu određenog stupnja zrelosti prema Tablici 2,

n – broj plodova iz pojedine grupe (*i* = 0 – 7).

Tablica 2 Klasifikacija stupnjeva zrelosti plodova prema obojenju pokožice i pulpe

Stupanj zrelosti (A)	Opis obojenja pokožice	Opis obojenja pulpe
0	Intenzivno zelena	bijela
1	Žuta ili žućkasto zelena	bijela
2	Zelena s crvenkastim mrljama	bijela
3	Crvenkasta ili svijetlo ljubičasta	bijela
4	Crna	bijela
5	Crna	< 50 % ljubičasta pulpa
6	Crna	≥ 50 % ljubičasta pulpa
7	Crna	100 % ljubičasta pulpa

U sezoni berbe maslina 2006./2007. godine praćenjem promjene obojenja pokožice plodova maslina na obilježenim odabranim stablima u odabranim nasadima procijenjen je stupanj zrelosti plodova u ranom (I), srednjem (II) i kasnom stupnju zrelosti (III) za svaku sortu posebno te su na osnovi toga odabrani datumi berbe (**Tablica 3**). Težilo se da pojedini stupnjevi zrelosti za sve tri sorte budu što sličniji. Plodovi su brani ručno, a za svaku šaržu (određena sorta u određenom stupnju zrelosti) s po tri stabla maslina je ubrano oko 100 kg. Za preradu u ulje na osnovi vizualnog pregleda odabrani su neoštećeni plodovi koji su se smatrali zdravima.

Tablica 3 Datumi berbe te stupanj zrelosti plodova maslina, uključujući i indeks zrelosti za svaku od tri sorte uključene u istraživanje

Sorta masline (šifra)	Datum berbe (2006.)	Stupanj zrelosti prema procjeni boje pokožice plodova (šifra)	Oznaka uzorka ulja	Indeks zrelosti (*IZ*)
Buža (B)	25.10.	pretežno zeleni plodovi (I)	B I	1,4
	13.11.	prošarani plodovi (II)	B II	2,8
	29.11.	pretežno crni plodovi (III)	B III	3,8
Črna (Č)	19.10.	pretežno zeleni plodovi (I)	Č I	1,9
	09.11.	prošarani plodovi (II)	Č II	2,8
	28.11.	pretežno crni plodovi (III)	Č III	4,1
Rosinjola (R)	18.10.	pretežno zeleni plodovi (I)	R I	1,5
	24.11.	prošarani plodovi (II)	R II	3,2
	1.12.	pretežno crni plodovi (III)	R III	3,8

3.2.6. Prerada maslina

Uzorci ulja dobiveni su iz približno 100 kg plodova maslina u industrijskom mjerilu u komercijalnoj uljari (Cuj Leoni Kraljević, Farnežine b.b., Marija na Krasu, Umag).

Nakon branja, plodovi su odmah dopremljeni u uljaru i prerađeni u roku od 24 sata. Prije prerade svake pojedine šarže maslina, linija za preradu isprana je od ostataka prethodne šarže tako da dobiveni uzorci ulja budu reprezentativni za ubrane plodove. Ulja su dobivena hladnim postupkom (pri < 27 °C) u dvofaznoj liniji za preradu s kontinuiranim hladnim automatskim sustavom za ekstrakciju maslinovog ulja i s horizontalnim centrifugalnim separatorom (Oliomio Cultivar 500, Toscana Enologica Mori Snc., Italija). Masline su oprane i samljevene u mlinu s noževima od nehrđajućeg čelika. Pasta maslina transportirana je u okomitu mijesilicu (malaksator) gdje je tijesto maslina miješeno 35 ± 2 min na temperaturi 26 ± 1 °C. Ulje je izdvojeno iz paste maslina u vodoravnoj dvofaznoj centrifugi (dekanteru) kapaciteta 500 kg/sat. Od ukupne količine dobivenog ulja uzorkovan je srednji dio toka ulja na izlazu iz centrifuge.

Ovako dobivena ulja prenesena su u laboratorij gdje su nakon kraćeg razdoblja taloženja filtrirana kroz hidrofilni sloj vate kako bi se uklonila voda i preostale nečistoće. Od devet šarži ulja (3 sorte × 3 stupnja zrelosti) pripravljeni su reprezentativni laboratorijski uzorci tako što je ulje svake šarže podijeljeno u osam boca od tamnog stakla zapremine 125 mL, što je činilo ukupno 72 boce. Boce su napunjene do sredine grla, natprostor je ispunjen dušikom te su zatim zatvorene plastičnim čepom na navoj.

Dio uzoraka (3 sorte × 3 stupnja zrelosti × 2 boce, ukupno 18 uzoraka) analiziran je unutar mjesec dana od ekstrakcije ulja, a preostali uzorci skladišteni su 12 mjeseci.

3.2.7. Skladištenje

Preostali uzorci (3 sorte × 3 stupnja zrelosti × 2 boce × 3 različite temperature skladištenja, ukupno 54 uzorka) skladišteni su u mraku u razdoblju od 12 mjeseci pri tri različita temperaturna uvjeta: promjenljivoj sobnoj temperaturi (10 - 27 °C), temperaturi hlađenja (4 °C) i temperaturi zamrzavanja (-20 °C). Skladištenje uzoraka ulja na promjenjivoj sobnoj temperaturi predstavljalo je simulaciju skladištenja djevičanskog maslinovog ulja u kućanstvu, s prosječnom temperaturom od 17,3 °C. Skladišteni uzorci analizirani su nakon razdoblja od 12 mjeseci, u najkraćem mogućem vremenu.

3.3. MATERIJALI

Kemikalije i standardi

Kemijski standardi kolestanola (unutarnji standard u analizi sterola i triterpenskih diola), 1-eikosanola (C20, interni standard u analizi alifatskih i triterpenskih alkohola), β-sitosterola i

kolesterola nabavljeni su od proizvođača Supelco (Bellefonte, PA, SAD). Kemijski standard β-amirina nabavljen je od proizvođača Fluka (Buchs, Švicarska), a cikloartenola od proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD). Heksan, dietil eter, kloroform (svi kvalitete za kromatografiju), dietil eter, p.a., bezvodni natrijev sulfat, min 99 %, p.a. i otopina 2',7'-diklorofluoresceina nabavljene su od proizvođača Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Munchen, Njemačka). Kalijev hidroksid, min 85 %, p.a., i etanol, 96 %, p.a. nabavljeni su od Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska). Reagens piridin-heksametildisilizan-trimetilklorosilan (9:3:1, v/v/v) nabavljen je od proizvođača Supelco (SAD). Ploče sa silicij-oksidom (silika gel) za tankoslojnu kromatografiju bile su od proizvođača Fluka (Buchs, Švicarska). Čista deionizirana voda dobivena je iz Elix 3 sustava za pročišćavanje (Millipore, SAD).

3.4. METODE KEMIJSKE ANALIZE

Za određivanje koncentracija i relativnih udjela sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola uporabljene su službene metode Europske komisije odnosno Međunarodnog vijeća za maslinu (EK, 2019.; IOC, 2020.a).

Ekstrakcija

U tikvicu od 250 mL dodano je po 500 µL 0,2 %-tne otopine unutarnjeg standarda kolestanola (za sterole i triterpenske diole) odnosno eikozanola (za alifatske i triterpenske alkohole) u kloroformu. Kloroform je uparen do suha strujom dušika te je u tikvicu odvagano 5 g filtriranog uzorka maslinovog ulja. Dodano je 50 mL 2 M otopine kalijevog hidroksida u etanolu, na tikvicu je spojeno povratno hladilo te je otopina zagrijavana i održavana u laganom vrenju do završetka saponifikacije, odnosno dok otopina nije postala bistra (**Slika 3a**). Zagrijavanje je nastavljeno još 20 minuta, dodano je 50 mL destilirane vode preko vrha hladila, nakon čega je hladilo odvojeno, a tikvica ohlađena na oko 30 °C.

Sadržaj tikvice je kvantitativno prenesen u lijevak za odjeljivanje volumena 500 mL uz nekoliko ispiranja destiliranom vodom u ukupnoj količini od približno 50 mL. Dodano je 80 mL dietil etera, snažno mućkano 30 sekundi te ostavljeno da se slojevi razdvoje (**Slika 3 b i c**). Donja, vodena faza odvojena je u drugi lijevak za odjeljivanje te je ista ekstrahirana sa 70 mL dietil etera još dva puta. Ekstrakti su objedinjeni te ispirani destiliranom vodom u obrocima od 50 mL dok voda kojom se ispiralo nije bila neutralna. Iz ekstrakta su uklonjeni ostaci vode pomoću dodatka bezvodnog natrijevog sulfata te je ekstrakt dodatno filtriran kroz sloj bezvodnog natrijevog sulfata u prethodno izvaganu tikvicu od 250 mL. Lijevak i filtar su isprani malim količinama dietil etera.

Dietil eter je destiliran na volumen od nekoliko mililitara pomoću rotacionog uparivača (**Slika 3 d**) te uparen do suha strujom dušika. Sušenje ekstrakta dovršeno je u sušioniku pri 100 °C u

trajanju od oko 15 minuta (**Slika 3 e**), nakon čega je tikvica ohlađena u eksikatoru te izvagana. Na osnovi razlike masa pune i prazne tikvice, zabilježena je masa ukupne neosapunjive tvari.

Ploče sa silikagelom pripremljene su za tankoslojnu kromatografiju (engl. *thin-layer chromatography*, *TLC*) na način da su prethodno bile potpuno uronjene u otopinu 0,2 mol/L kalijevog hidroksida u etanolu na 10 sekundi, zatim ostavljene da se dva sata suše u digestoru i na kraju stavljene u sušionik na 100 °C na sat vremena. Ploče su zatim izvađene iz sušionika i pohranjene u eksikatoru napunjenom kalcijevim kloridom dok nisu bile potrebne za uporabu.

U komoru za razvijanje ulivena je smjesa heksana i dietil-etera u volumnom omjeru 65:35 % u sloju visine 1 cm. Komora je zatvorena odgovarajućim poklopcem i ostavljena tako na približno pola sata kako bi se uspostavila ravnoteža tekućine-para. Trake filtar-papira namočene u eluens postavljene su na unutarnje površine komore, čime je skraćeno vrijeme razvijanja za otprilike jednu trećinu te postignuto jednoličnije i pravilnije eluiranje komponenata.

Pripremljena je otprilike 5 %-tna otopina neosapunjive tvari u kloroformu, a 300 µL te otopine nanešeno je pomoću mikroštrcaljke od 100 µL na kromatografsku ploču od silikagela približno 2 cm od donjeg, lijevog i desnog ruba u što tanjem i jednoličnijem sloju (**Slika 3 f**). Poravnano s nanosom, naneseno je između 2 i 3 µL otopine unutarnjih standarda kolestanola (za sterole i triterpenske diole) i eikozanola (za alifatske i triterpenske alkohole) na različitim rubovima ploče, tako da se vrpce, tj. razdvojeni slojevi sterola i triterpenskih diola, odnosno alifatskih i triterpenskih alkohola mogu identificirati nakon razvijanja.

Ploča je smještena unutar komore za razvijanje te odmah zatvorena. Temperatura je održavana između 15 i 20 °C. Provedeno je eluiranje dok prednji dio otapala nije dostigao udaljenost od približno 1 cm od gornjeg ruba ploče (**Slika 3 g**). Ploča je zatim izvađena iz komore za razvijanje, a otapalo ispareno pod strujom vrućeg zraka.

Ploča je zatim blago i jednoliko pošpricana otopinom 2,7-diklorofluoresceina, stavljena pod ultraljubičastu svjetlost te su na osnovi mrlja dobivenih eluiranjem unutarnjih standarda identificirani slojevi sterola i triterpenskih diola kao jedan, odnosno alifatskih i triterpenskih alkohola kao drugi sloj (**Slika 3 h**). Granice slojeva označene su uz rub fluorescencije crnom olovkom te su slojevi odvojeno sastrugani metalnom spatulom (**Slika 3 i**). Za oba sloja odvojeno sastrugani materijal razmrvljen je u fini prah i prenesen u lijevak za filtriranje s filtar papirom. Dodano je 10 mL vrućeg kloroforma te je smjesa strugotina i kloroforma pažljivo miješana spatulom i zatim filtrirana pod vakuumom u Erlenmeyerovu tikvicu. Strugotine su dodatno isprane s tri puta po 10 mL dietil etera u istu tikvicu spojenu na lijevak. Filtrat je uparen na volumen između 4 i 5 mL, prenesen u prethodno izvaganu epruvetu od 10 mL, te je ostatak otapala uparen laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika. Dodano je nekoliko kapljica acetona koji su ponovno ispareni sušenjem, a zatim je epruveta smještena u sušionik na 105 °C na približno 10 minuta, ostavljena da se ohladi u eksikatoru i izvagana. Ostatak unutar

epruveta sastojao se od frakcije sterola i triterpenskih diola iz prvog sloja u jednoj, odnosno alifatskih i triterpenskih alkohola iz drugog sloja u drugoj epruveti.

Reagens za sililaciju pripremljen je miješanjem piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u volumnom omjeru 9:3:1 ili je korištena komercijalna smjesa te je dodano po 50 µL po svakom miligramu sterola i triterpenskih diola, odnosno alifatskih i triterpenskih alkohola. Otopina je centrifugirana. Tako dobiveni ekstrakti svakog uzorka podvrgnuti su plinskokromatografskoj analizi.

Plinskokromatografska analiza

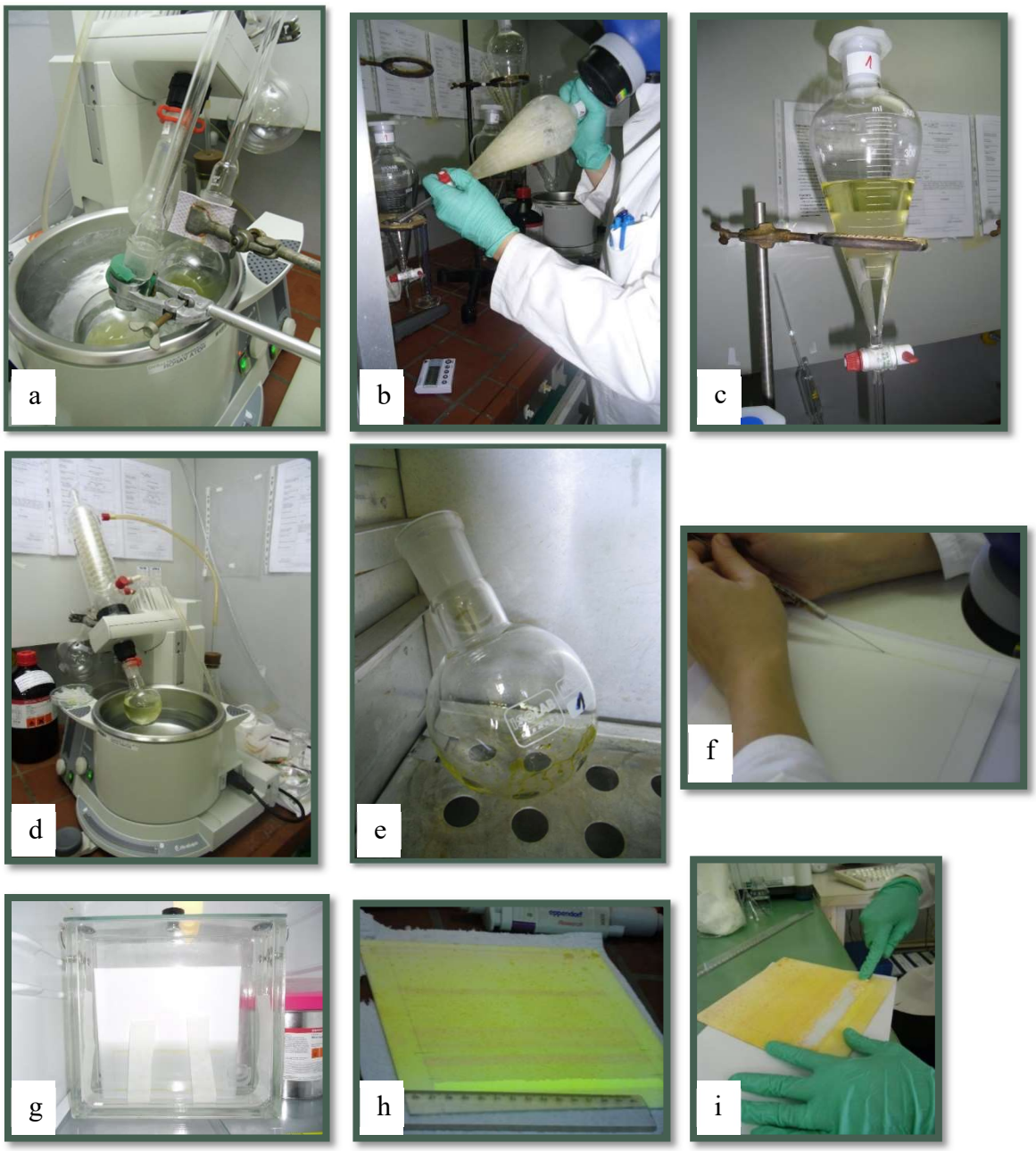
Identifikacija i kvantitativno određivanje sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola kao odgovarajućih trimetilsilil etera provedeni su uporabom plinskog kromatografa s plamenoionizacijskim detektorom Varian 3350 (Varian Inc., Harbour City, CA, SAD) opremljenog s kapilarnom kolonom od taljenog silicijevog dioksida Varian VF-5 ms (Varian Inc., SAD) s nepokretnom fazom 5 % fenil : 95 % dimetilpolisiloksan duljine 30 metara, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljinom sloja nepokretne faze od 0,25 µm (**Slika 4**).

Steroli i triterpenski dioli analizirani su zajedno kao odgovarajući trimetilsilil eteri. Temperature injektora, kolone i detektora tijekom izotermalnog razdvajanja u trajanju od 40 minuta bile su 280 °C, 260 °C, odnosno 290 °C. Ubrizgan je 1 µL ekstrakta uz cijepanje protoka plina nositelja u omjeru 1:50. Plin nositelj bio je helij s početnom brzinom protoka od 1,27 mL/min. Steroli i triterpenski dioli identificirani su kao trimetilsilil eteri na osnovi njihovih relativnih vremena zadržavanja u kromatografskoj koloni u odnosu na vrijeme zadržavanja trimetilsilil etera unutarnjeg standarda kolestanola, prema normiranoj standardnoj metodi Međunarodnog vijeća za maslinu (IOC, 2020.) preuzetoj i u Uredbi Komisije 2568/91 kao Prilog XIX (EK, 2019.). Karakterističan kromatogram trimetilsilil etera sterola i triterpenskih diola prikazan je lijevo na **Slici 4**. Koncentracije su izražene u mg/100 g ulja u odnosu na koncentraciju kolestanola, pretpostavljajući jednak faktor odziva. Relativni udjeli izraženi su kao postotni udjeli (%) u odnosu na koncentraciju ukupnih sterola, dok su relativni udjeli triterpenskih diola eritrodiola i uvaola izraženi kao postotni udjeli (%) u odnosu na koncentraciju ukupnih sterola uvećanu za koncentracije eritrodiola i uvaola. Ukupni (prividni) β-sitosterol izračunat je prema standardnoj metodi (IOC, 2020.; EK, 2019.) kao zbroj $\Delta^{5,23}$-stigmastadienola, klerosterola, β-sitosterola, sitostanola, Δ^{5}-avenasterola i $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola.

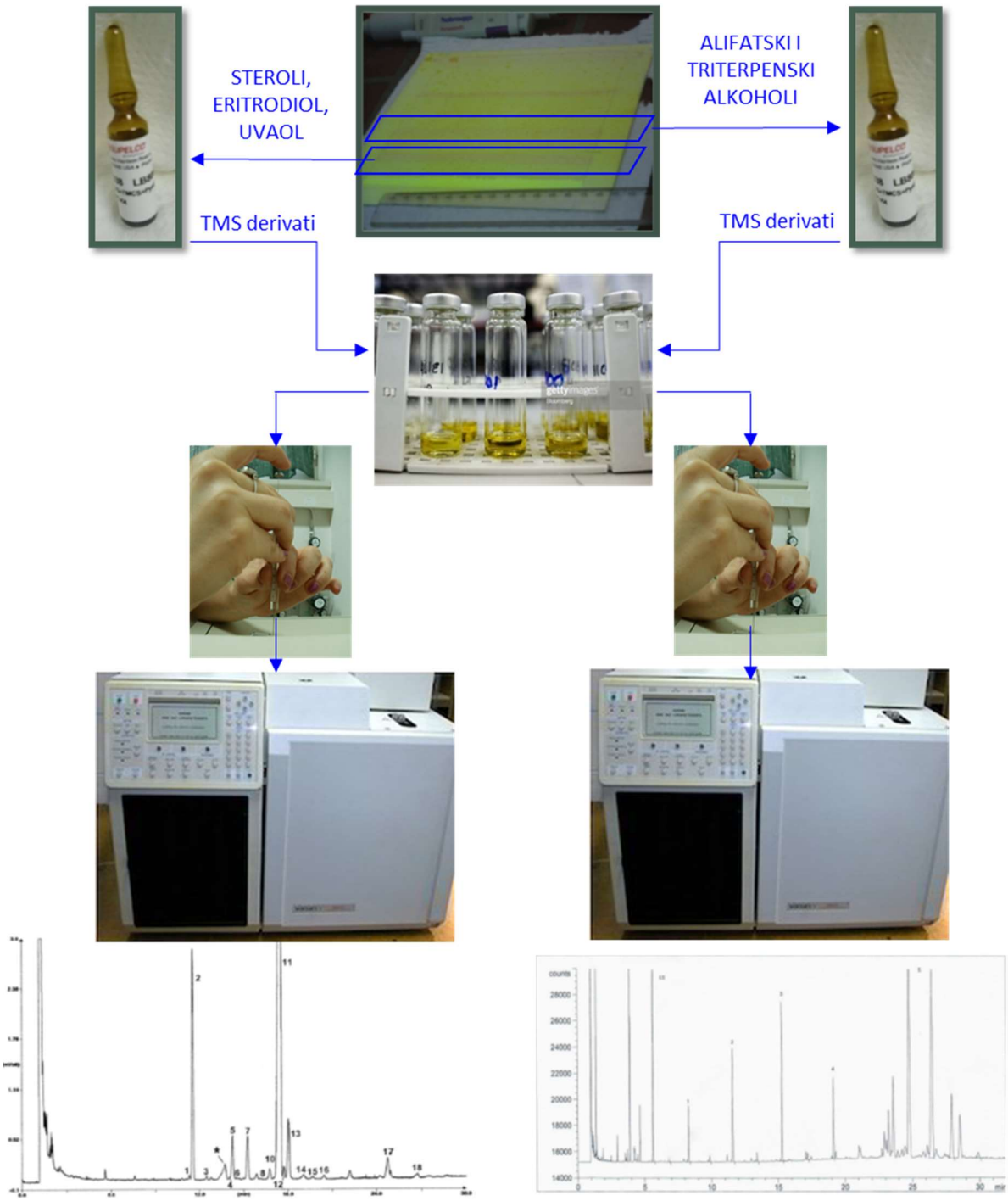
Alifatski i triterpenski alkoholi analizirani su zajedno kao odgovarajući trimetilsilil eteri, istim instrumentom, ali različitim temperaturnim programom: početna temperatura kolone bila je 180 °C, nakon čega je kolona zagrijana brzinom od 2 °C u minuti do 280 °C te je ta temperatura održavana do kraja analize, u ukupnom trajanju od 65 minuta. Trimetilsilil eteri alifatskih alkohola su identificirani na osnovi relativnih vremena zadržavanja u kromatografskoj koloni u odnosu na vrijeme zadržavanja trimetilsilil etera unutarnjeg standarda eikozanola, odnosno

vremena zadržavanja trimetilsilil etera alkohola iz homolognog niza, prema standardnoj metodi (IOC, 2020.; EK, 2019.). Detaljni opis identifikacije triterpenskih alkohola na osnovi plinske kromatografije i spektrometrije masa opisan je u sljedećem odlomku. Karakterističan kromatogram trimetilsilil etera alifatskih i triterpenskih alkohola prikazan je desno na **Slici 4**. Kromatografske pikove spojeva gramisterola i cikloeukalenola nije bilo moguće u potpunosti razdvojiti te su rezultati izraženi kao suma ta dva spoja. Koncentracije alifatskih i triterpenskih alkohola izražene su u mg/100 g ulja u odnosu na koncentraciju eikozanola, pretpostavljajući jednak faktor odziva. Relativni udjeli izraženi su kao postotni udjeli (%) u odnosu na koncentraciju ukupnih alifatskih alkohola, odnosno ukupnih triterpenskih alkohola.

Rezultati analize svakog od 18 uzoraka svježih ulja izraženi su kao srednja vrijednost tri ponovljene plinskokromatografske analize, a rezultati analize svakog od 54 uzorka skladištenih ulja kao srednja vrijednost dvije plinskokromatografske analize.



Slika 3 Koraci u ekstrakciji sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola: a) saponifikacija, b) - e) izdvajanje neosapunjive frakcije, f) nanošenje alikvota neosapunjive frakcije na ploču sa silikagelom, g) tankoslojna kromatografija na sloju silikagela u komori za razvijanje, h) razvijena ploča sa silikagelom pod ultraljubičastim svjetlom i identifikacija frakcija/slojeva, i) struganje odgovarajućih frakcija/slojeva sa sterolima i triterpenskim diolima ili alifatskim i triterpenskim alkoholima



Slika 4 Shematski prikaz postupka silanizacije i plinskokromatografska analiza, kao odvojenih postupaka u analizi sterola i triterpenskih diola te alifatskih i triterpenskih alkohola

Identifikacija alifatskih i triterpenskih alkohola

Identifikacija trimetilsilil etera triterpenskih alkohola iz skupina 4-metil-sterola i 4,4′-dimetil-sterola provedena je pomoću vezanog sustava plinski kromatograf Varian 3900 – spektrometar masa Varian Saturn 2100T (Varian Inc., SAD). Spektrometar masa sadržavao je analizator na osnovi ionske stupice (engl. *ion trap*). Korištena je ista kapilarna kolona Varian VF-5 ms te parametri zagrijavanja kolone kao i za ranije opisano kvantitativno određivanje. Temperatura injektora bila je 280 °C. Temperature transfer linije, razvodnika (engl. *manifold*) i analizatora bile su 285 °C, 80 °C, odnosno 220 °C. Ubrizgan je 1 µL ekstrakta uz cijepanje protoka plina nositelja u omjeru 1:50. Kao plin nositelj korišten je helij sa stalnim protokom od 1,2 mL/min. Spektri masa dobiveni su nakon ionizacije udarom snopa elektrona energije 70 eV uz rezoluciju od jednog snimka po sekundi, a sniman je raspon masa od 30 od 650 *m/z*. Triterpenski alkoholi identificirani su na osnovi interpretacije vremena zadržavanja i spektara masa te usporedbom s vremenima zadržavanja i spektrima masa pronađenim u literaturi (Kuroda i sur., 1977.; Li i sur., 2000.; Wretensjö i Karlberg, 2002.; Bauer i sur., 2004.; Damirchi i sur., 2007.; Li i sur., 2007.; Sakouhi i sur., 2009.; Harrabi sur., 2009.; Mezghache i sur., 2010.;Cherif i sur., 2011.; Wang i sur., 2011.; Berasategi i sur., 2012.; Xu i sur., 2012.), kao i spektrima masa trimetilsilil etera ili acetata iz biblioteke spektara NIST05 ukoliko su bili dostupni. Utvrđena vremena zadržavanja te ionski fragmenti trimetilsilil etera pojedinih triterpenskih alkohola poredani na osnovi rastućih masa prikazani su u **Tablici 4**.

Tablica 4 Vremena zadržavanja (t_R) i mase ionskih fragmenata (*m/z*) identificiranih triterpenskih alkohola [1]

Triterpenski alkohol	t_R (min)	Mase (*m/z*) glavnih i karakterističnih iona (relativni intenziteti)
4-monometil-steroli		
Obtusifoliol	49,83	41 (32), 67 (25), 69 (30), 73 (38), 75 (30), 81 (30), 95 (38), 109 (32),189 (43), 227 (36), 393 (100), 394 (29), 483 (33), 498 (14)
Gramisterol + cikloeukalenol	51,45	55 (28), 69 (22), 73 (50), 75 (40), 105 (31), 121 (18), 159 (31), 227 (30), 241 (43), 267 (40), 269 (20), 357 (81), 379 (25), 393 (23), 394 (20), 407 (100), 408 (34), 469 (16), 483 (6), 484 (7), 498 (12), 512 (8)
Citrostadienol	55,52	55 (19), 73 (15), 75 (15), 145 (11), 227 (10), 241 (7), 267 (40), 295 (12), 310 (8), 357 (100), 358 (29), 393 (10), 400 (17), 408 (3), 483 (5), 498 (2)
4,4'-dimetil-steroli		
δ-amirin	49,48	69 (30), 73 (65), 75 (56), 95 (62), 109 (54), 121 (65), 135 (42), 147 (48), 189 (100), 190 (39), 203 (49), 204 (81), 218 (35), 269 (93), 284 (38), 359 (32), 393 (32), 483 (8), 498 (5)
β-amirin	50,20	73 (23), 75 (17), 95 (15), 119 (14), 135 (10), 147 (14), 189 (41), 190 (17), 203 (100), 204 (17), 218 (40), 393 (4), 483 (2), 498 (1)
butirospermol	50,88	41 (15), 69 (19), 73 (20), 75 (14), 81 (14), 95 (13), 109 (14), 241 (18), 393 (100), 394 (30), 483 (10), 498 (4)

cikloartenol	52,12	41 (36),69 (45), 73 (43), 95 (38), 109 (31), 189 (19), 271 (9), 339 (35), 365 (49), 393 (100), 394 (30), 408 (17), 483 (8), 498 (3)
24-metilencikloartanol	53,94	55 (31), 69 (63), 73 (65), 81 (50), 95 (70), 107 (58), 109 (50), 135 (50), 147 (52), 269 (24), 297 (22), 353 (44), 379 (83), 407 (100), 408 (30), 422 (28), 497 (8), 512 (2)

[1] Identitet β-amirina i cikloartenola dodatno je potvrđen usporedbom njihovih vremena zadržavanja i spektara masa s onima komercijalno dostupnih čistih standarda.

Validacija metoda

Kako je uporabljena službena metoda (EK, 2019.) normirana za analizu sterola i triterpenskih diola, odnosno alifatskih alkohola (Aneks XIX), provedena je djelomična validacija, odnosno verifikacija prikladnosti metode za namijenjenu uporabu. Preciznost metode analize sterola i triterpenskih diola bila je visoka, s relativnom standardnom devijacijom uglavnom nižom od 3 % (n = 2). Točnost metode provjeravana je periodički analizom uzorka u koji je dodana određena koncentracija β-sitosterola (20 mg/100 g) i kolesterola (10 mg/100 g). Prosječan povrat (iskorištenje) bio je 99 % za β-sitosterol, odnosno 97 % za kolesterol. Preciznost analize alifatskih alkohola također je bila visoka, s relativnom standardnom devijacijom uglavnom nižom od 3,4 % u slučaju alkohola s parnim brojem atoma ugljika i uglavnom nižom od 6,0 % u slučaju alkohola s neparnim brojem atoma ugljika (n = 2).

Iako službena metoda predviđa analizu triterpenskih alkohola iz skupina 4-metil-sterola i 4,4'-dimetil-sterola, ona za tu svrhu nije normirana pa je iz tog razloga provedena opsežnija validacija tog dijela metode.

Preciznost metode bila je visoka, s relativnim standardnim devijacijama općenito ne višim od 7 %, a u slučaju glavnih spojeva, kao što su citrostadienol, butirospermol, cikloartenol i 24-metilencikloartanol, ne višima od 4 % (n = 2). Kako bi se utvrdila linearnost, provedene su tri ponovljene analize uzorka obogaćenog s tri različite koncentracije kemijskih standarda β-amirina (2, 5 i 10 mg/100 g ulja) i cikloartenola (10, 30 i 50 mg/100 g ulja). Dobiveni koeficijenti korelacije od 0,997 za β-amirin i 0,993 za cikloartenol bili su zadovoljavajući. Isti podaci korišteni su za određivanje vrijednosti povrata (iskorištenja), koji se kretao od 92 % do 103 % s prosjekom od 96 % za β-amirin (n = 9) i od 94 % do 100 % s prosjekom od 98 % za cikloartenol (n = 9). Granice detekcije (engl. *limit of detection*, *LOD*) procijenjene su kao koncentracije triterpenskih alkohola koje proizvode signal plamenoionizacijskog detektora tri puta intenzivniji od signala šuma bazne linije i kretale su se od 0,056 mg/100 g za obtusifoliol do 0,092 mg/100 g za β-amirin. Granice kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, *LOQ*) procijenjene su kao koncentracije triterpenskih alkohola koje proizvode signal plamenoionizacijskog detektora 10 puta intenzivniji od signala šuma bazne linije i kretale su se od 0,185 mg/100 g za obtusifoliol do 0,306 mg/100 g za β-amirin. Budući da su se granice detekcije i kvantifikacije za pojedinačne triterpenske alkohole donekle mijenjale ovisno o

osjetljivosti detektora u danom trenutku, zabilježene su prosječne vrijednosti tijekom validacije metode i analiza.

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka provedena je uporabom univarijatne metode statističke analize jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i multivarijatnih metoda statističke analize, kao što su nenadzirana metoda analiza glavnih sastavnica (engl. *Principal Component Analysis*, *PCA*) i nadzirana linearna diskriminantna analiza (engl. *Linear Discriminant Analysis*, *LDA*).

Kao varijable korištene su vrijednosti koncentracija (mg/100 g) i relativnih udjela (%) svih analiziranih spojeva iz skupina sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola, a u pojedinim slučajevima i odabrani omjeri koncentracija određenih parova ispitivanih spojeva. Također, u univarijatnoj statističkoj analizi (ANOVA) kao varijable su korištene i koncentracije ukupnih sterola, ukupnih alifatskih alkohola, ukupnih 4-metil-sterola, ukupnih 4,4'-dimetil-sterola i ukupnih triterpenskih alkohola. Za izračunavanje prosječnih vrijednosti varijabli za svaki tretman/kombinaciju sorte × stupnja zrelosti ili sorte × stupnja zrelosti × uvjeta skladištenja korištene su prosječne vrijednosti rezultata analize dvaju uzoraka određenog tretmana/kombinacije (n = 2).

Istraživan je utjecaj sljedećih faktora:

- sorta, s tri razine: Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R);
- stupanj zrelosti, s tri razine: raniji stupanj zrelosti (I), srednji stupanj zrelosti (II) i kasniji stupanj zrelosti (III) te
- skladištenje s četiri razine:
    - početno ili svježe ulje;
    - ulje skladišteno 12 mjeseci na promjenjivoj sobnoj temperaturi;
    - ulje skladišteno 12 mjeseci na temperaturi hlađenja i
    - ulje skladišteno 12 mjeseci na temperaturi zamrzavanja.

Za procjenu neovisnog utjecaja pojedinog faktora na istraživane spojeve u svježem maslinovom ulju, utvrđene su statistički značajne razlike između koncentracija i relativnih udjela istraživanih spojeva u svježim maslinovim uljima različitih sorti istog stupnja zrelosti te statistički značajne razlike između koncentracija i relativnih udjela istraživanih spojeva u svježim maslinovim uljima različitih stupnjeva zrelosti iste sorte primjenom jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i post-hoc analizom testom najmanjih značajnih razlika, tzv. Fisherovim LSD (engl. *Least Significant Difference*) testom, na razini značajnosti $p < 0,05$. Rezultati su predstavljeni kao histogrami. Statistički značajne razlike, ukoliko su utvrđene, obilježene su na pripadajućem tretmanu različitim velikim slovima za faktor sorta, odnosno malim slovima za faktor stupanj zrelosti.

Prije nego što su podvrgnuti multivarijatnoj statističkoj analizi, podaci su normalizirani (centrirani) na način da je za svaku varijablu vrijednost za svaki uzorak oduzeta od njene prosječne vrijednosti u cijelom skupu podataka, a razlika se zatim podijelila sa standardnom devijacijom te varijable kroz cijeli skup podataka (Kowalski i Bender, 1972.). Na primjer, rezultat za koncentraciju kolesterola u uzorku Buže ranijeg stupnja zrelosti (I) oduzet je od srednje vrijednosti koncentracije kolesterola u svim uzorcima (sve tri sorte, svih stupnjeva zrelosti) i razlika je podijeljena s pripadajućom standardnom devijacijom.

Za svaki faktor odvojeno, PCA analiza provedena je kako bi se uzorci u višedimenzionalnom prostoru razdvojili na osnovi tog faktora pomoću glavnih komponenti dobivenih iz skupa podataka i kako bi se u isto vrijeme odredilo koje varijable najviše doprinose tom razdvajanju. Za odabir glavnih sastavnica (engl. *Principal Component*, *PC*) slijedilo se Kaiserovo pravilo i u obzir su uzimane samo sastavnice s vlastitim vrijednostima (engl. *eigenvalue*) višim od 1,00. Kod preliminarnog testiranja varijabli za PCA analizu prednost kod odabira imale su varijable s najvišim *F* vrijednostima određenim analizom varijance (ANOVA), a zatim su isprobane i druge varijable. Isprobani su različiti PCA modeli s različitim kombinacijama varijabli, a za prikaz su odabrani oni kojim je postignuto najbolje razdvajanje uzoraka na osnovi pojedinih faktora.

Za statističko razdvajanje maslinovih ulja u grupe ili razlikovanje na osnovi određenog faktora te za potvrdu najkorisnijih varijabli za postizanje razdvajanja, primijenjena je postupna linearna diskriminantna analiza (engl. *Linear Discriminant Analysis*, LDA) analiza koristeći Wilkov lambda kao kriterij odabira i *F* vrijednost kako bi se utvrdila značajnost promjena pri testiranju nove varijable. Odabrana minimalna vrijednost *F* za ulazak određene varijable u LDA model bila je 1,00, a vrijednost minimalne tolerancije postavljena je na 0,01.

Multivarijatne analiza (PCA i LDA) provedene su sa skupom svježih ulja (18 uzoraka) da bi se odvojeno utvrdila mogućnost razlikovanja svježih maslinovih ulja na osnovi sorte odnosno stupnja zrelosti te sa skupovima svježih (18 uzoraka) i skladištenih ulja (54 uzoraka) odjednom da bi se utvrdila mogućnost razlikovanja maslinovih ulja na osnovi sorte i stupnja zrelosti nakon razdoblja skladištenja. Rezultati PCA i LDA analize prikazani su odgovarajućim grafovima.

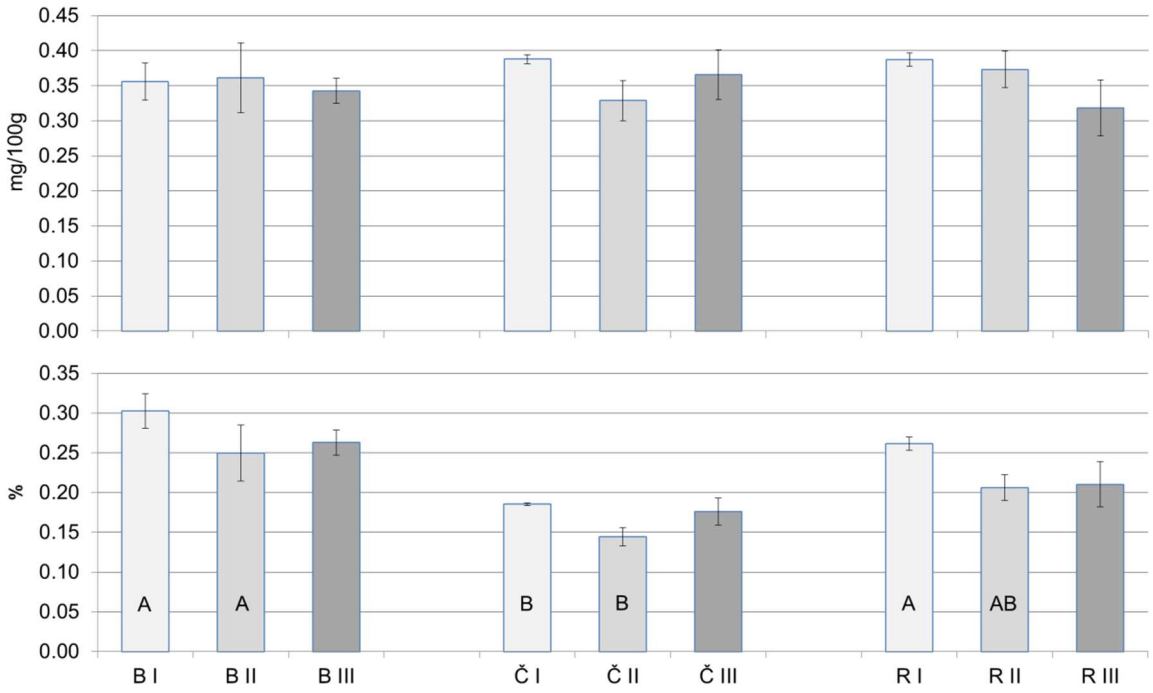
Za utvrđivanje utjecaja uvjeta skladištenja provedena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i to zasebno za svaki tretman sorta × stupanj zrelosti uspoređujući četiri razine skladištenja: svježe ulje, ulje skladišteno na promjenjivoj sobnoj temperaturi, ulje skladišteno na temperaturi hlađenja i ulje skladišteno na temperaturi zamrzavanja. Rezultati su prikazani tablično.

Zbog znatno većeg stupnja varijabilnosti uzrokovanog faktorima sorta i stupanj zrelosti u odnosu na faktor skladištenje, za bolje sagledavanje promjena u sastavu istraživanih maslinovih ulja kao posljedice (temperature) skladištenja te uočavanje ponavljajućih obrazaca neovisno o sorti i stupnju zrelosti, provedena je normalizacija (centriranje) kroz sve razine

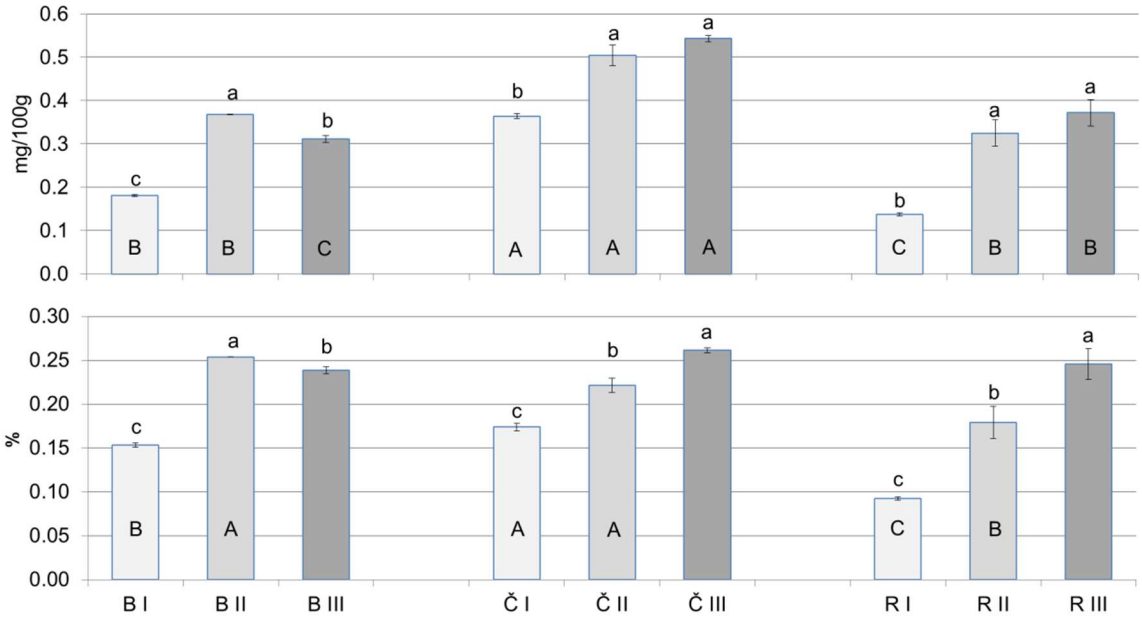
svakog pojedinog tretmana sorta × stupanj zrelosti. Normalizacija je uključivala oduzimanje vrijednosti svake varijable od njene prosječne vrijednosti u skupu podataka svakog tretmana (sorta × stupanj zrelosti) s po četiri razine (svježe ulje i 3 tretmana skladištenja), a razlika je zatim podijeljena sa standardnom devijacijom te varijable kroz skup podataka svakog tretmana s po četiri razine. Na taj način dobivene su vrijednosti relativnih promjena uslijed skladištenja, dok je utjecaj faktora sorte i stupnja zrelosti eliminiran. Normalizirane vrijednosti uporabljene su za PCA i LDA analizu i grafički prikaz promjena na osnovi trajanja i uvjeta skladištenja.
Statistička obrada podataka provedena je korištenjem komercijalnog računalnog programa Statistica 13.2 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD).

4. REZULTATI

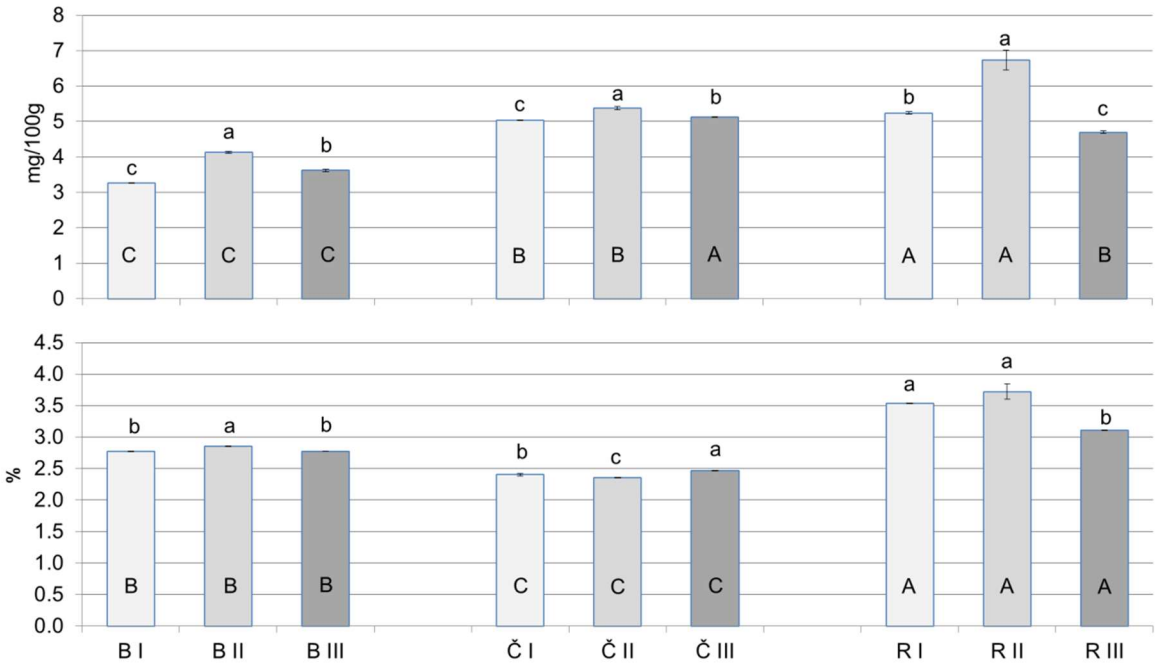
4.1. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA STEROLE I TRITERPENSKE DIOLE U SVJEŽIM ULJIMA



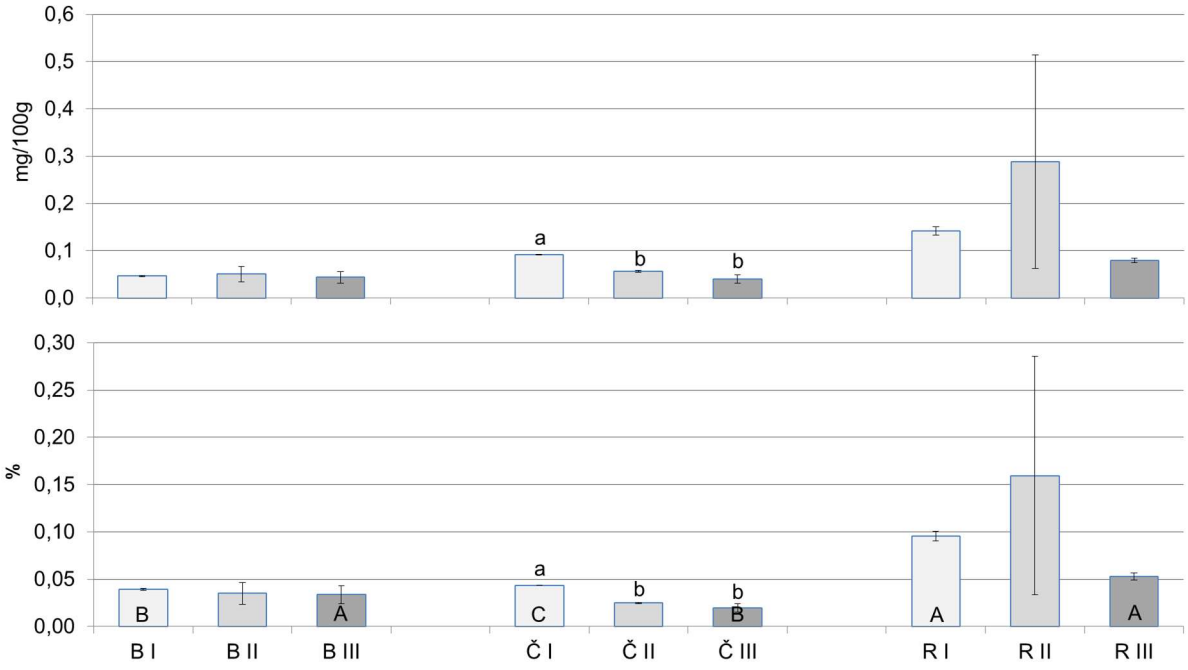
Slika 5 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **kolesterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



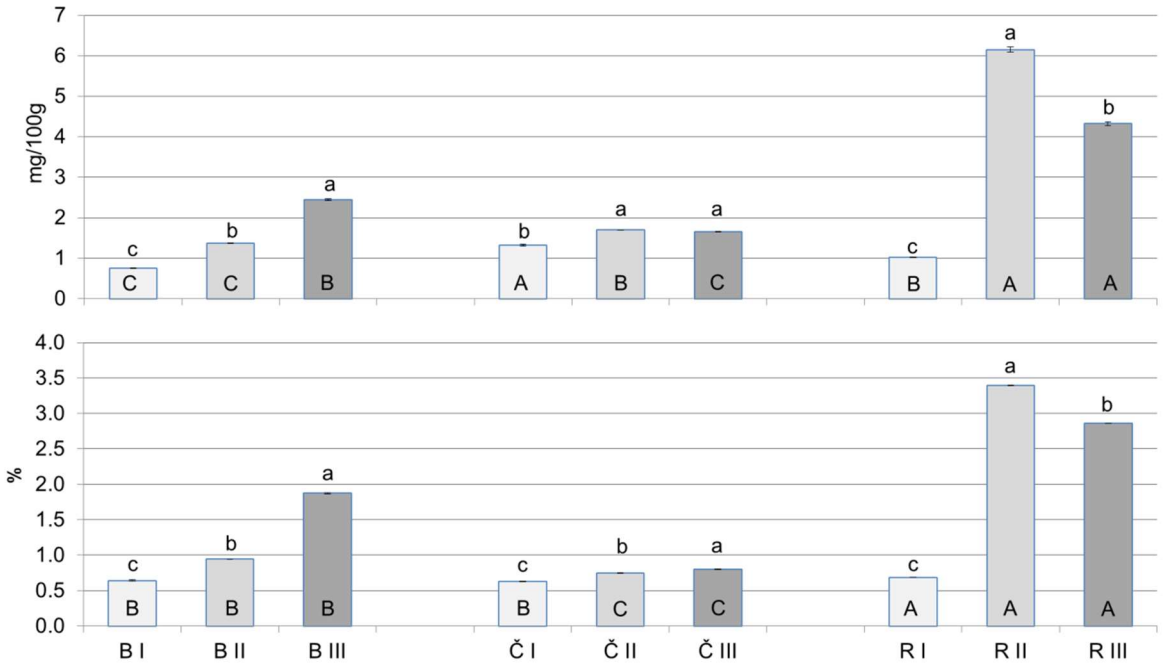
Slika 6 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **24-metilen-kolesterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



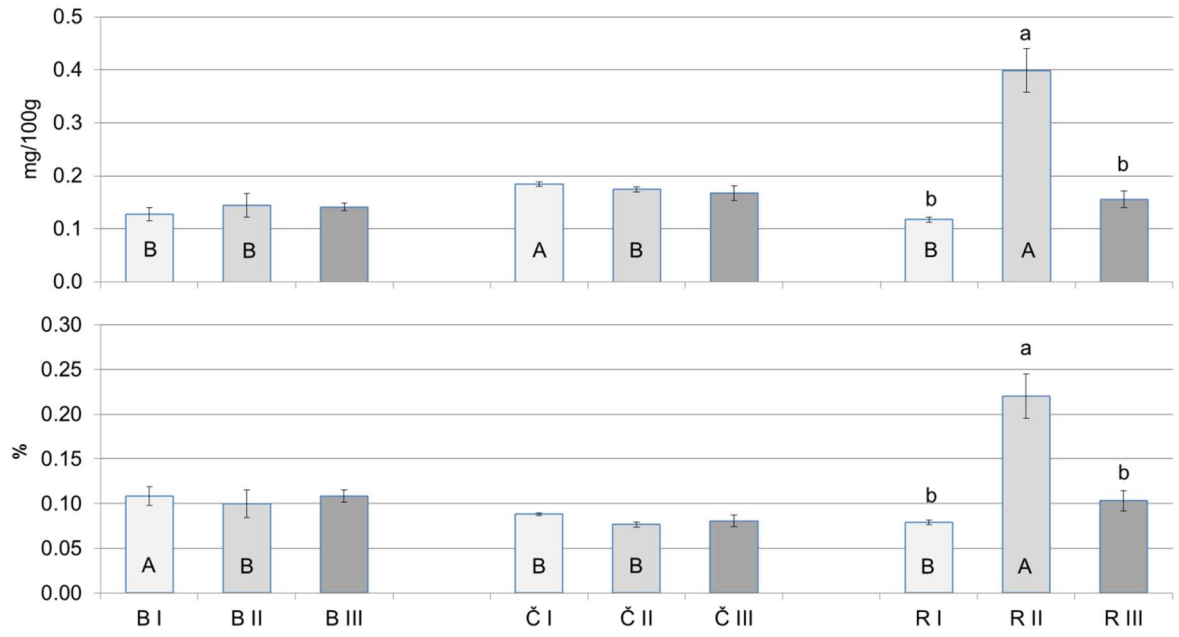
Slika 7 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **kampesterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



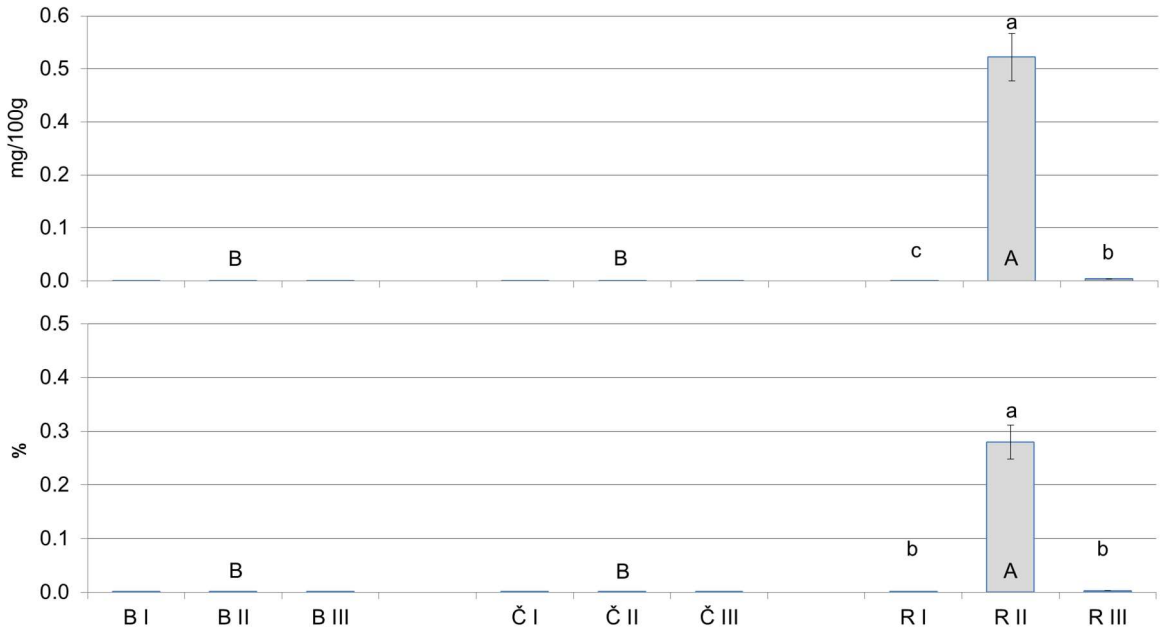
Slika 8 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **kampestanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



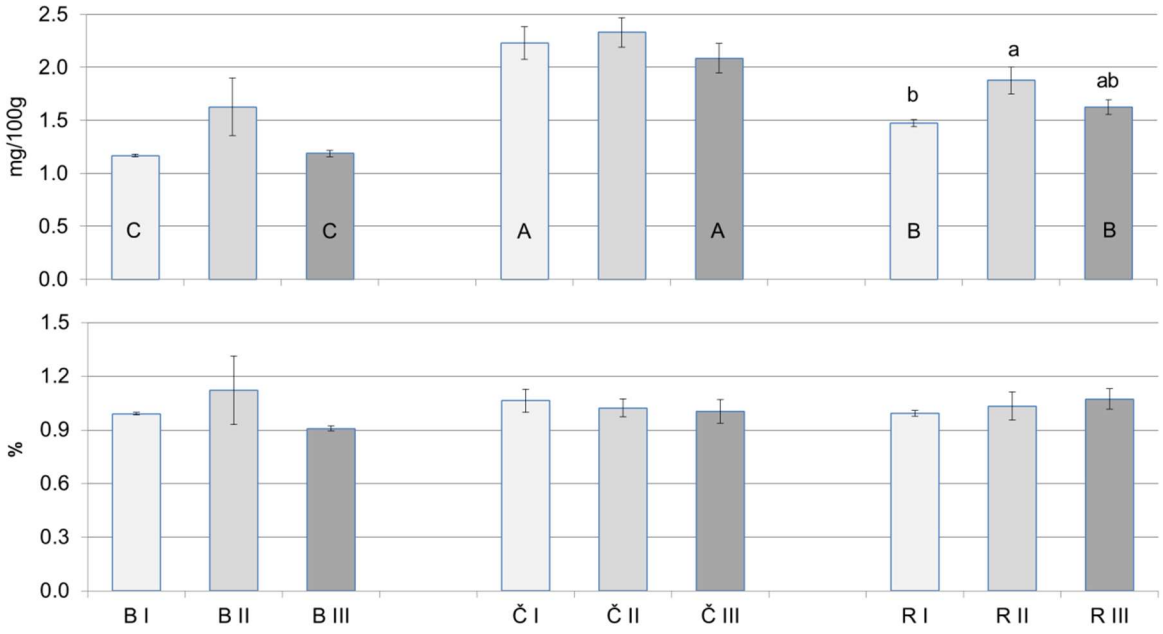
Slika 9 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **stigmasterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



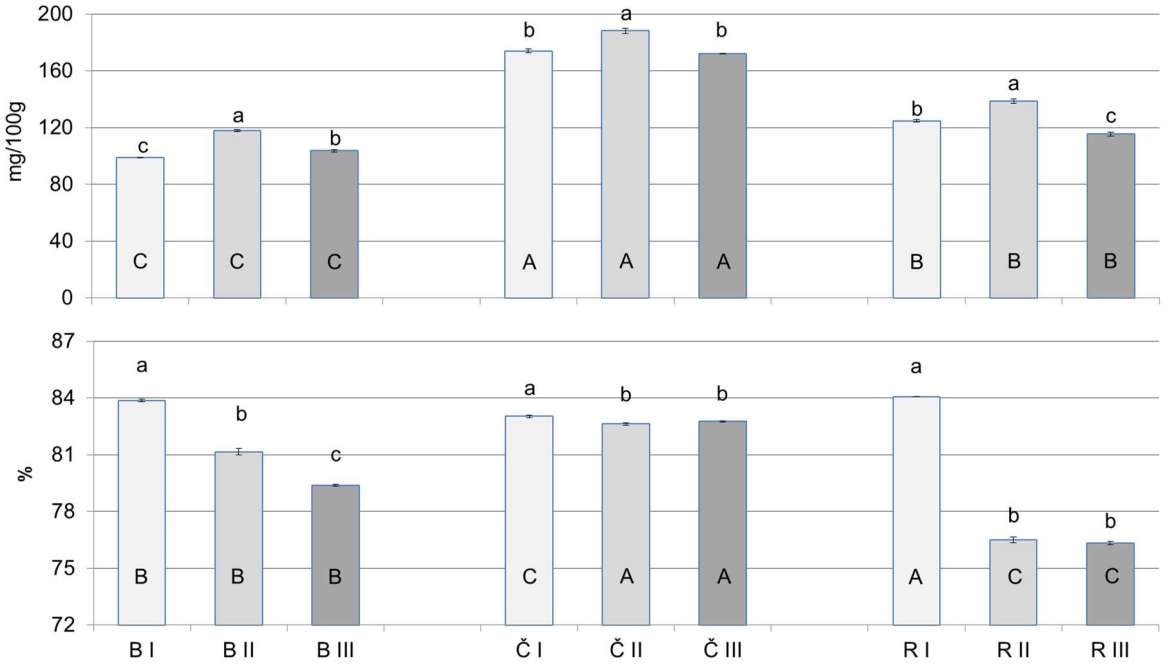
Slika 10 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **Δ^7-kampesterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



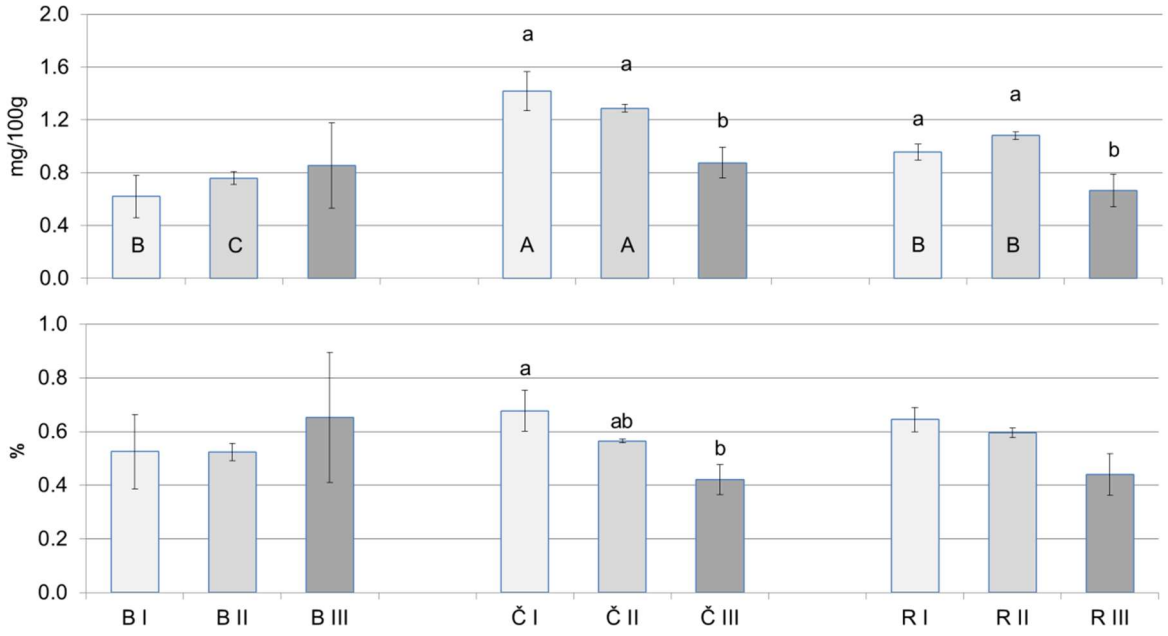
Slika 11 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **$\Delta^{5,23}$-stigmastadienola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



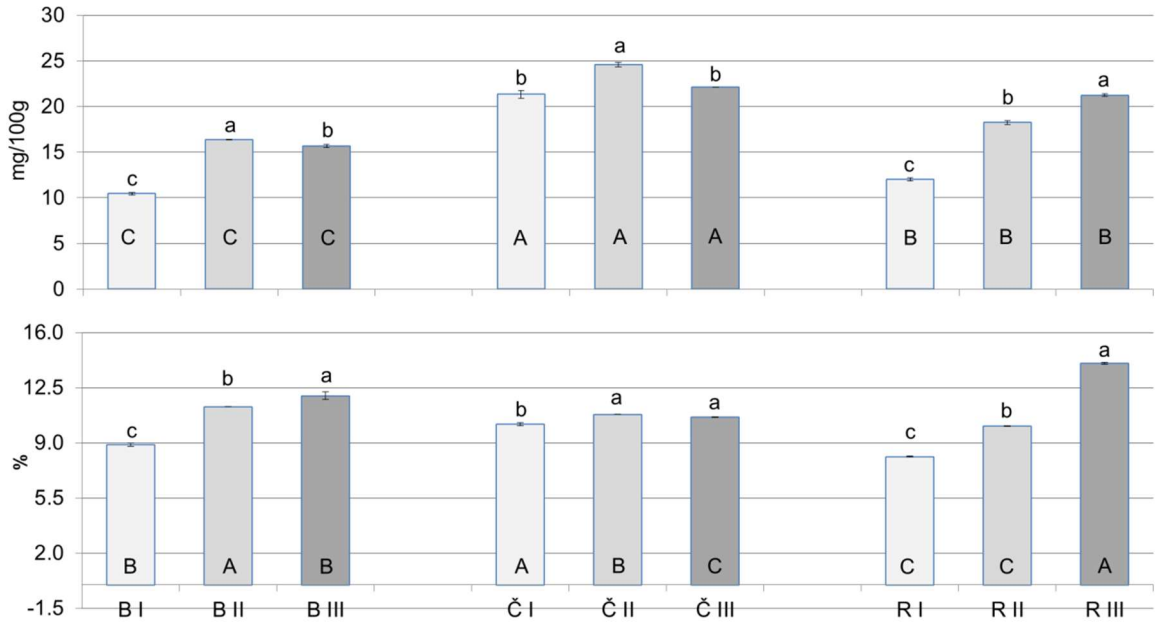
Slika 12 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **klerosterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



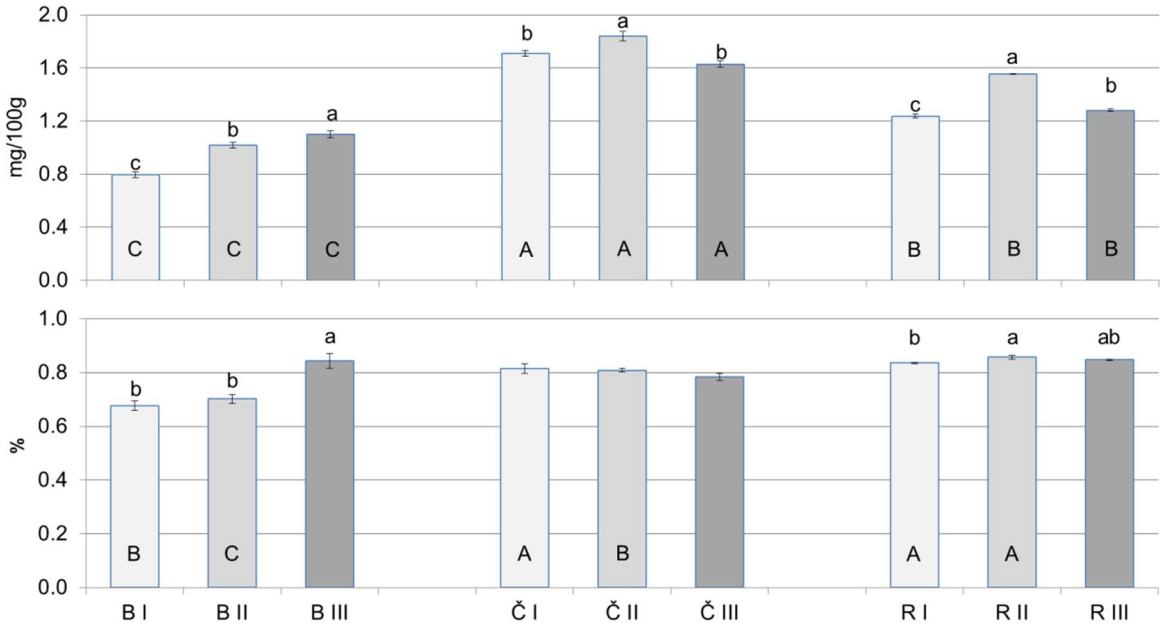
Slika 13 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **β-sitosterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



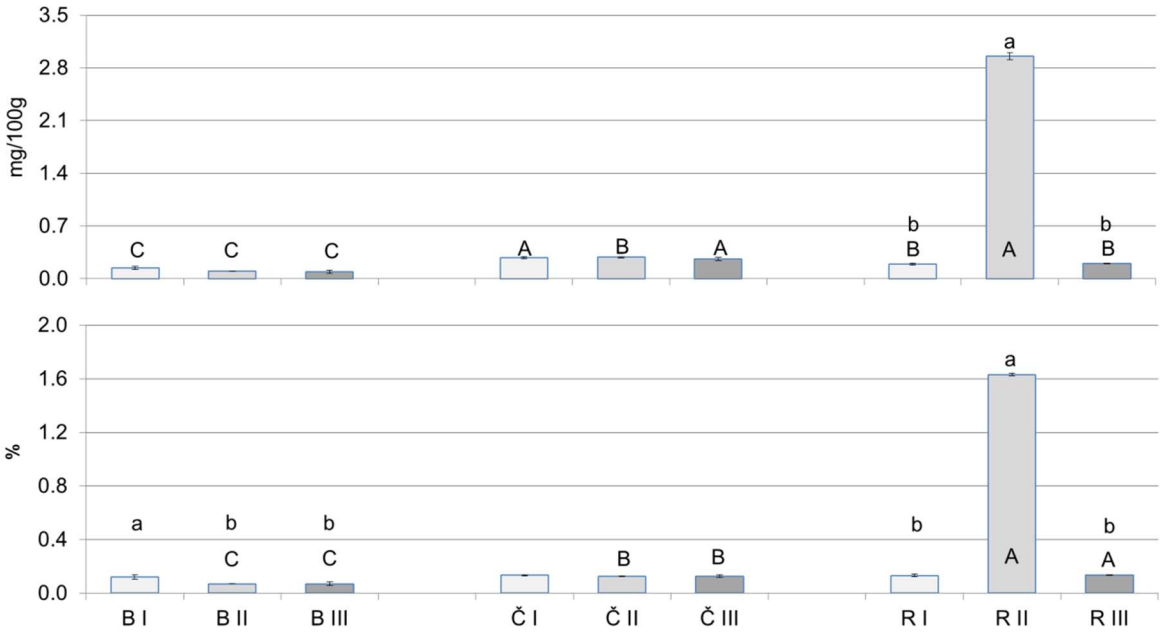
Slika 14 Koncentracije i relativni udjeli **sitostanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



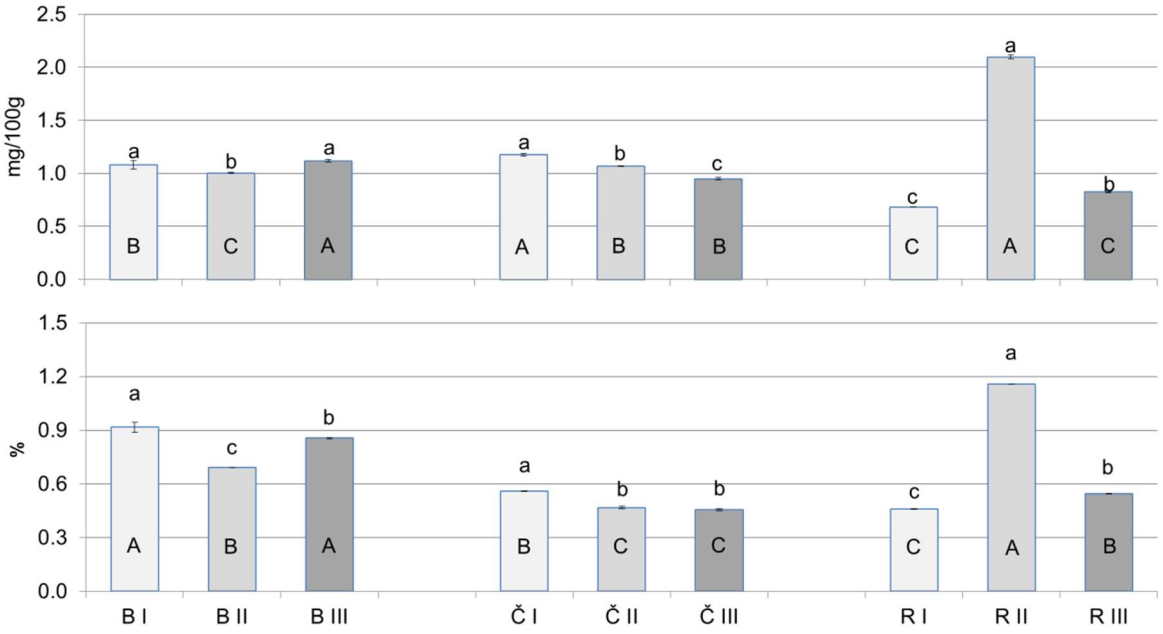
Slika 15 Koncentracije i relativni udjeli **Δ^5-avenasterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



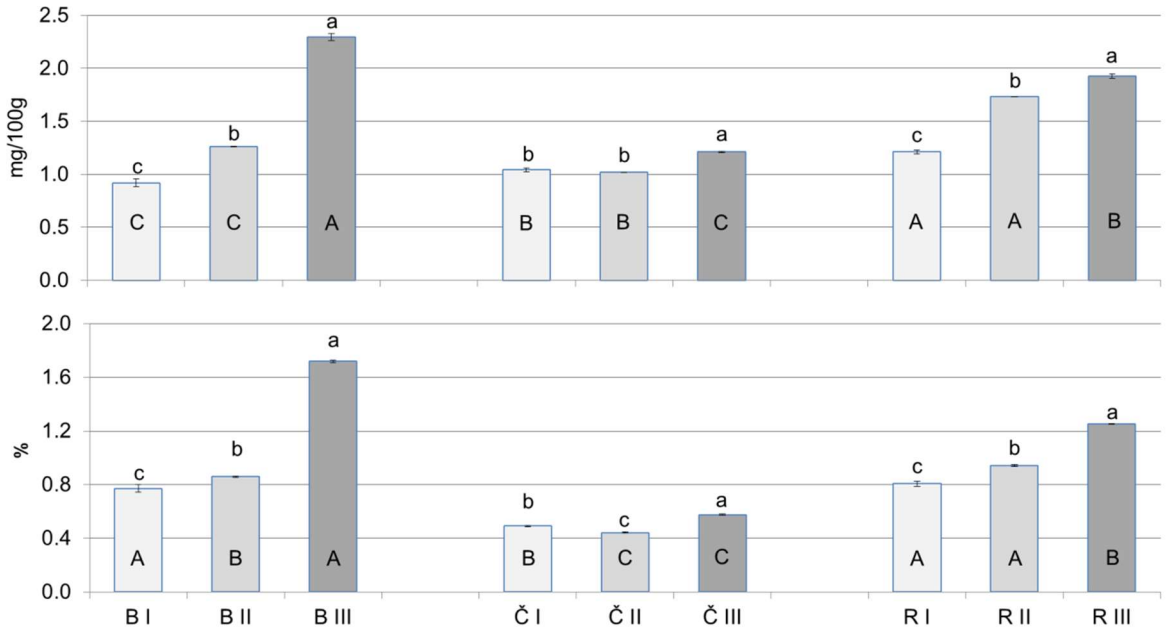
Slika 16 Koncentracije i relativni udjeli **$\Delta^{5,24}$-stigmastadienola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



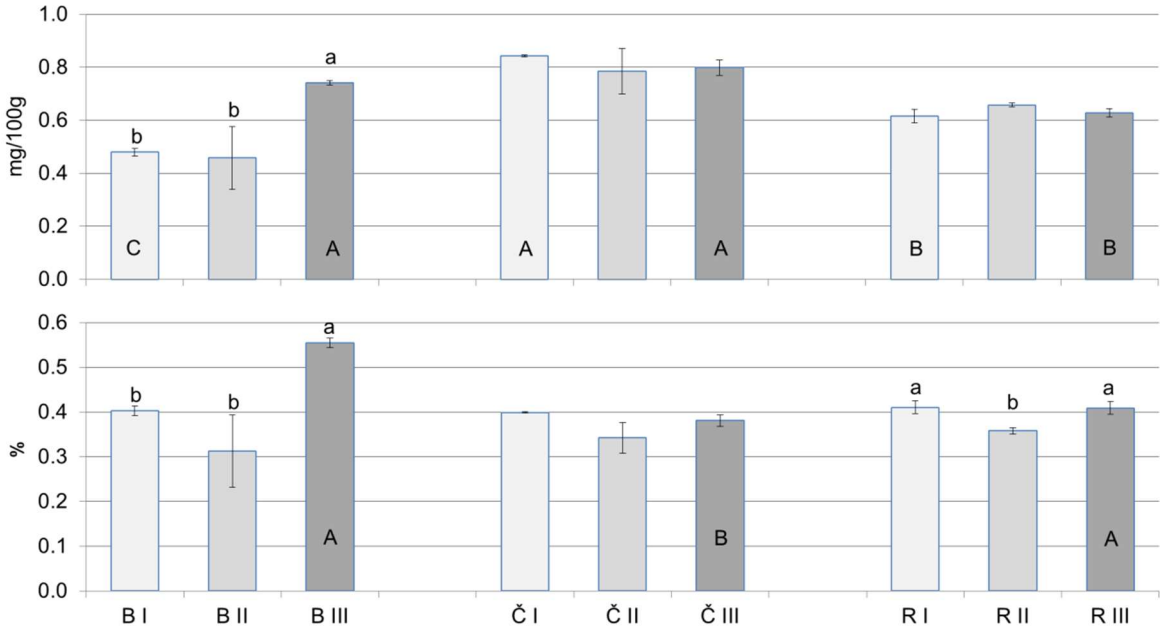
Slika 17 Koncentracije i relativni udjeli **Δ^7-stigmastenola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



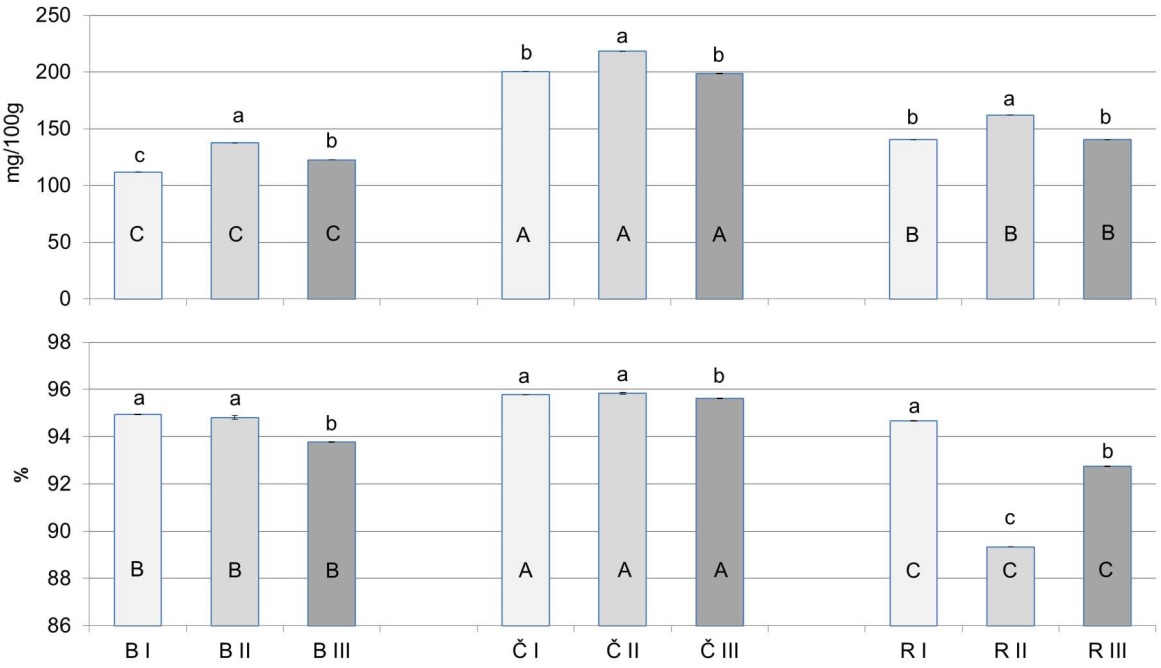
Slika 18 Koncentracije i relativni udjeli **Δ^7-avenasterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



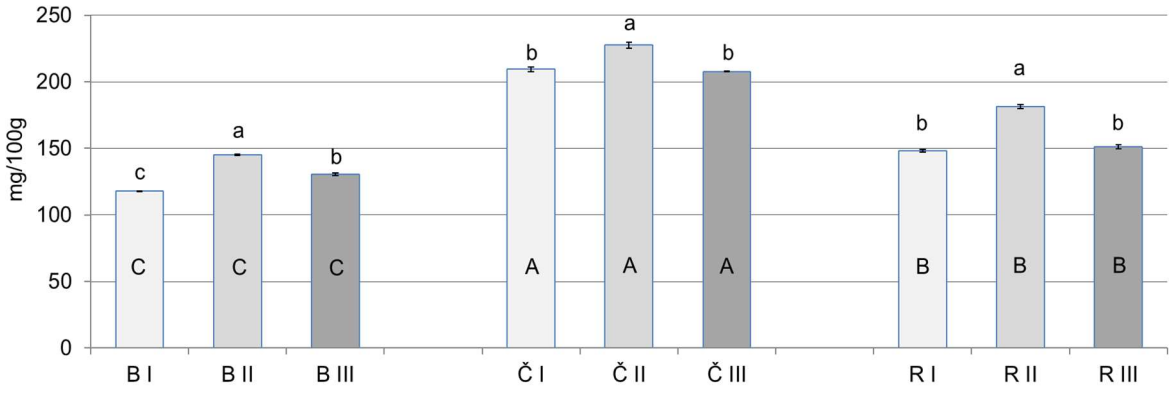
Slika 19 Koncentracije i relativni udjeli **eritrodiola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



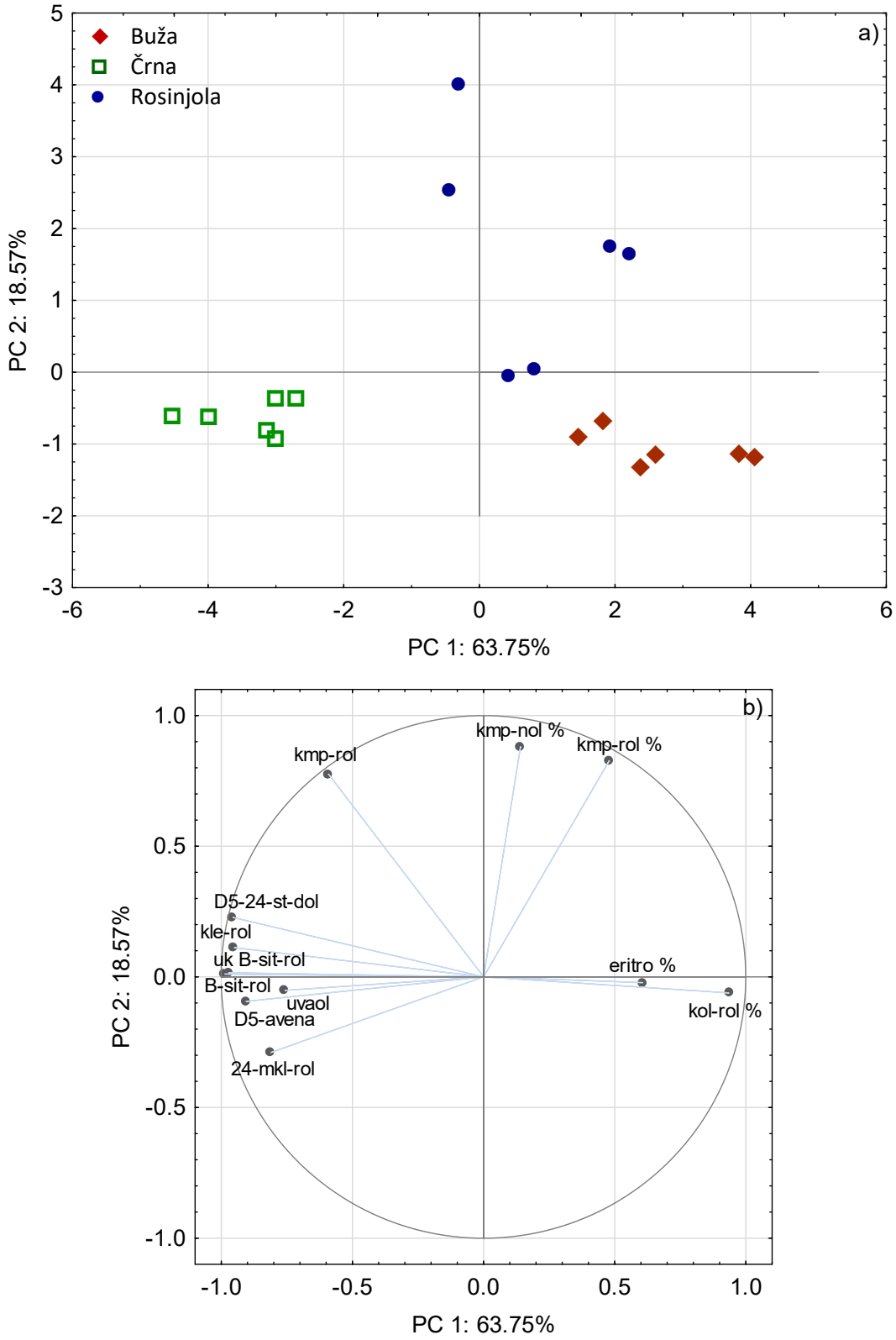
Slika 20 Koncentracije i relativni udjeli **uvaola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



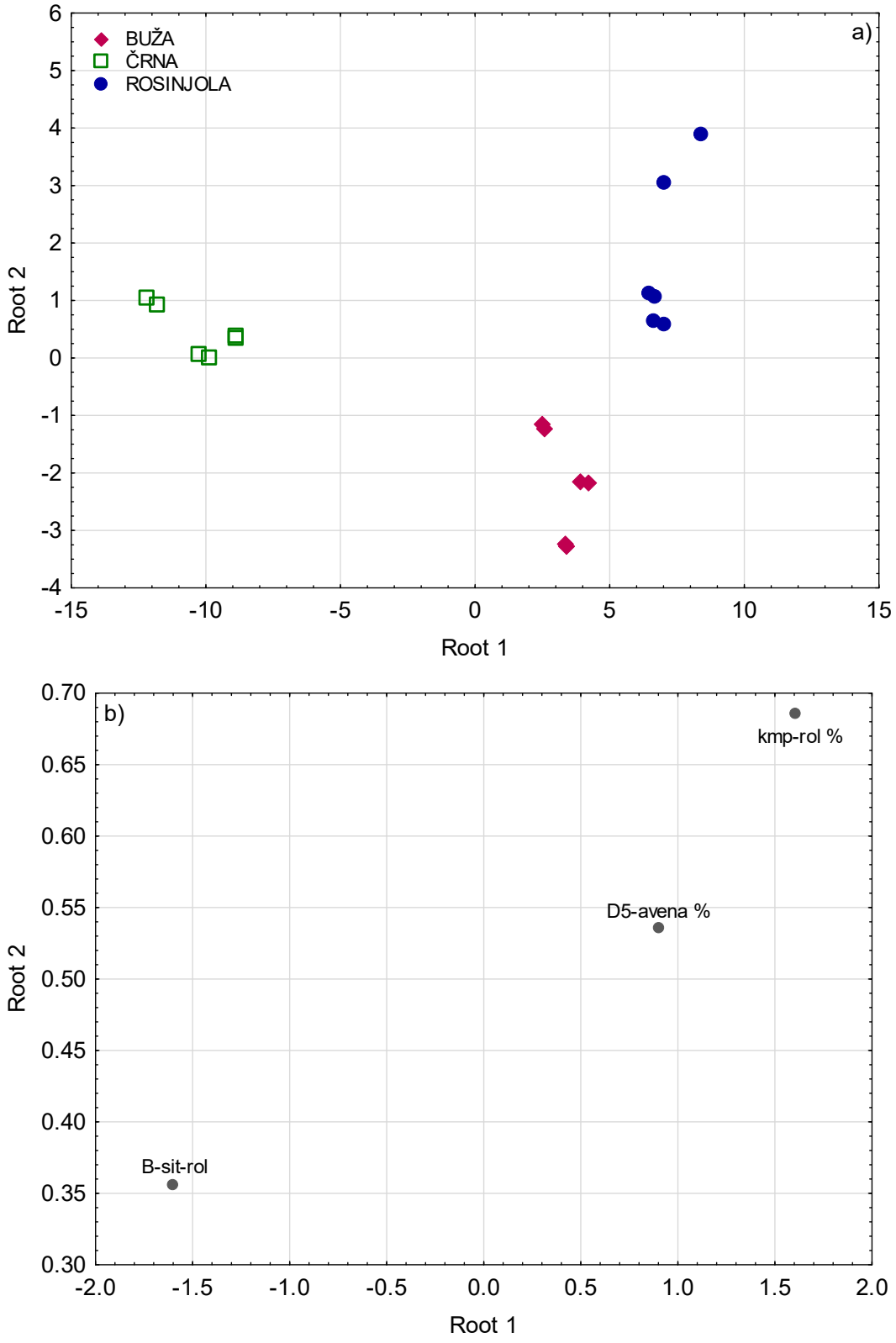
Slika 21 Koncentracije i relativni udjeli **ukupnog β-sitosterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



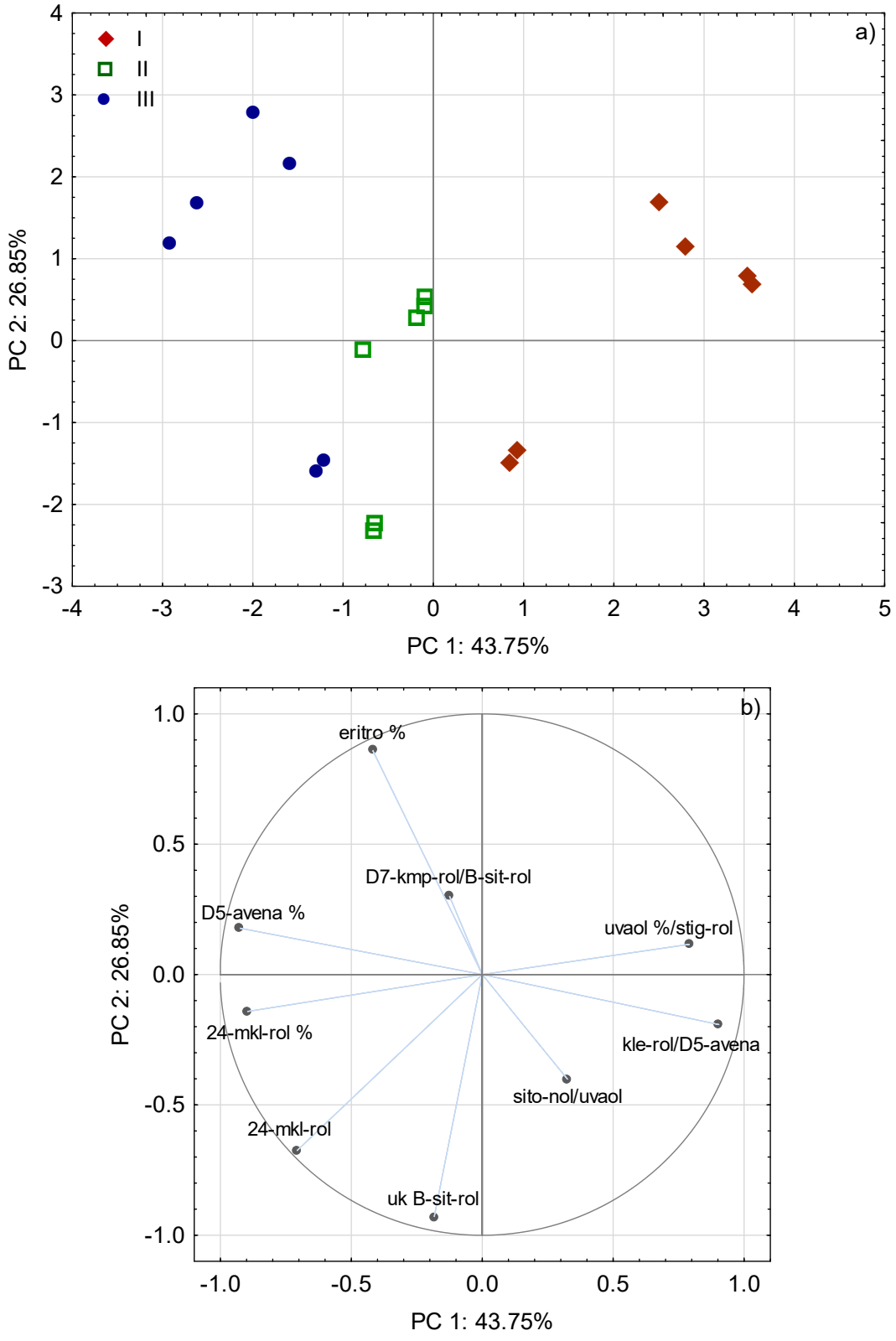
Slika 22 Koncentracije **ukupnih sterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



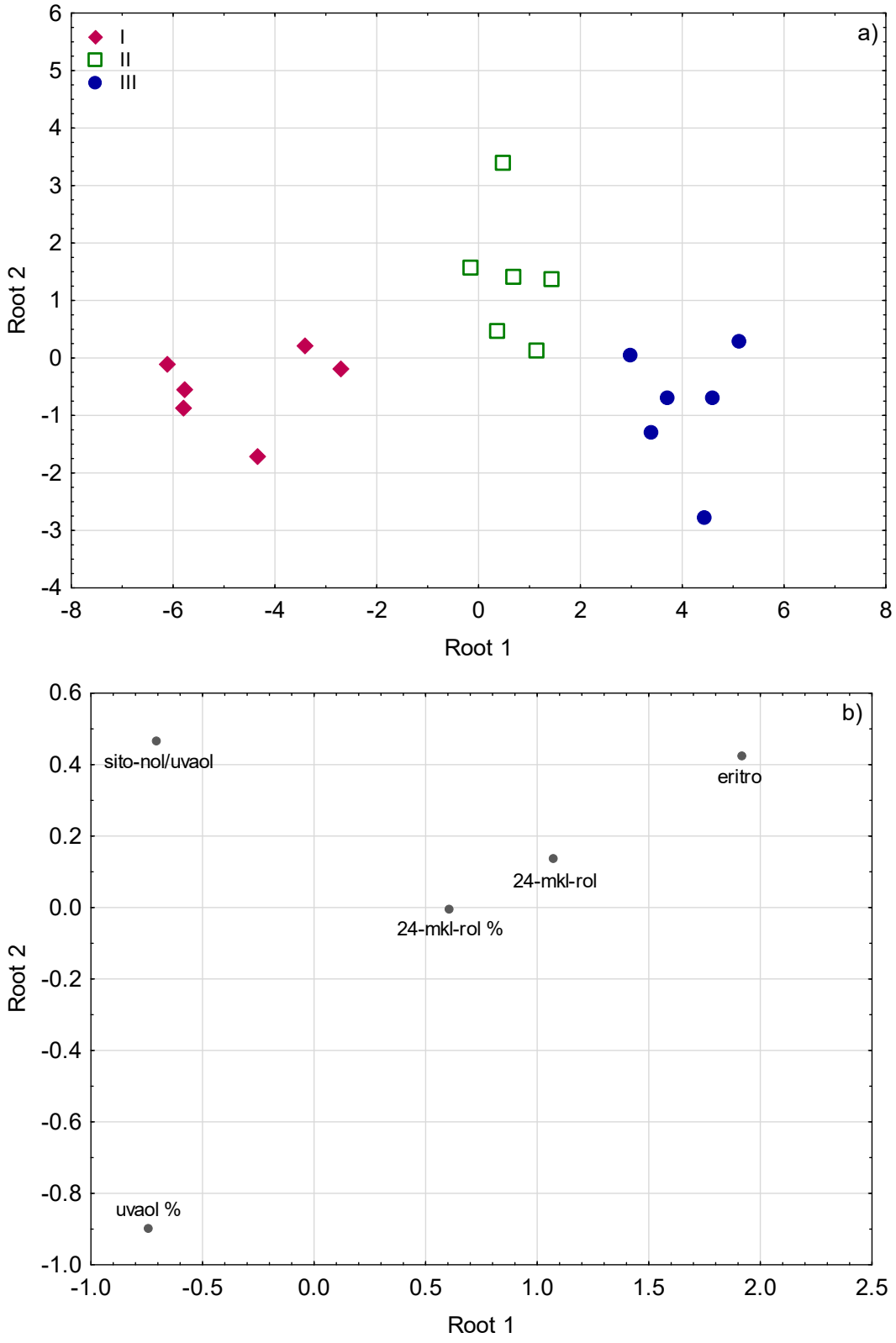
Slika 23 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nenadzirano, PCA) svježih maslinovih ulja dobivenih od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 24 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nadzirano, LDA) svježih maslinovih ulja dobivenih od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2

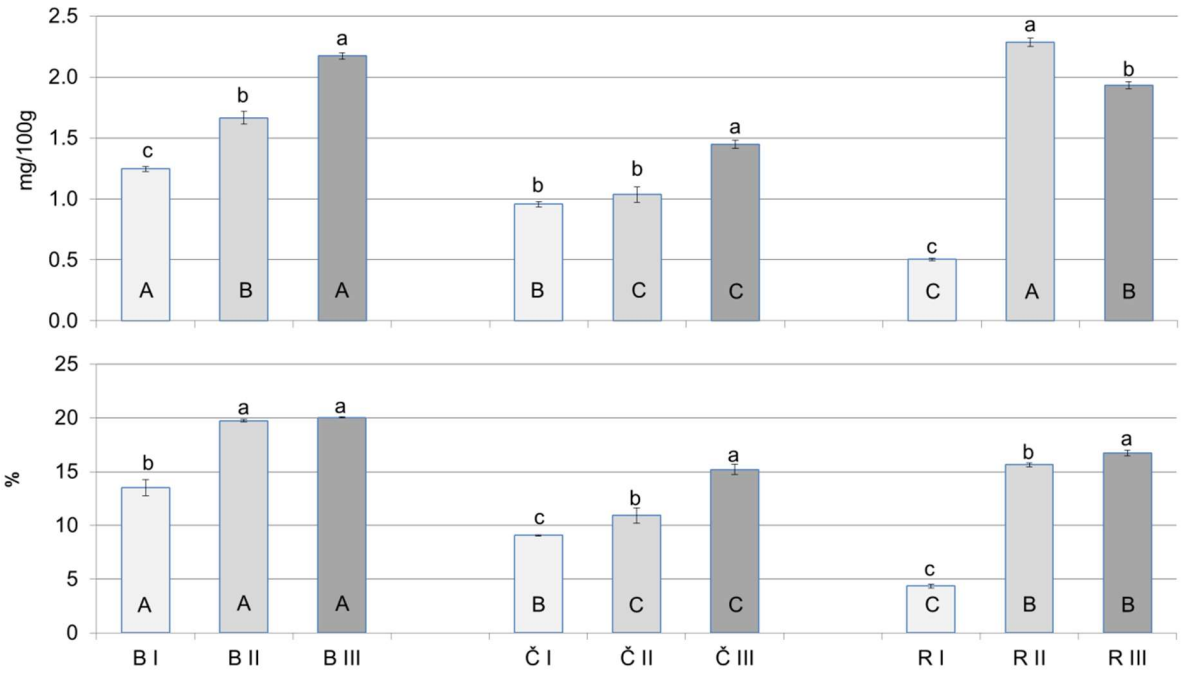


Slika 25 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nenadzirano, PCA) svježih maslinovih ulja sorti Buža, Črna i Rosinjola u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2

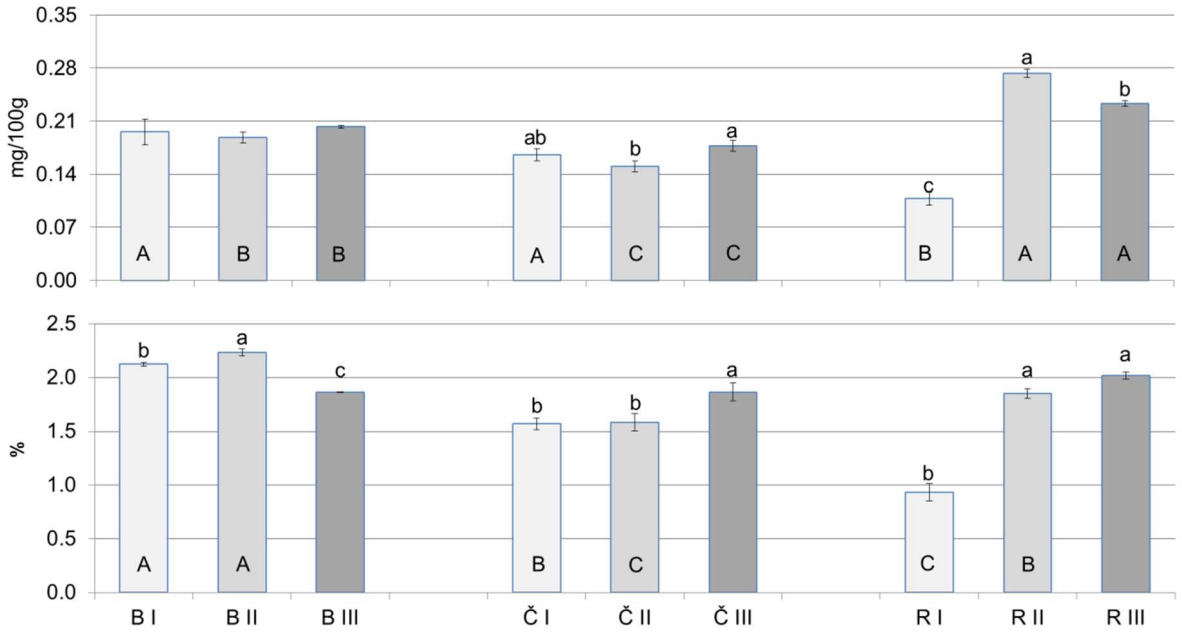


Slika 26 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nadzirano, LDA) svježih maslinovih ulja sorti Buža, Črna i Rosinjola u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2

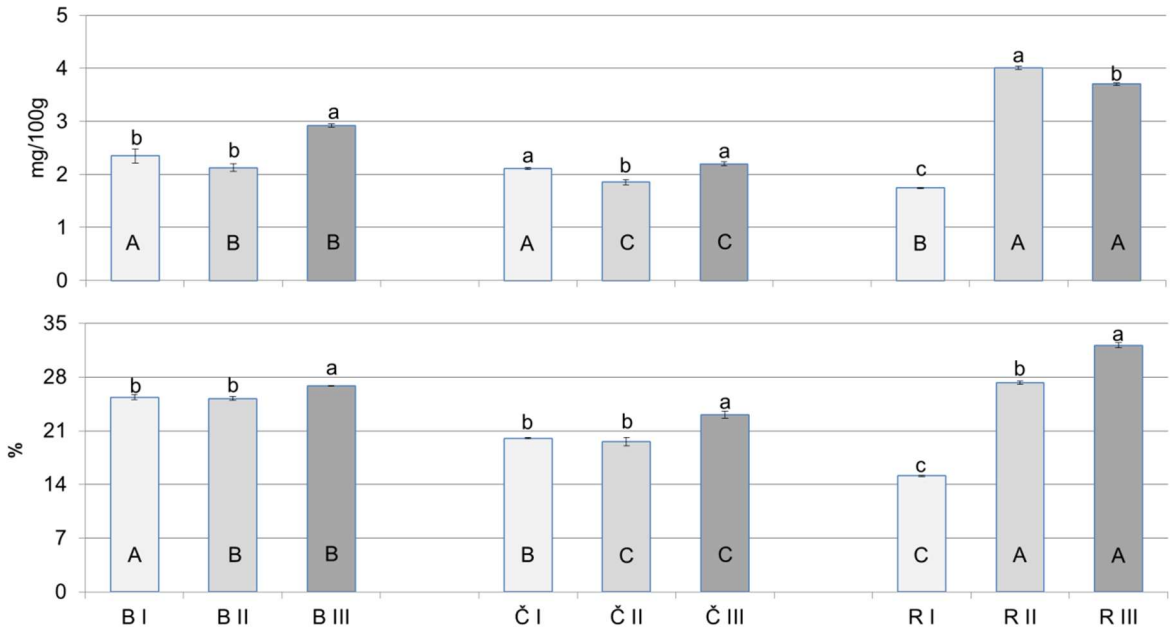
4.2. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA ALIFATSKE ALKOHOLE U SVJEŽIM ULJIMA



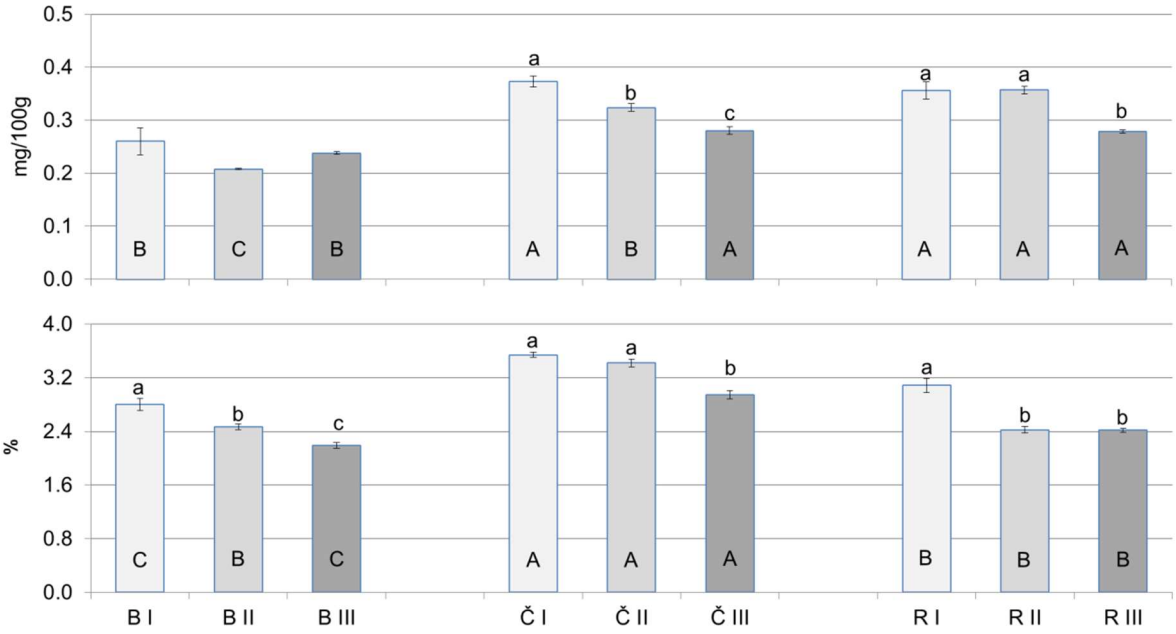
Slika 27 Koncentracije i relativni udjeli **dokozanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



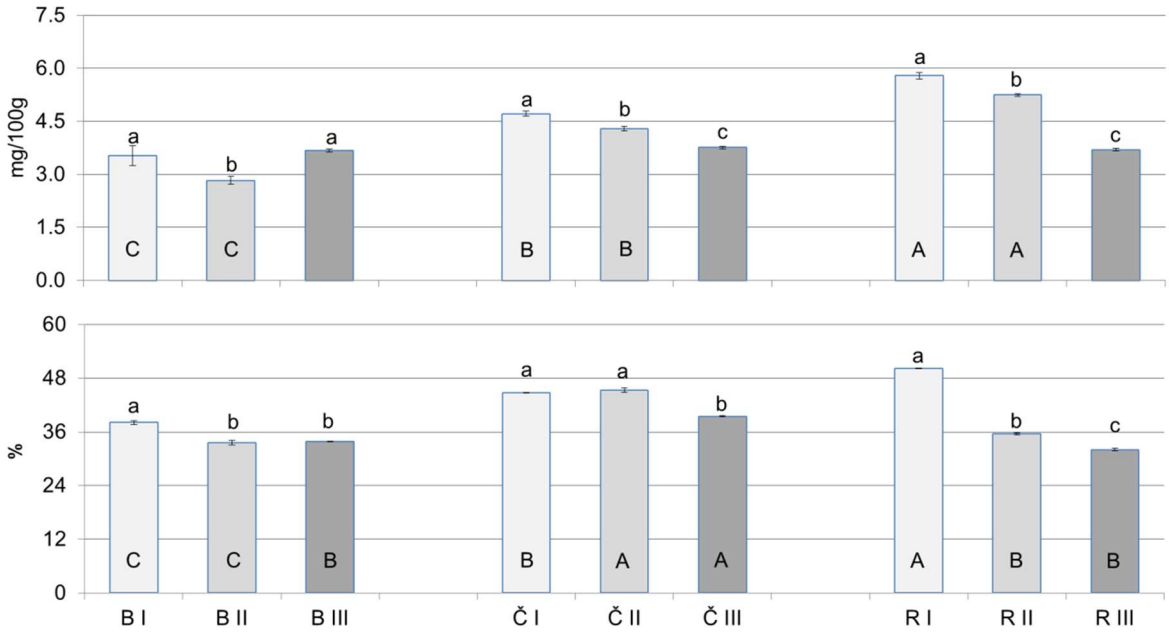
Slika 28 Koncentracije i relativni udjeli **trikozanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



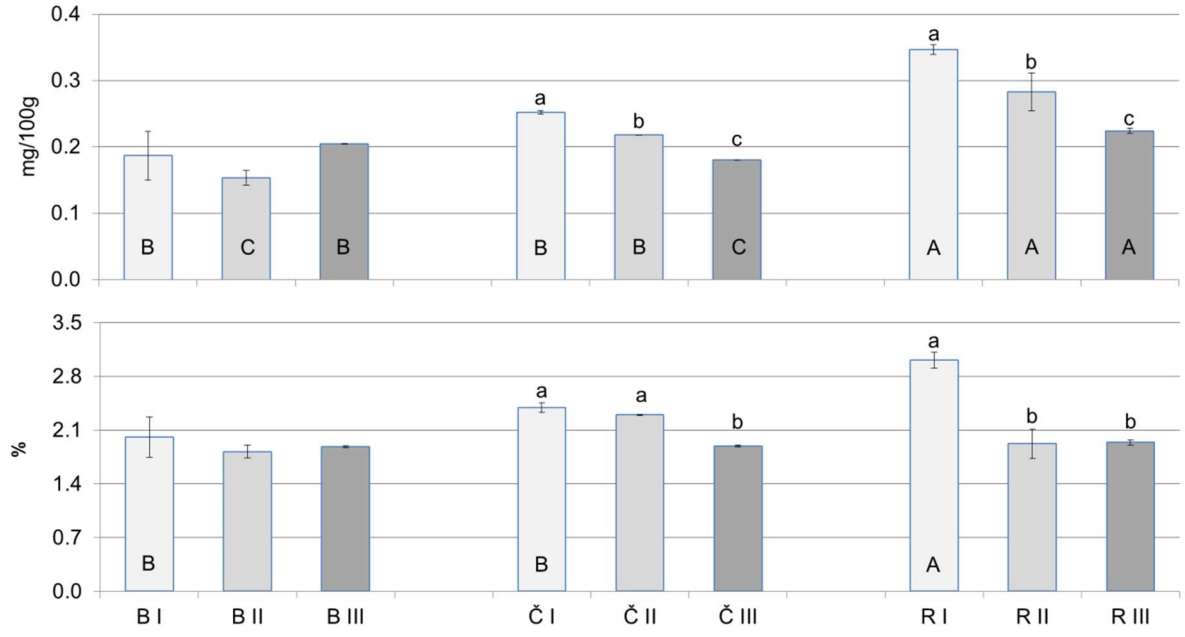
Slika 29 Koncentracije i relativni udjeli **tetrakozanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



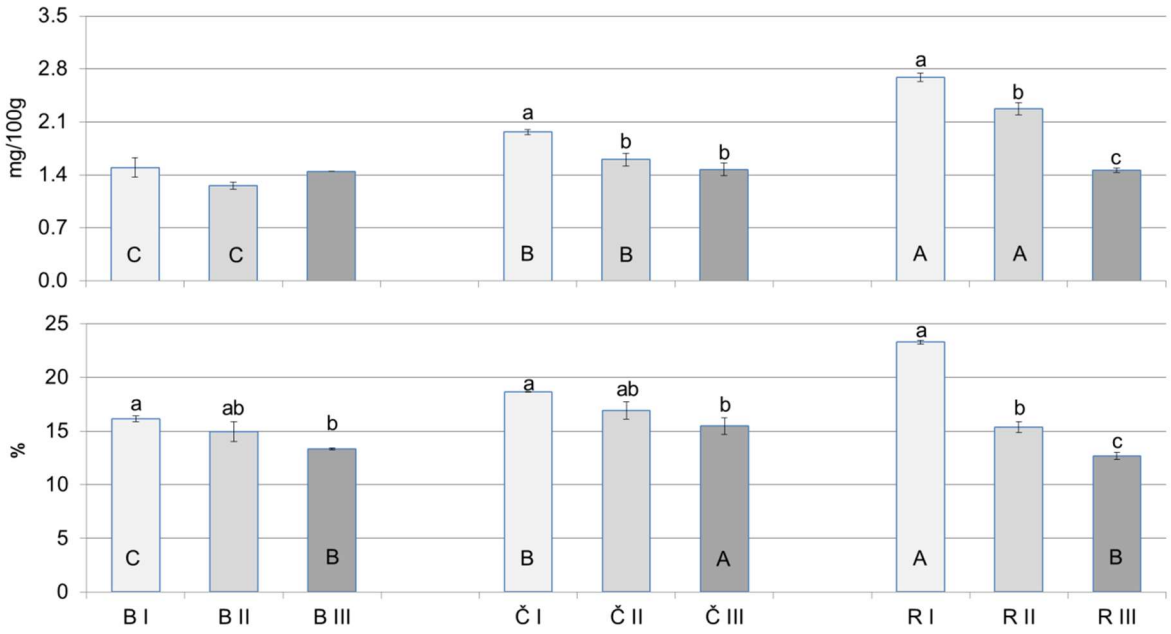
Slika 30 Koncentracije i relativni udjeli **pentakozanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



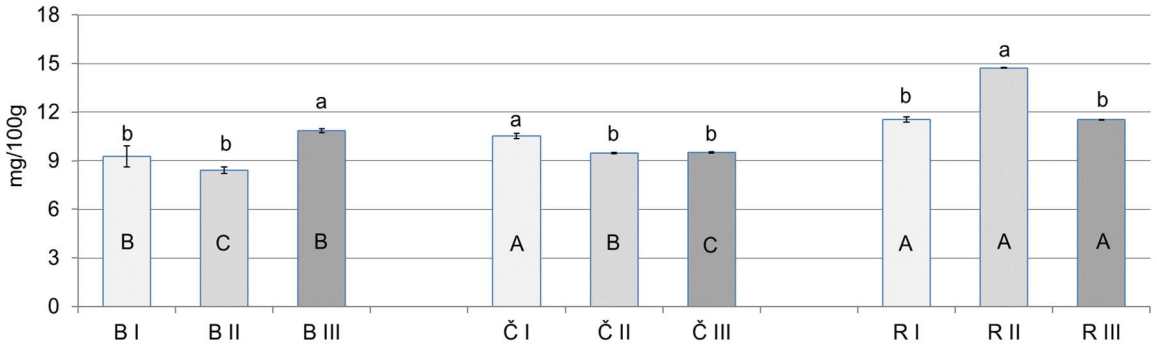
Slika 31 Koncentracije i relativni udjeli **heksakozanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



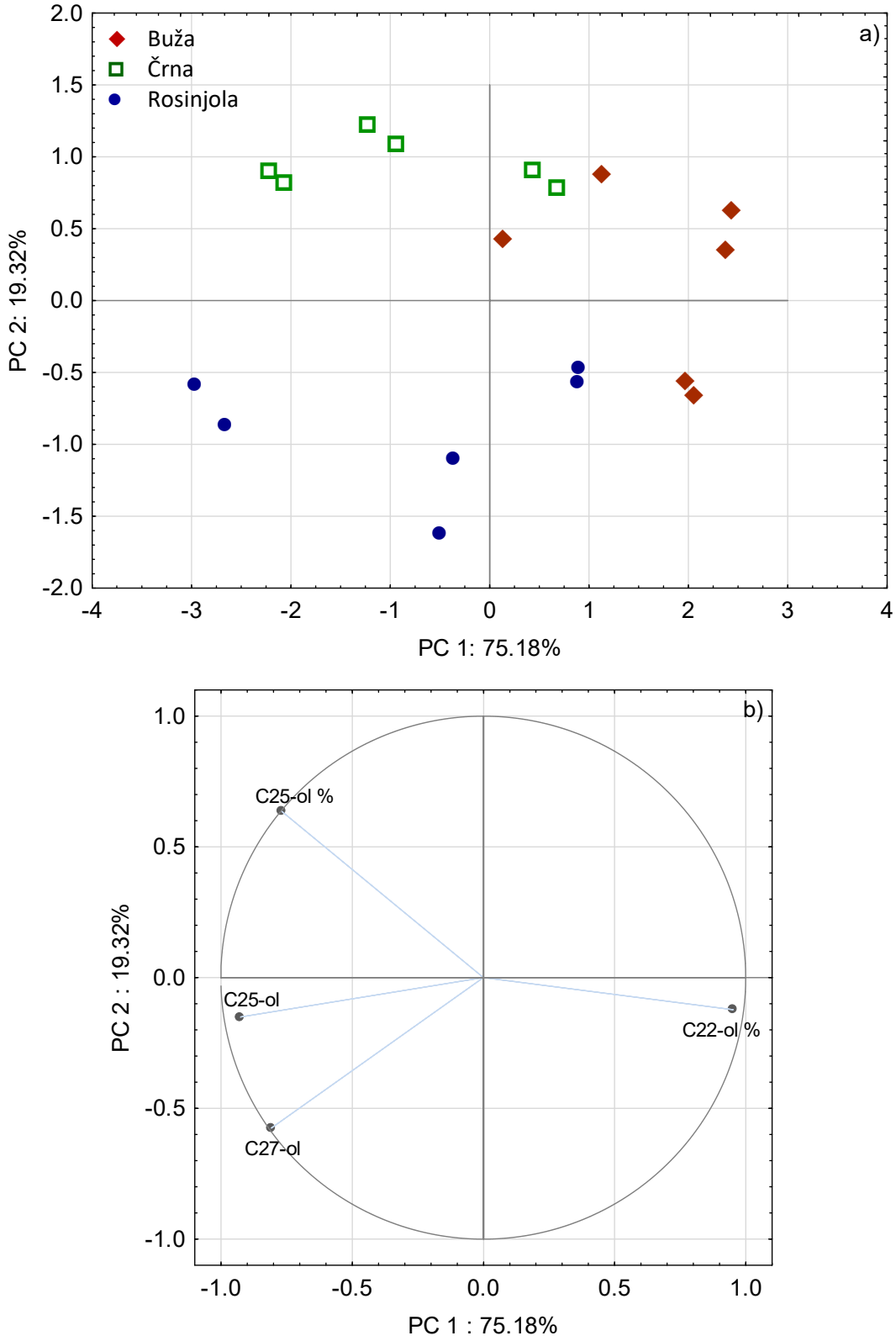
Slika 32 Koncentracije i relativni udjeli **heptakozanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



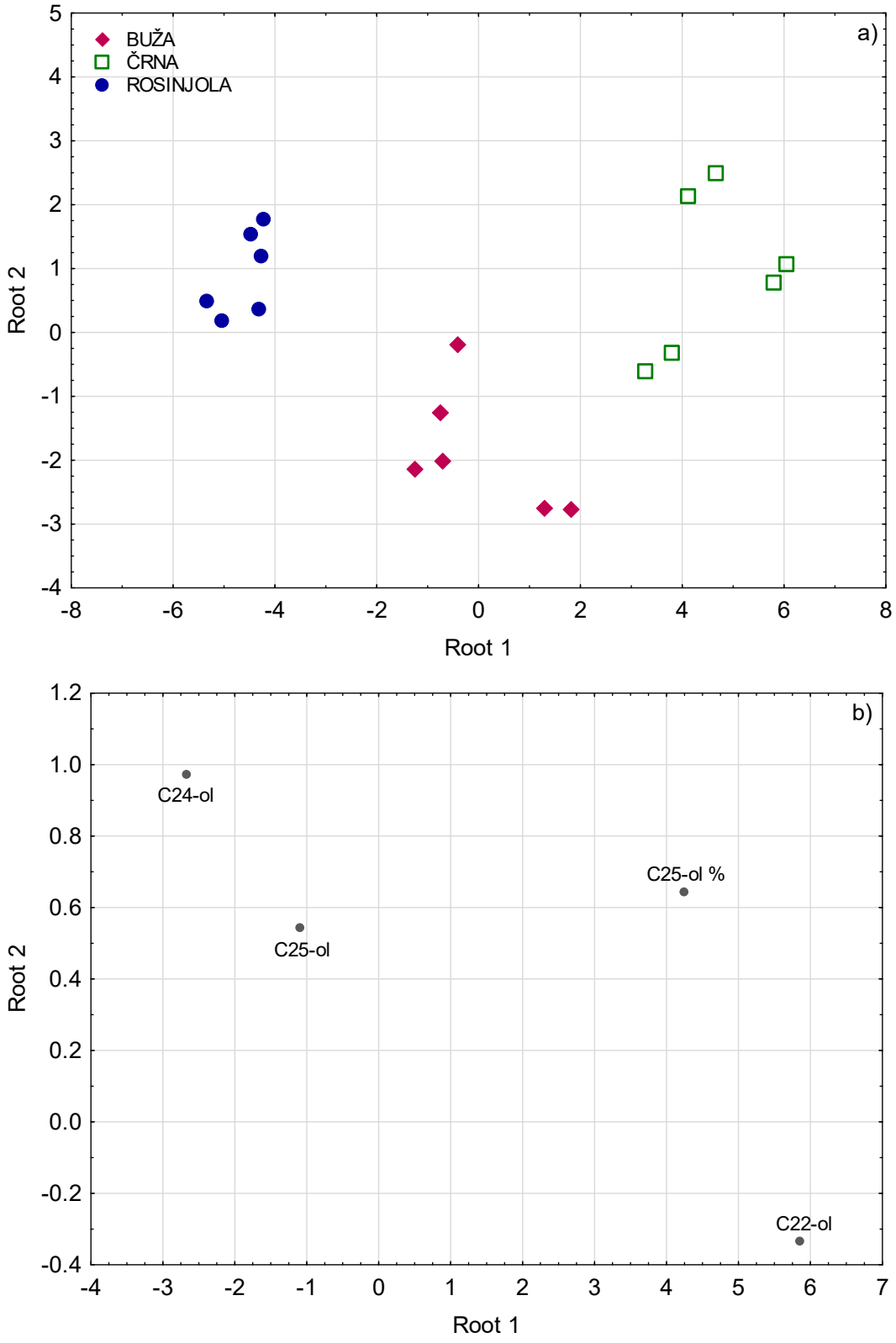
Slika 33 Koncentracije i relativni udjeli **oktakozanola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



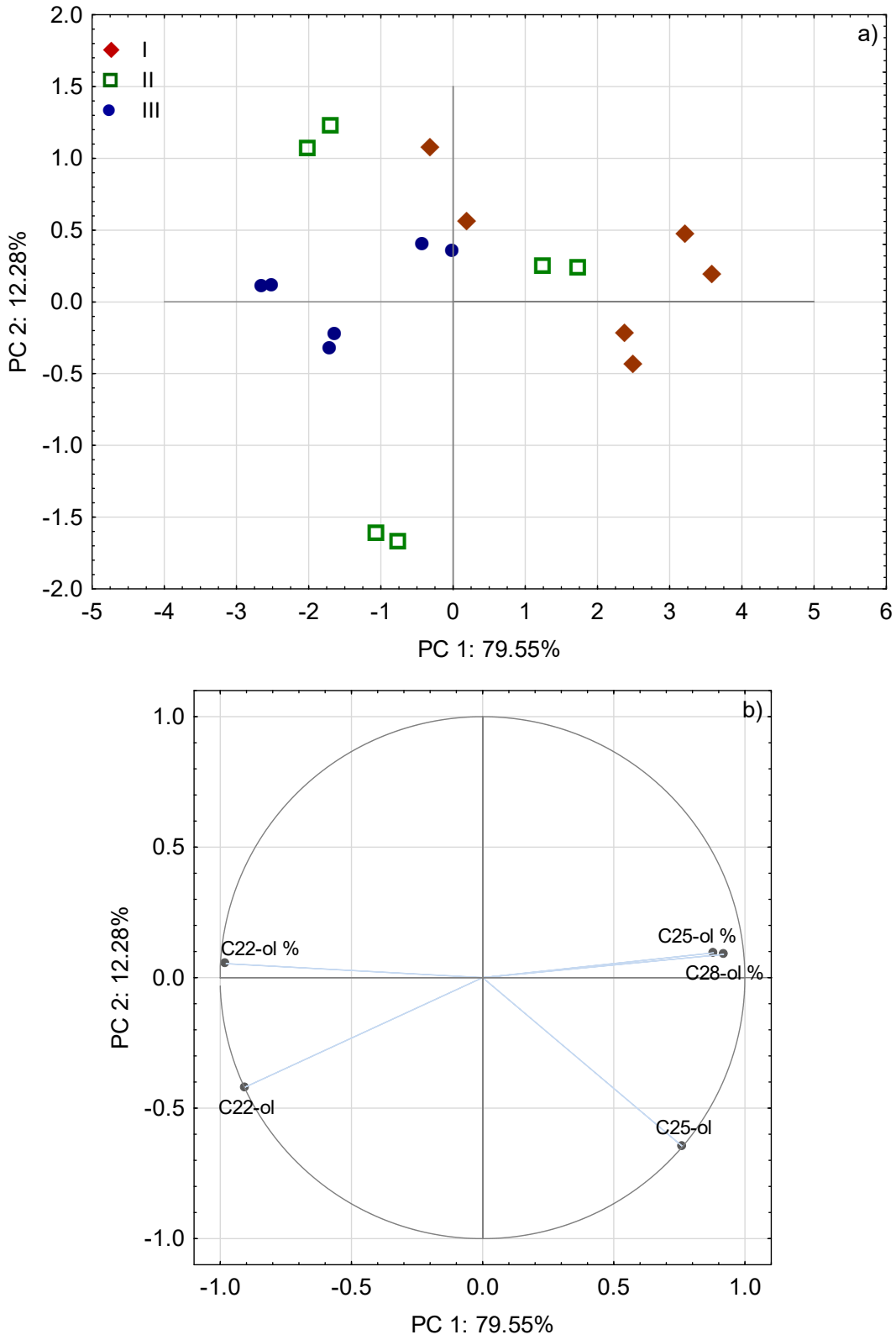
Slika 34 Prosječne koncentracije (n=2) **ukupnih alifatskih alkohola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



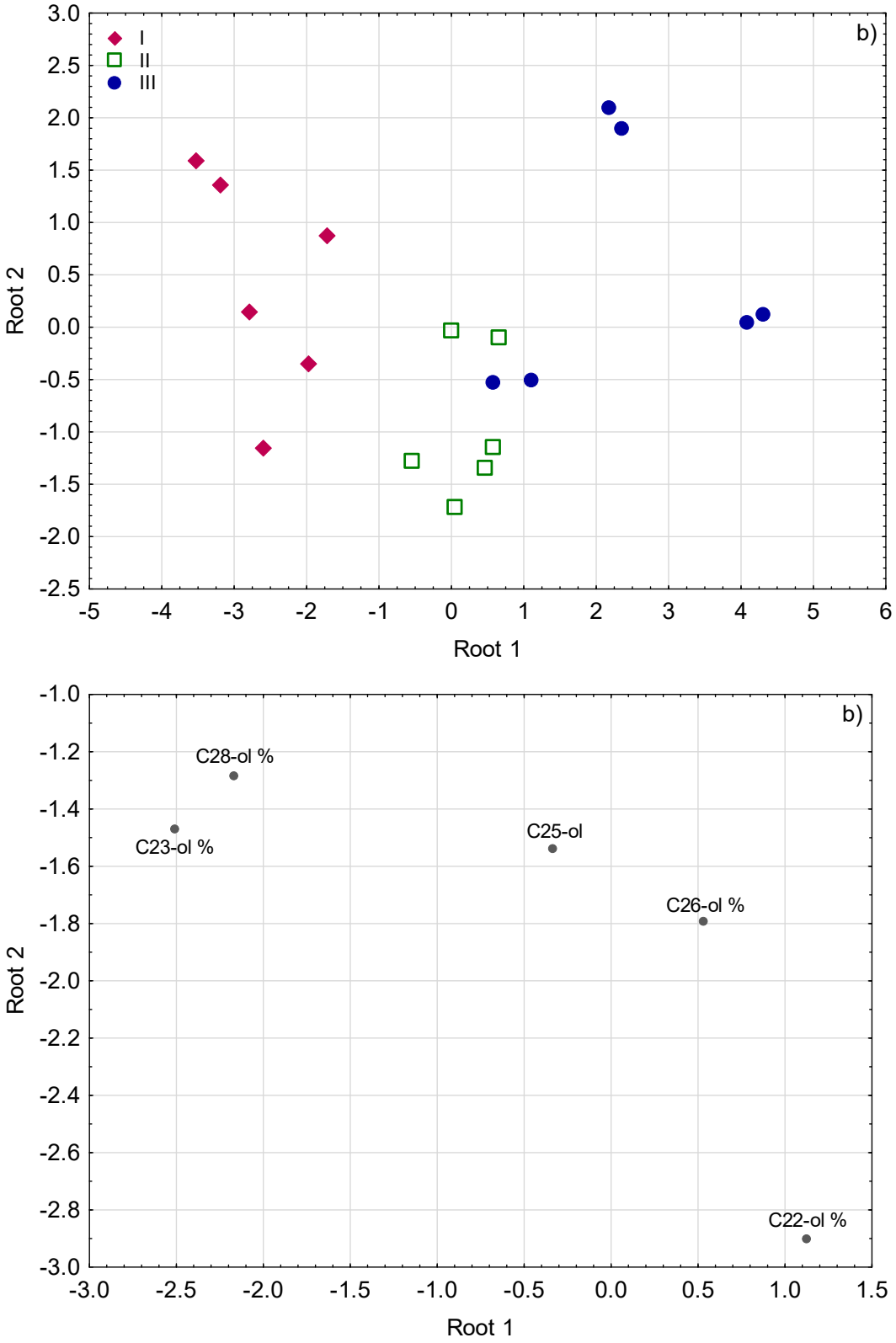
Slika 35 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nenadzirano, PCA) svježih maslinovih ulja dobivenih od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 36 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nadzirano, LDA) svježih maslinovih ulja dobivenih od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2

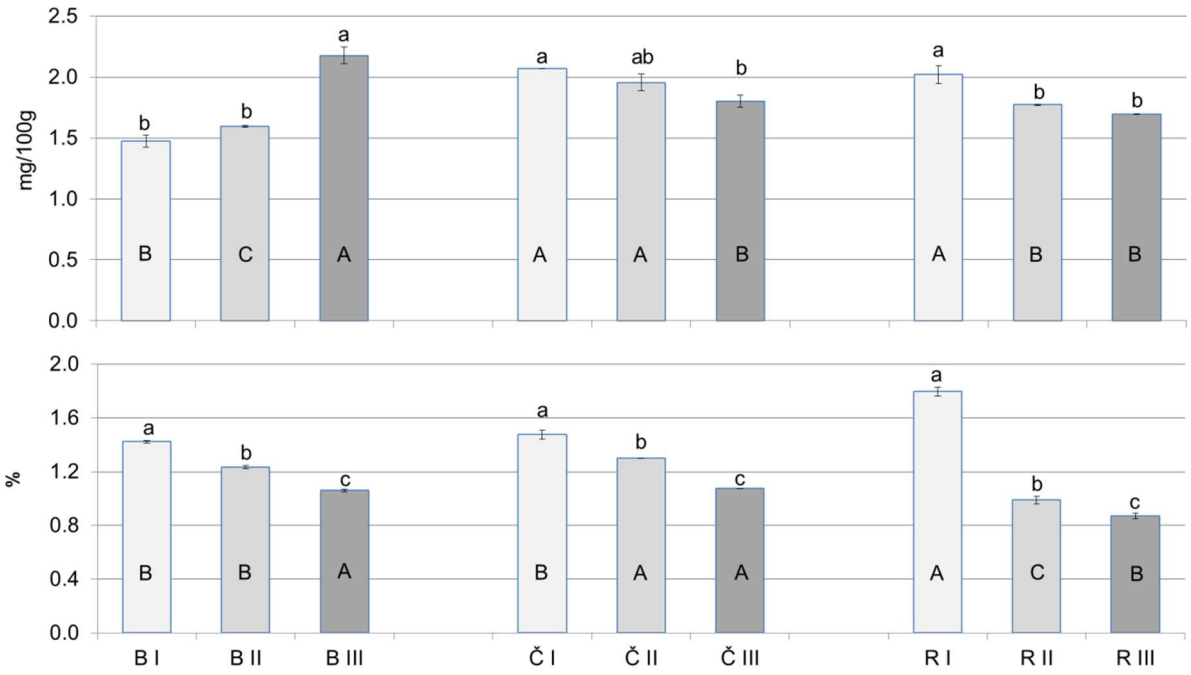


Slika 37 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nenadzirano, PCA) svježih maslinovih ulja sorti Buža, Črna i Rosinjola u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2

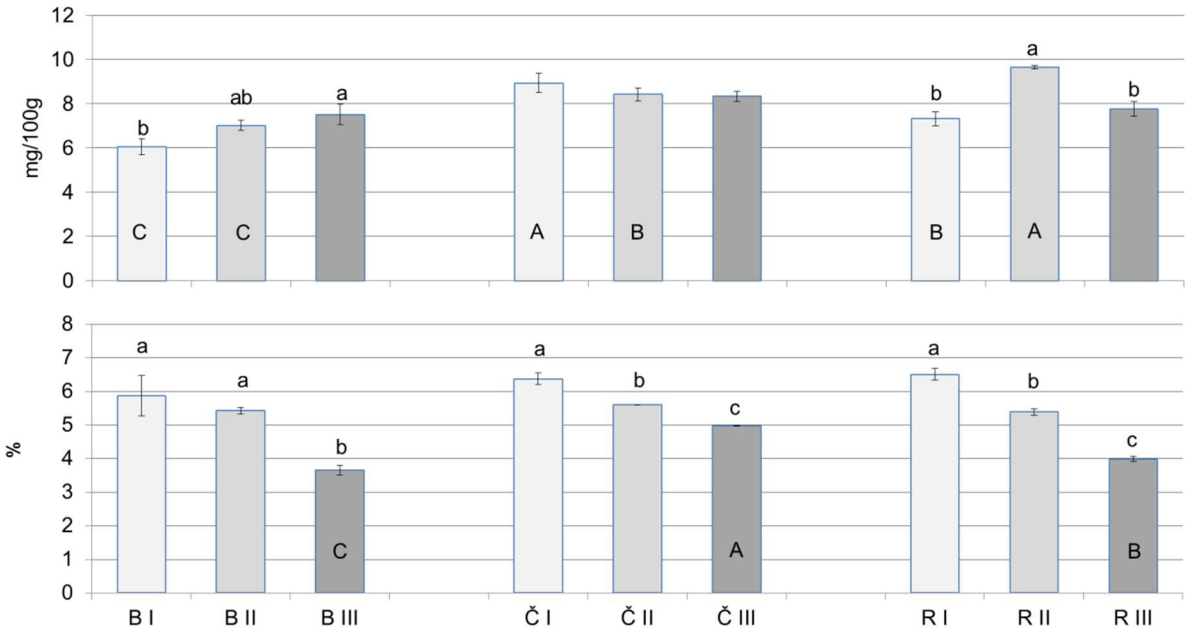


Slika 38 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nadzirano, LDA) svježih maslinovih ulja sorti Buža, Črna i Rosinjola u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2

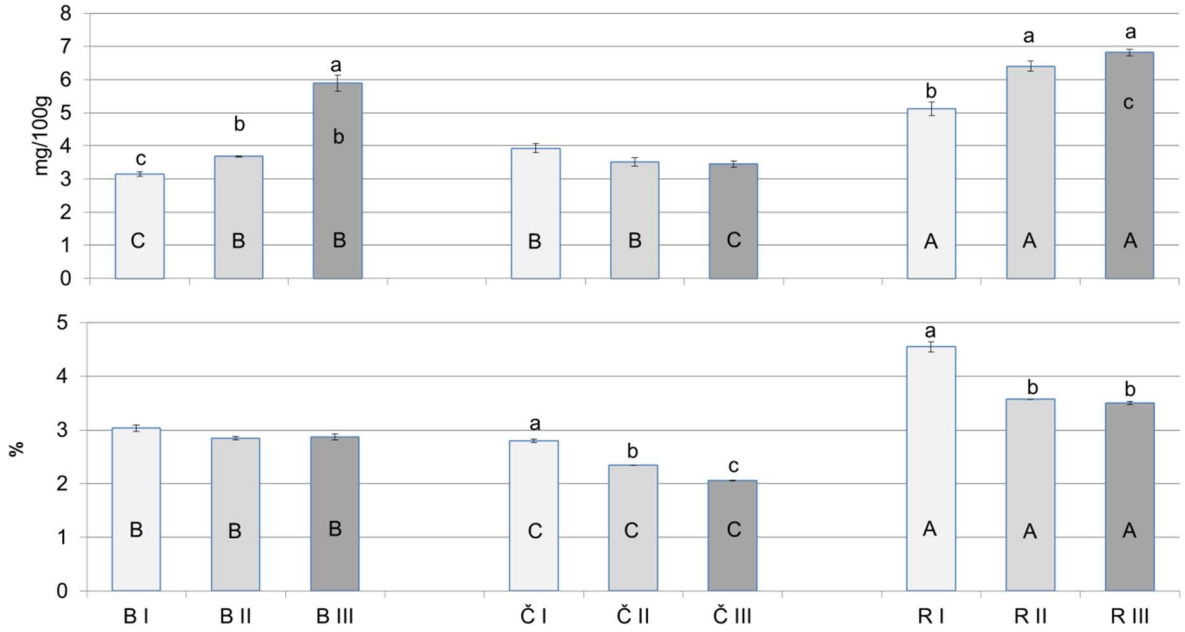
4.3. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA TRITERPENSKE ALKOHOLE U SVJEŽIM ULJIMA



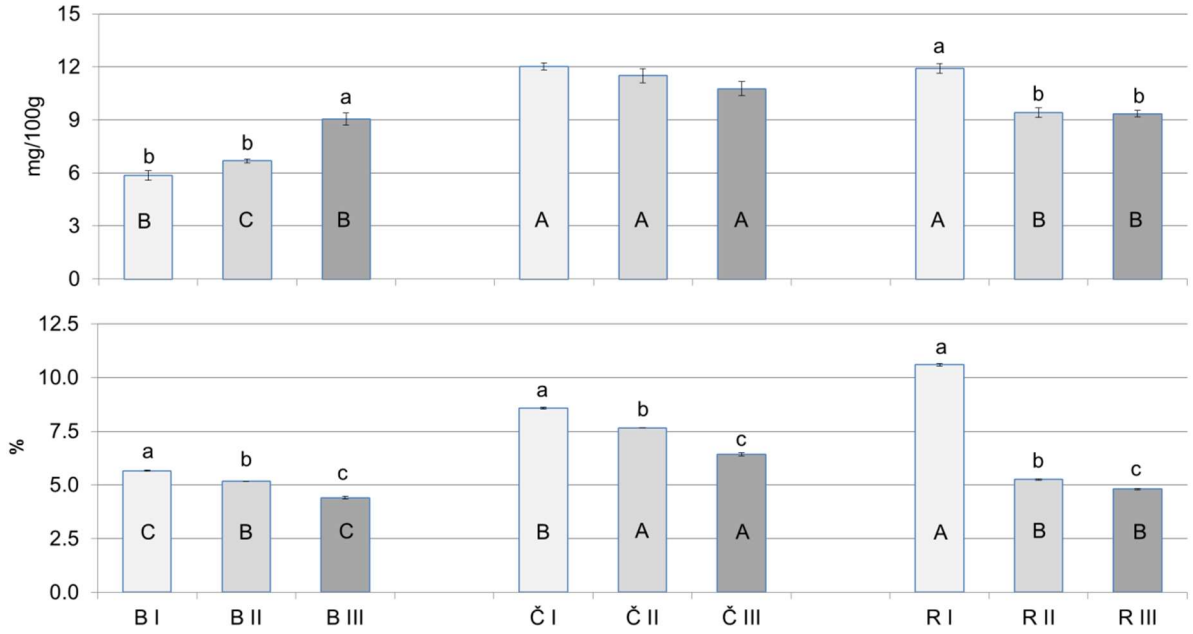
Slika 39 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **δ-amirina** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



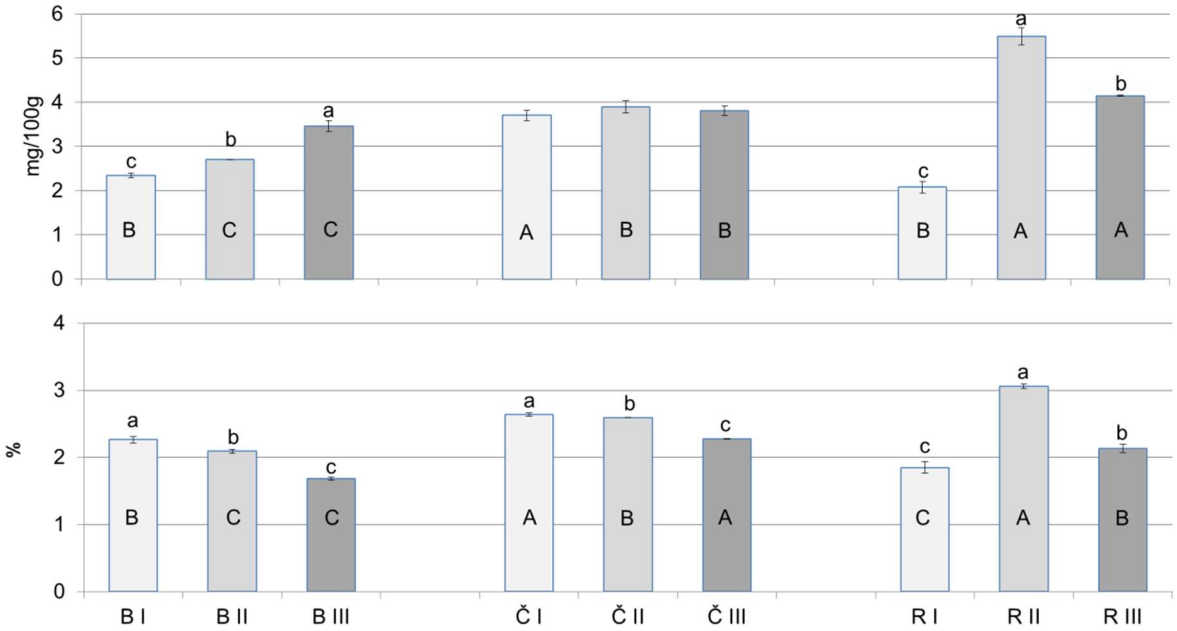
Slika 40 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **obtusifoliola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



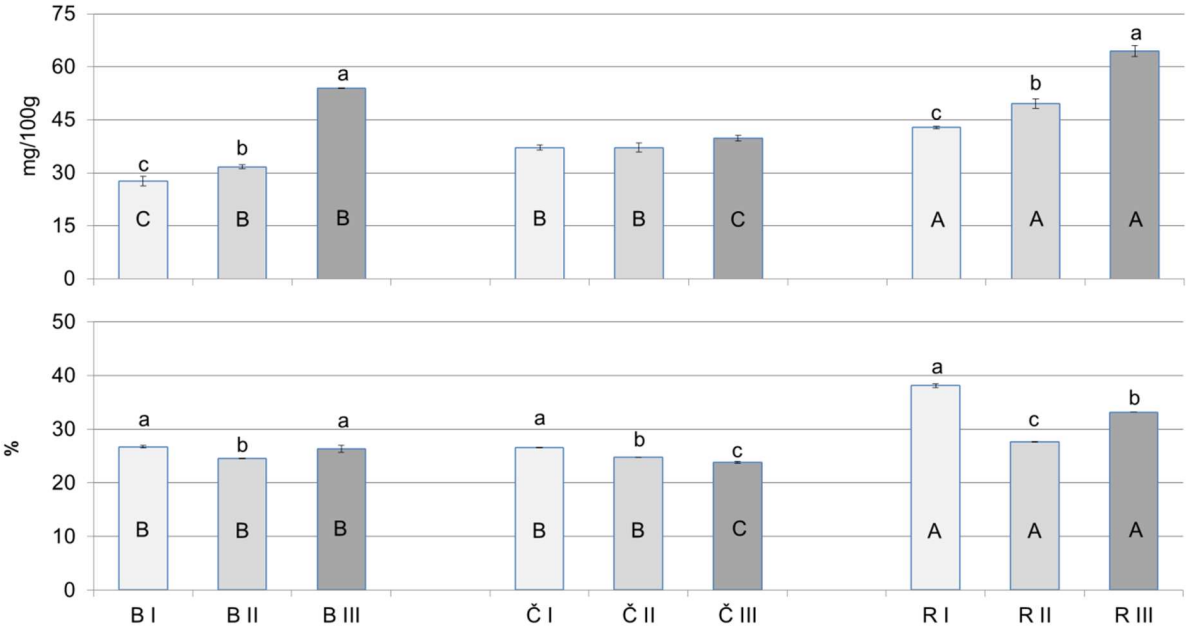
Slika 41 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **β-amirina** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



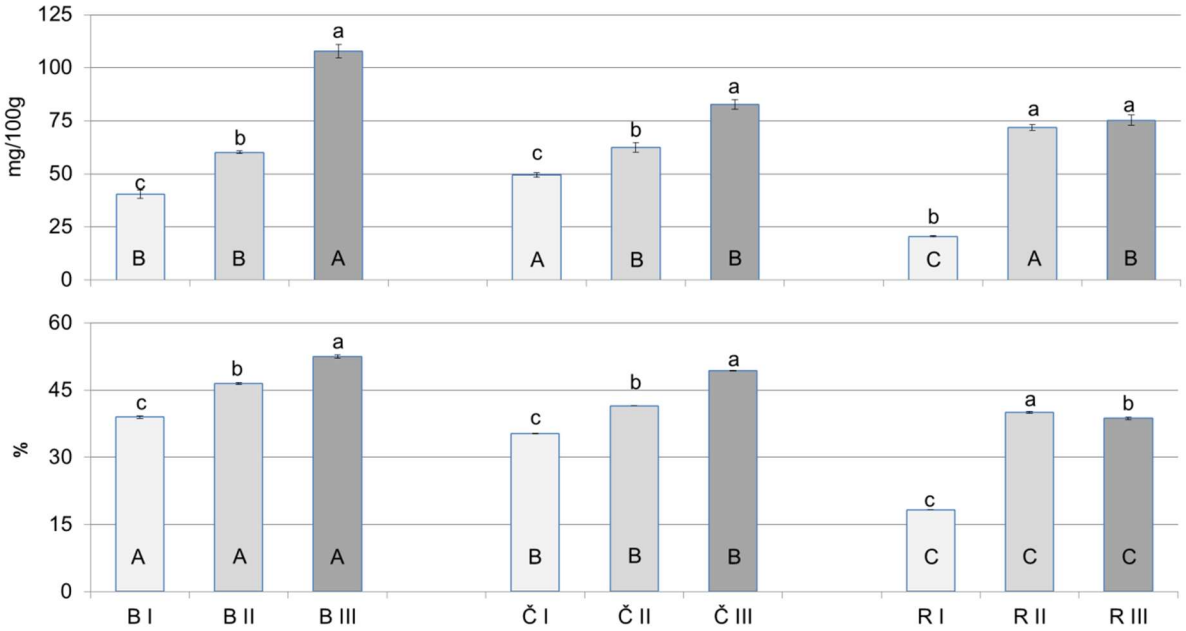
Slika 42 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **butirospermola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



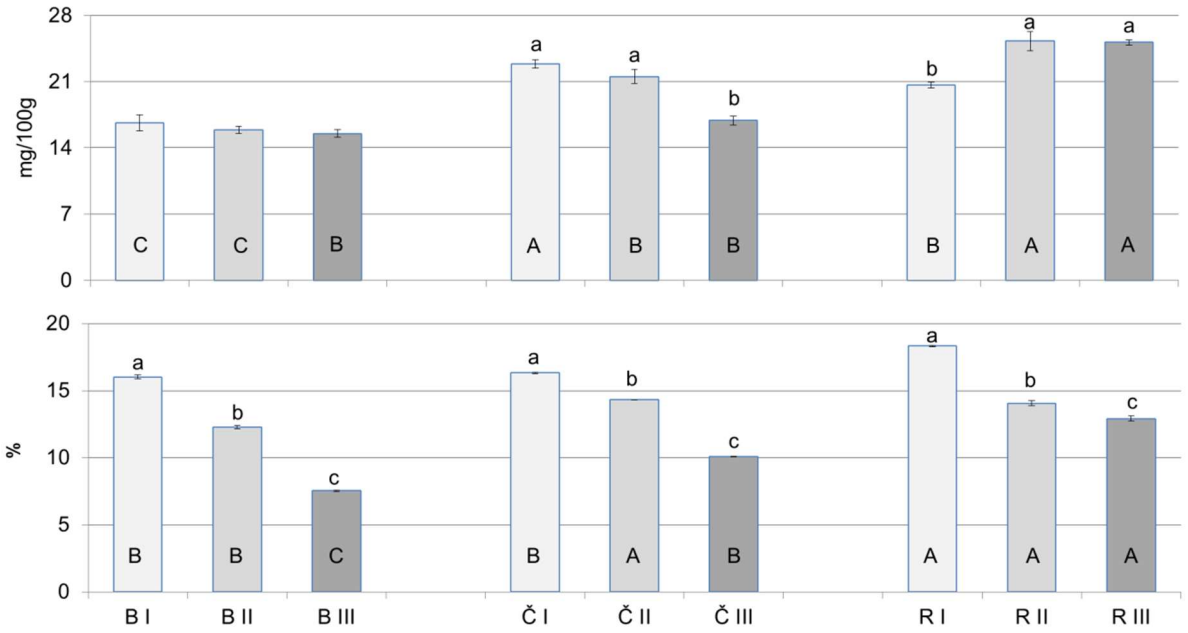
Slika 43 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **sume gramisterol + cikloeukalenol** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



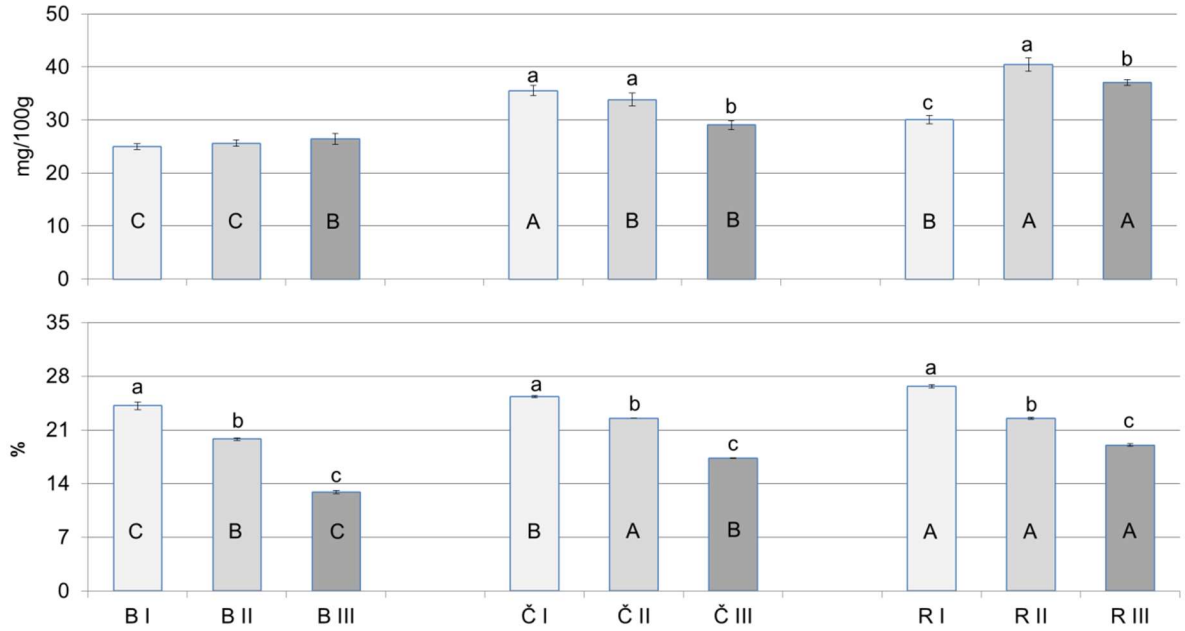
Slika 44 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **cikloartenola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



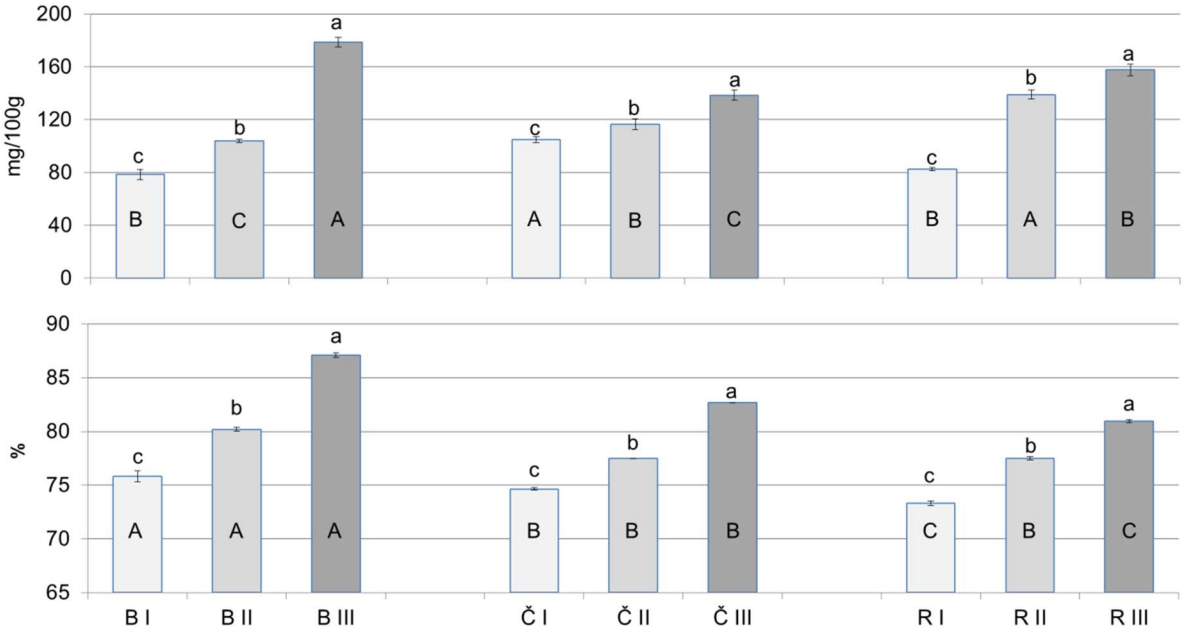
Slika 45 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **24-metilencikloartenola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



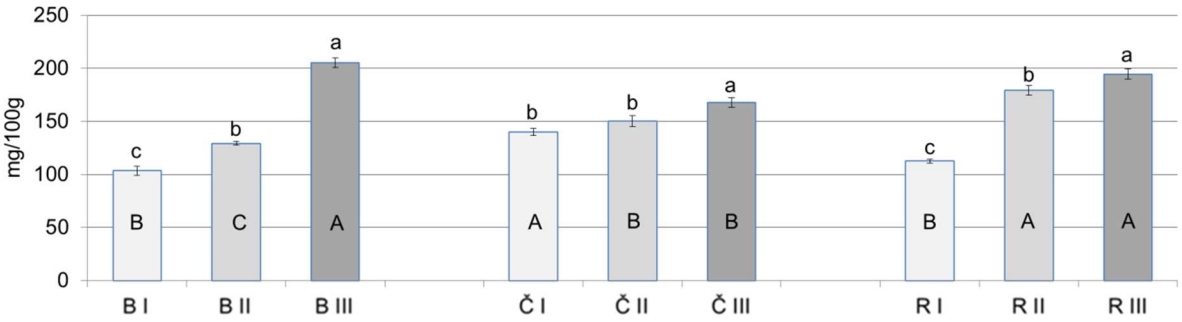
Slika 46 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **citrostadienol** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



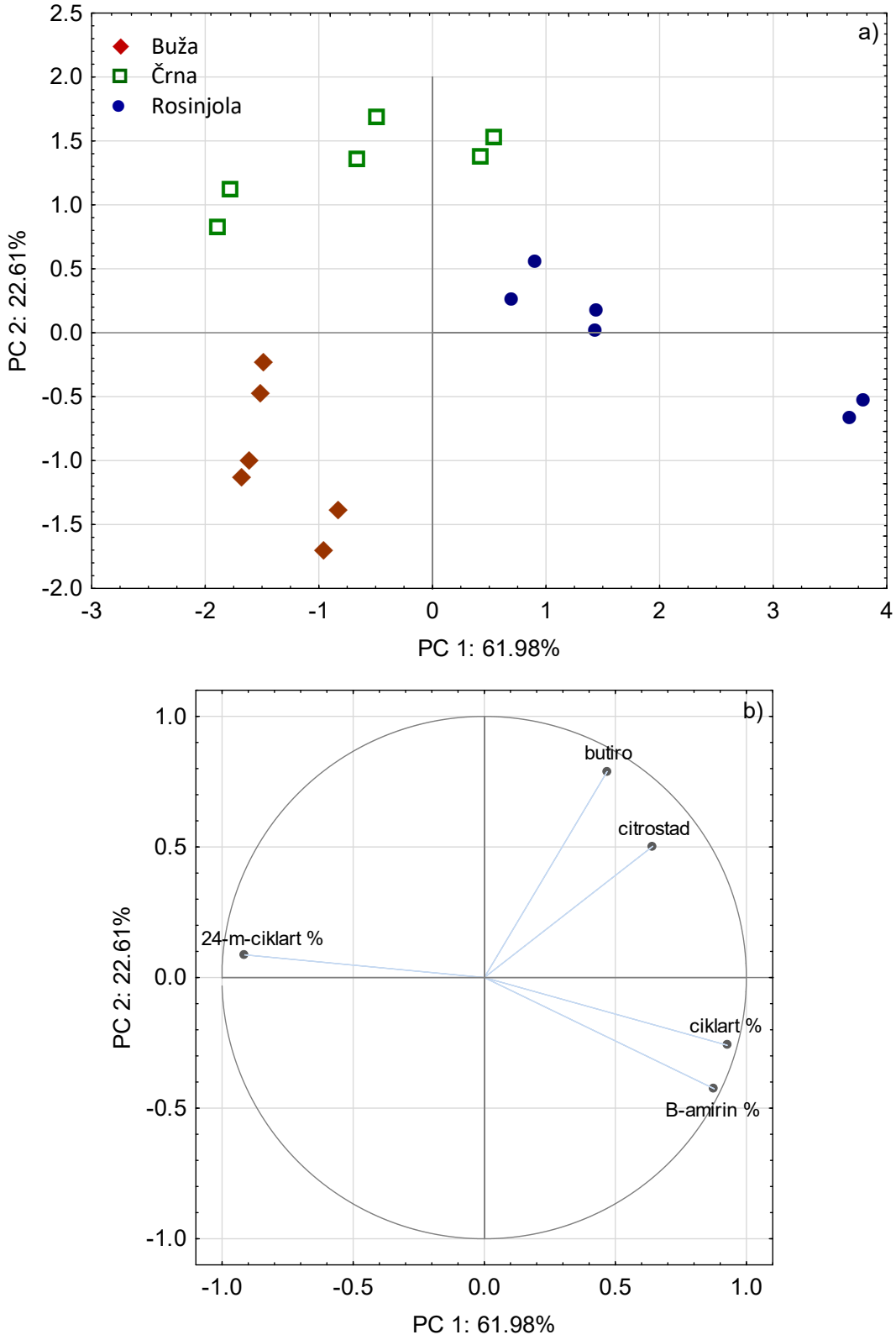
Slika 47 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **ukupnih 4-monometil-sterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



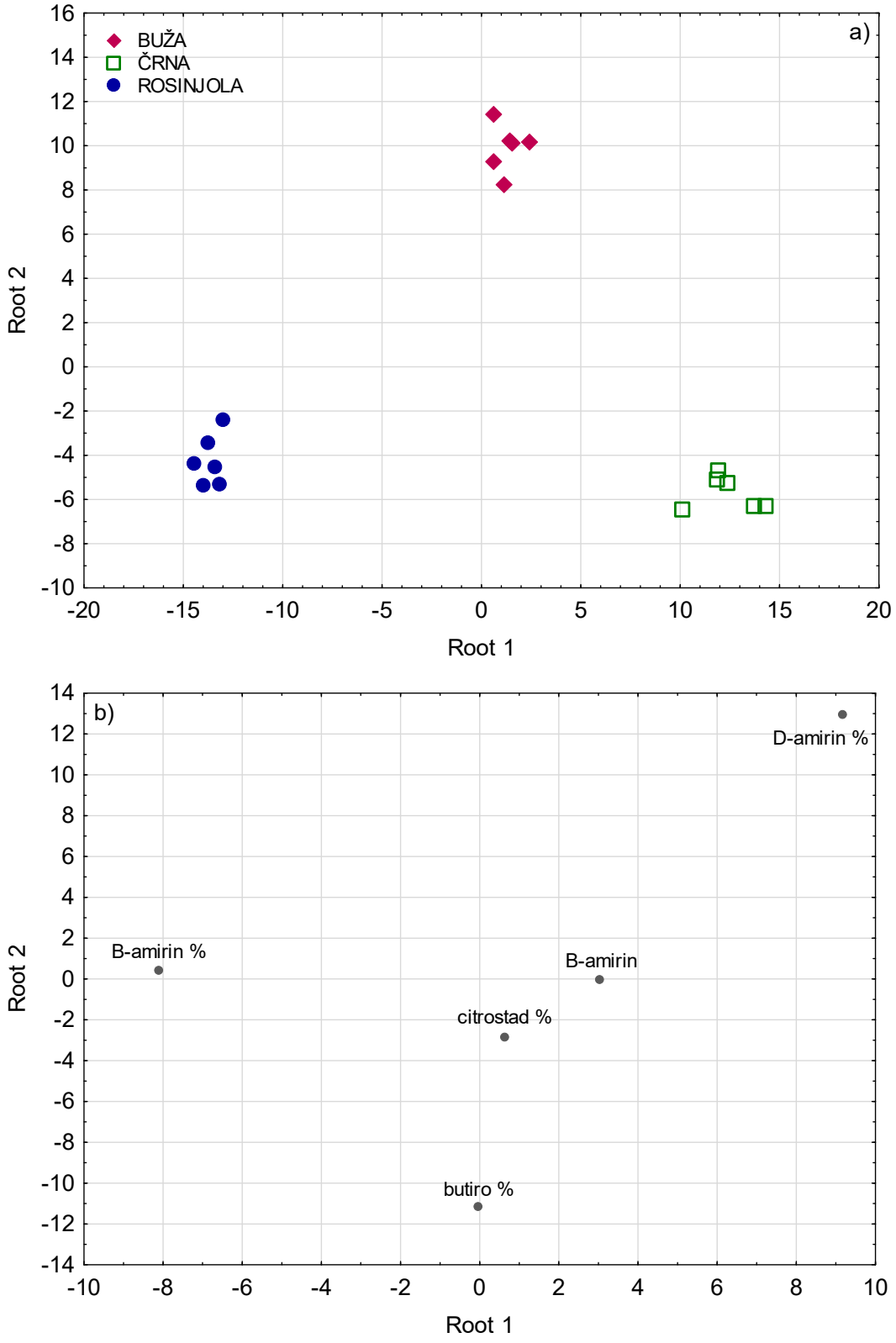
Slika 48 Prosječne koncentracije i relativni udjeli (n=2) **ukupnih 4,4-dimetil-sterola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



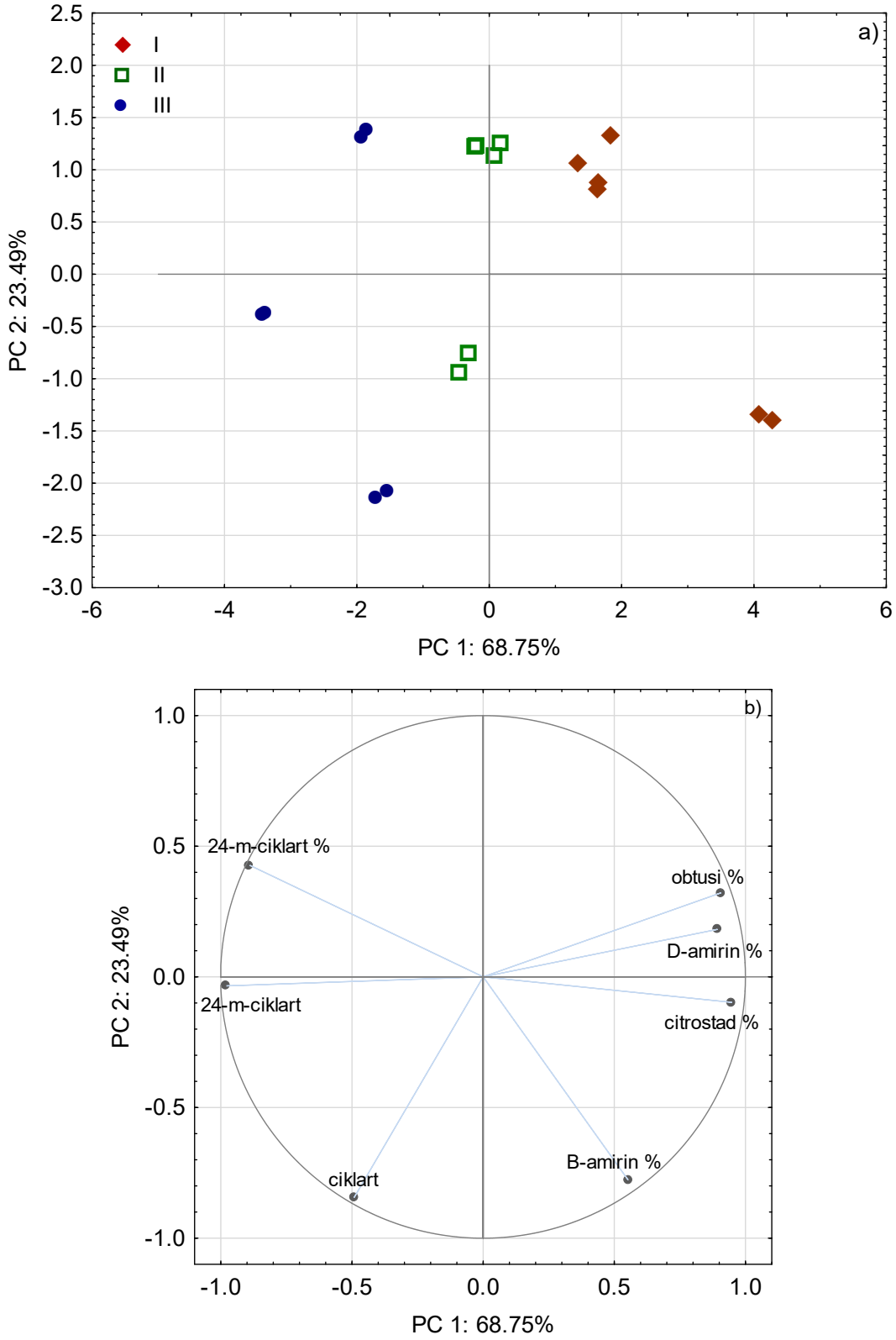
Slika 49 Prosječne koncentracije (n=2) **ukupnih triterpenskih alkohola** u djevičanskim maslinovim uljima proizvedenim od maslina sorti Buža (B), Črna (Č) i Rosinjola (R) ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I-III) (mala slova – statistički značajne razlike između stupnjeva zrelosti iste sorte, velika slova - statistički značajne razlike između sorti istog stupnja zrelosti, LSD test, $p < 0,05$)



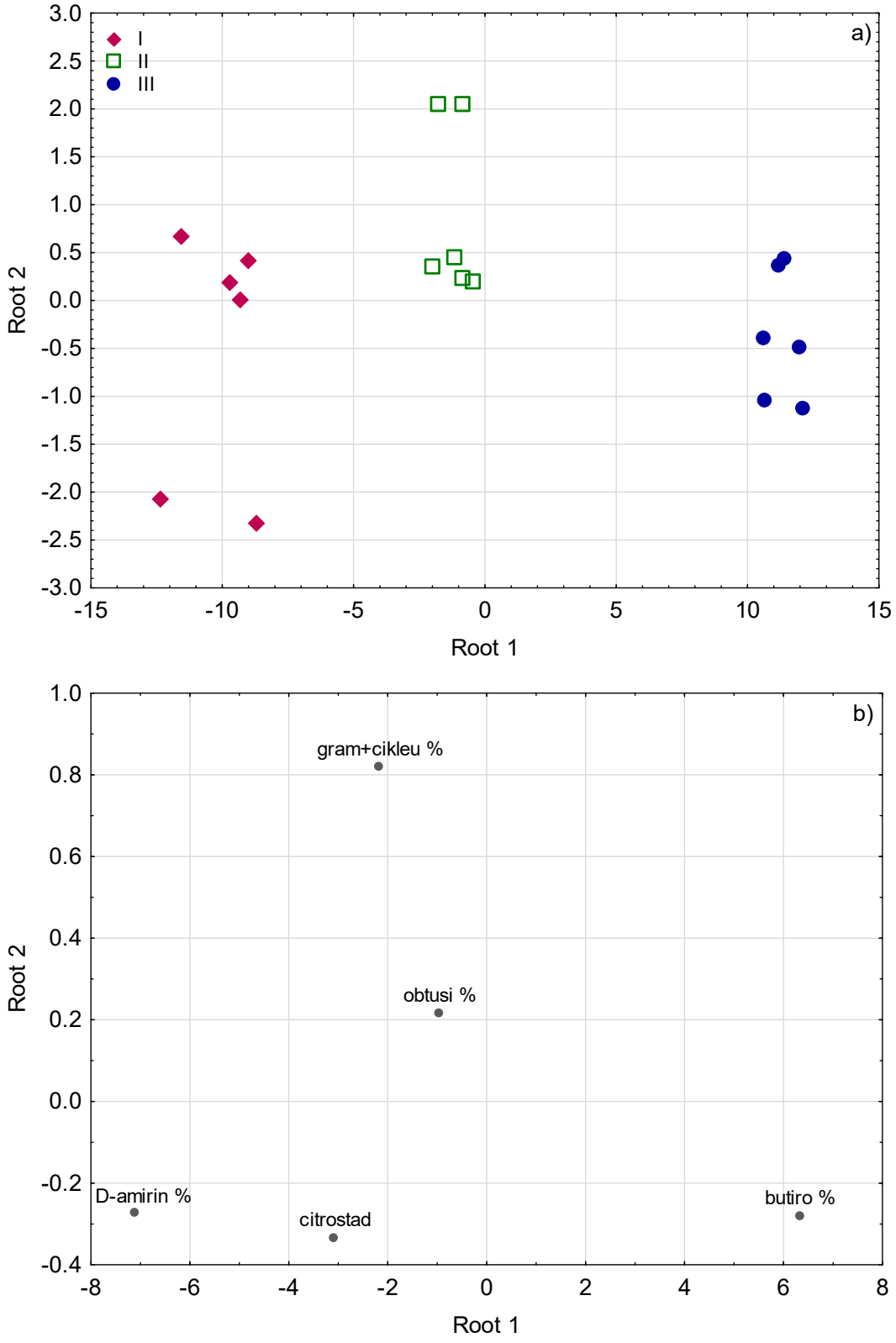
Slika 50 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nenadzirano, PCA) svježih maslinovih ulja dobivenih od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 51 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nadzirano, LDA) svježih maslinovih ulja dobivenih od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2



Slika 52 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nenadzirano, PCA) svježih maslinovih ulja sorti Buža, Črna i Rosinjola u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 53 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nadzirano, LDA) svježih maslinovih ulja sorti Buža, Črna i Rosinjola u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2

4.4. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA STEROLE I TRITERPENSKE DIOLE

Tablica 5 Utjecaj skladištenja maslinovog ulja pri različitim temperaturama na prosječne koncentracije (n=2) sterola i triterpenskih diola

Tretman	kolesterol	24-metilen-kolesterol	kampesterol	kampestanol	stigmasterol	Δ^7-kampesterol	$\Delta^{5,23}$-stigmastadien	klerosterol	β-sitosterol	sitostanol	Δ^5-avenasterol	$\Delta^{5,24}$-stigmastadien	Δ^7-stigmastenol	Δ^7-avenasterol	eritrodiol	uvaol	ukupni β-sitosterol	UKUPNI STEROLI
	mg/100 g																	
Buža I																		
Mlado ulje	0,36 [b]	0,18 [a]	3,27 [b]	0,05	0,75	0,13	0,00	1,17	98,76 [b]	0,62 [b]	10,46	0,80	0,14 [c]	1,08	0,92	0,48	111,80 [b]	117,76 [b]
sobna *T* / 1g	0,45 [a]	0,16 [b]	3,24 [b]	0,06	0,71	0,11	0,00	1,30	94,59 [c]	0,83 [b]	9,76	0,73	0,30 [b]	0,98	0,89	0,44	107,20 [c]	113,22 [c]
T hlađ. / 1g	0,46 [a]	0,19 [a]	3,39 [a]	0,07	0,76	0,12	0,00	1,24	101,50 [a]	1,70 [a]	9,80	0,78	0,33 [b]	1,03	0,92	0,48	115,02 [a]	121,37 [a]
T zamrzav. / 1g	0,29 [c]	0,18 [a]	3,25 [b]	0,07	0,73	0,10	0,00	1,20	95,98 [c]	0,68 [b]	10,09	0,66	0,47 [a]	0,95	0,88	0,41	108,62 [c]	114,67 [c]
Buža II																		
Mlado ulje	0,36	0,37 [a]	4,13 [a]	0,05	1,37 [a]	0,14	0,00	1,63	117,66 [a]	0,76	16,39 [a]	1,02 [a]	0,10 [b]	1,00 [b]	1,26 [a]	0,46	137,45 [a]	144,98 [a]
sobna *T* / 1g	0,46	0,37 [a]	4,03 [b]	0,10	1,32 [a]	0,15	0,00	1,51	113,63 [b]	1,76	14,83 [b]	0,84 [b]	0,30 [a]	1,06 [b]	1,23 [a]	0,58	132,57 [b]	140,35 [b]
T hlađ. / 1g	0,41	0,40 [a]	4,13 [a]	0,09	1,32 [a]	0,16	0,00	1,40	117,14 [a]	1,57	15,75 [ab]	1,00 [a]	0,26 [a]	1,01 [b]	1,29 [a]	0,56	136,86 [a]	144,64 [a]
T zamrzav. / 1g	0,43	0,22 [b]	3,70 [c]	0,07	0,82 [b]	0,14	0,00	1,32	110,59 [c]	0,87	11,54 [c]	0,85 [b]	0,09 [b]	1,17 [a]	1,02 [b]	0,46	125,17 [c]	131,81 [c]
Buža III																		
Mlado ulje	0,34	0,31 [b]	3,62 [a]	0,04 [b]	2,44 [a]	0,14 [a]	0,00 [b]	1,19	103,59 [a]	0,85	15,66 [a]	1,10 [a]	0,09 [c]	1,12	2,30 [a]	0,74 [a]	122,39 [a]	130,50 [a]
sobna *T* / 1g	0,40	0,27 [c]	3,36 [c]	0,05 [b]	2,30 [c]	0,10 [b]	0,01 [a]	1,14	96,19 [c]	1,35	13,86 [c]	1,02 [b]	0,50 [a]	1,06	2,15 [b]	0,66 [b]	113,56 [c]	121,60 [c]
T hlađ. / 1g	0,40	0,32 [a]	3,51 [b]	0,08 [a]	2,36 [b]	0,13 [a]	0,00 [b]	1,61	99,80 [b]	0,93	15,07 [b]	0,92 [c]	0,38 [b]	1,04	2,23 [ab]	0,73 [a]	118,34 [b]	126,55 [b]
T zamrzav. / 1g	0,30	0,30 [b]	3,46 [b]	0,05 [b]	2,32 [bc]	0,14 [a]	0,00 [b]	1,37	99,60 [b]	0,71	15,26 [ab]	0,88 [c]	0,39 [b]	1,06	2,16 [b]	0,74 [a]	117,82 [b]	125,83 [b]
Črna I																		
Mlado ulje	0,39 [c]	0,36 [c]	5,03 [a]	0,09	1,32 [b]	0,18	0,00	2,23	173,87 [ab]	1,42	21,34 [b]	1,71 [a]	0,28 [c]	1,17 [a]	1,04	0,84 [a]	200,57 [ab]	209,41 [b]
sobna *T* / 1g	0,51 [a]	0,53 [a]	5,10 [a]	0,12	1,59 [a]	0,19	0,00	2,22	176,64 [a]	1,79	22,50 [a]	1,67 [a]	0,32 [bc]	1,07 [b]	0,80	0,81 [ab]	204,82 [a]	214,24 [a]
T hlađ. / 1g	0,45 [b]	0,38 [bc]	4,82 [b]	0,12	1,27 [c]	0,16	0,00	2,14	163,61 [c]	1,23	20,18 [c]	1,44 [b]	0,40 [b]	1,06 [b]	0,96	0,72 [c]	188,61 [c]	197,27 [c]
T zamrzav. / 1g	0,33 [d]	0,39 [b]	4,99 [ab]	0,13	1,32 [b]	0,16	0,00	2,04	170,37 [b]	1,28	20,99 [bc]	1,47 [b]	0,55 [a]	1,08 [b]	0,99	0,73 [bc]	196,15 [b]	205,09 [b]
Črna II																		

Tretman	kolesterol	24-metilen-kolesterol	kampesterol	kampestanol	stigmasterol	Δ7-kampesterol	Δ5,23-stigmastadien	klerosterol	β-sitosterol	sitostanol	Δ5-avenasterol	Δ5,24-stigmastadien	Δ7-stigmastenol	Δ7-avenasterol	eritrodiol	uvaol	ukupni β-sitosterol	UKUPNI STEROLI
									mg/100 g									
Mlado ulje	0,33 c	0,50 a	5,37 a	0,06 c	1,70 a	0,17	0,00	2,33	188,13 a	1,29 b	24,62 a	1,84 a	0,29	1,07 b	1,02	0,79	218,22 a	227,70 a
sobna *T* / 1g	0,40 b	0,42 b	5,35 a	0,14 a	1,41 c	0,16	0,00	2,22	183,37 b	1,10 b	22,63 c	1,80 a	0,35	1,24 a	1,04 ab	0,84	211,12 b	220,58 b
T hlađ. / 1g	0,46 a	0,54 a	5,13 b	0,13 a	1,64 b	0,12	0,00	3,23	178,53 c	1,27 b	23,33 b	1,49 b	0,33	1,00 c	0,92 c	0,78	207,85 bc	217,21 bc
T zamrzav. / 1g	0,35 bc	0,54 a	5,17 b	0,11 b	1,63 b	0,16	0,00	2,19	177,49 c	1,75 a	22,73 c	1,48 b	0,25	1,02 c	1,09 a	0,72	205,64 c	214,87 c
Črna III																		
Mlado ulje	0,37	0,54 c	5,13 b	0,04 b	1,66 b	0,17	0,00	2,09	171,92 a	0,87	22,12 a	1,63 a	0,26 c	0,95 ab	1,21	0,80 a	198,63 a	207,75 a
sobna *T* / 1g	0,35	0,65 a	5,29 a	0,10 a	1,71 a	0,16	0,00	2,02	173,73 a	0,94	22,07 a	1,52 b	0,56 a	0,99 a	1,26	0,72 b	200,27 a	210,09 a
T hlađ. / 1g	0,54	0,58 b	4,91 c	0,11 a	1,61 c	0,17	0,00	3,59	164,71 b	1,04	20,99 b	1,28 c	0,34 b	0,91 bc	1,16	0,66 b	191,61 b	200,78 b
T zamrzav. / 1g	0,32	0,59 b	4,94 c	0,08 a	1,62 c	0,13	0,00	1,88	163,31 b	1,49	20,19 c	1,13 d	0,36 b	0,87 c	1,24	0,67 b	188,01 c	196,92 c
Rosinjola I																		
Mlado ulje	0,39	0,14 b	5,24 a	0,14 a	1,02 ab	0,12	0,00	1,47	124,62 a	0,96	12,04	1,24	0,20	0,68 b	1,21	0,62 a	140,33 a	148,25 a
sobna *T* / 1g	0,41	0,19 a	5,20 a	0,10 b	1,04 a	0,13	0,00	1,48	124,65 a	0,86	12,21	1,17	0,35	0,72 a	1,33	0,62 a	140,37 a	148,50 a
T hlađ. / 1g	0,35	0,17 ab	4,96 b	0,10 b	0,98 bc	0,12	0,02	1,43	119,82 b	1,20	11,27	1,04	0,43	0,67 b	1,28	0,56 ab	134,78 b	142,57 b
T zamrzav. / 1g	0,45	0,17 ab	4,93 b	0,09 b	0,96 c	0,09	0,01	2,07	115,71 c	1,02	10,96	1,02	0,37	0,65 c	1,20	0,54 b	130,78 b	138,49 b
Rosinjola II																		
Mlado ulje	0,37	0,32	6,74	0,29	6,15 a	0,40	0,51	1,88	138,68 a	1,08	18,25 a	1,55	2,96 b	2,10 a	1,73 c	0,66	161,94 a	181,27 a
sobna *T* / 1g	0,44	0,39	6,48	0,41	6,18 a	0,41	0,53	1,73	139,88 a	0,92	18,61 a	1,43	2,98 b	2,11 a	1,78 bc	0,66	163,09 a	182,48 a
T hlađ. / 1g	0,32	0,39	6,45	0,45	6,15 a	0,38	0,56	1,85	137,96 a	0,91	18,43 a	1,37	3,11 a	2,13 a	1,99 a	0,65	161,07 a	180,45 a
T zamrzav. / 1g	0,35	0,36	6,32	0,43	5,82 b	0,38	0,52	1,74	134,16 b	1,06	17,39 b	1,31	2,91 b	1,98 b	1,82 b	0,58	156,19 b	174,74 b
Rosinjola III																		
Mlado ulje	0,32 b	0,37	4,70 b	0,08 b	4,32 b	0,16 b	0,00 c	1,62	115,39 b	0,67 b	21,24 a	1,28 a	0,20 d	0,82 b	1,92 b	0,63	140,21 a	151,18 b
sobna *T* / 1g	0,49 a	0,39	5,24 a	0,28 a	4,94 a	0,28 a	0,31 a	1,92	118,16 a	1,55 a	16,92 d	1,26 b	1,75 a	1,50 a	1,60 c	0,60	140,11 a	154,99 a
T hlađ. / 1g	0,31 b	0,45	4,57 c	0,07 b	4,24 c	0,15 b	0,00 c	1,35	113,99 b	0,69 b	20,82 b	1,01 c	0,60 b	0,80 bc	2,06 a	0,63	137,86 a	149,04 b
T zamrzav. / 1g	0,34 b	0,41	4,38 d	0,05 b	4,05 d	0,15 b	0,04 b	1,38	108,21 c	0,56 b	20,21 c	1,28 a	0,47 c	0,79 c	1,95 b	0,60	131,68 b	142,33 c

Statistički značajne razlike između različitih razina faktora skladištenje utvrđene su zasebno za svaki tretman sorta × stupanj zrelosti i obilježene su različitim slovima (LSD test, $p < 0,05$). Ukupni β-sitosterol: $\Delta^{5,23}$-stigmastadienol, klerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ^{5}-avenasterol i $\Delta^{5,24}$-stigmastadienol.

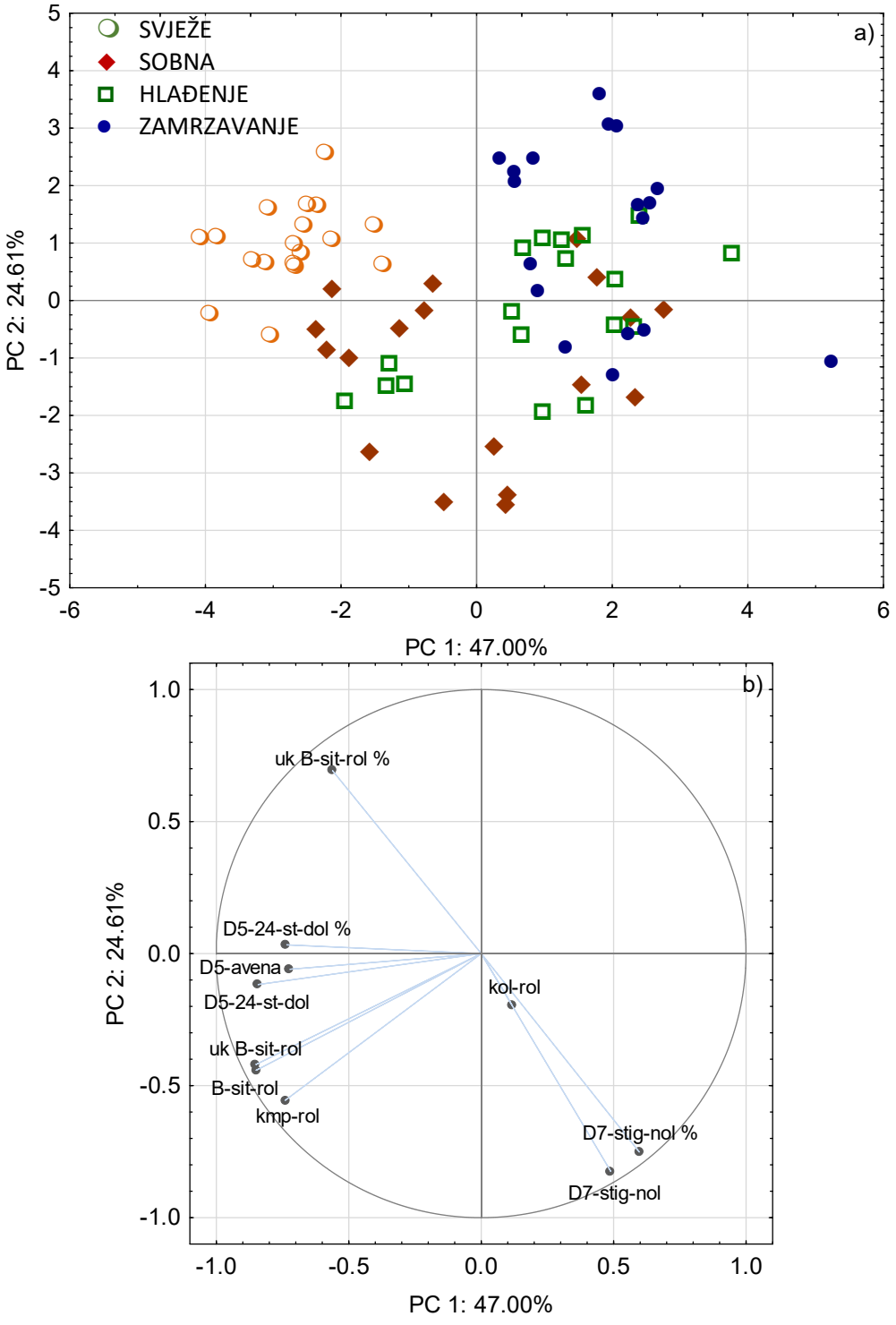
Tablica 6 Utjecaj skladištenja maslinovog ulja pri različitim temperaturama na prosječne relativne udjele (n=2) sterola i triterpenskih diola

Tretman	kolesterol	24-metilen-kolesterol	kampesterol	kampestanol	stigmasterol	Δ7-kampesterol	Δ5,23-stigmastadien	klerosterol	β-sitosterol	sitostanol	Δ5-avenasterol	Δ5,24-stigmastadien	Δ7-stigmastenol	Δ7-avenasterol	eritrodiol	uvaol	ukupni β-sitosterol
									%								
Buža I																	
Mlado ulje	0,30 b	0,15	2,77 c	0,04	0,64	0,11	0,00	0,99 b	83,86a	0,53 b	8,89	0,68	0,12 c	0,92	0,77	0,40	94,94
sobna *T* / 1g	0,40 a	0,14	2,86 a	0,05	0,62	0,10	0,00	1,15 a	83,54b	0,73 b	8,62	0,64	0,26 b	0,87	0,78	0,39	94,69
T hlađ. / 1g	0,38 a	0,15	2,79 bc	0,06	0,63	0,10	0,00	1,02 b	83,63ab	1,40 a	8,08	0,64	0,27 b	0,85	0,75	0,39	94,77
T zamrzav. / 1g	0,25 b	0,16	2,83 ab	0,06	0,64	0,09	0,00	1,05 ab	83,71b	0,59 b	8,80	0,58	0,41 a	0,83	0,76	0,36	94,72
Buža II																	
Mlado ulje	0,25	0,25 a	2,85	0,03	0,94 a	0,10	0,00	1,12	81,16b	0,52	11,30a	0,70 a	0,07 b	0,69 bc	0,86	0,31	94,81b
sobna *T* / 1g	0,32	0,26 a	2,87	0,07	0,94 a	0,11	0,00	1,07	80,96b	1,25	10,57a	0,60 b	0,21 a	0,76 c	0,86	0,40	94,45d
T hlađ. / 1g	0,29	0,27 a	2,85	0,06	0,92 b	0,11	0,00	0,97	80,99b	1,08	10,89a	0,69 a	0,18 a	0,70 b	0,88	0,38	94,62c
T zamrzav. / 1g	0,33	0,17 b	2,81	0,05	0,63 c	0,10	0,00	1,00	83,90a	0,66	8,76 b	0,64 ab	0,07 b	0,89 a	0,77	0,34	94,97a
Buža III																	
Mlado ulje	0,26	0,24	2,77	0,03 b	1,87	0,11	0,00 b	0,91	79,38	0,65	12,00a	0,84 a	0,07 c	0,86	1,72	0,56	93,78a
sobna *T* / 1g	0,33	0,22	2,76	0,04 b	1,89	0,08	0,01 a	0,94	79,10	1,11	11,40b	0,84 a	0,41 a	0,87	1,73	0,53	93,39b
T hlađ. / 1g	0,31	0,25	2,77	0,06 a	1,87	0,10	0,00 b	1,27	78,86	0,74	11,91a	0,73 b	0,30 b	0,82	1,72	0,56	93,51ab
T zamrzav. / 1g	0,24	0,24	2,75	0,04 b	1,85	0,11	0,00 b	1,09	79,15	0,56	12,12a	0,70 b	0,31 b	0,84	1,68	0,58	93,63a
Črna I																	
Mlado ulje	0,19 b	0,17 c	2,40	0,04	0,63 c	0,09	0,00	1,06	83,03a	0,68	10,19	0,82 a	0,13 c	0,56 a	0,49	0,40	95,78a
sobna *T* / 1g	0,24 a	0,25 a	2,38	0,06	0,74 a	0,09	0,00	1,03	82,45b	0,84	10,50	0,78 b	0,15 c	0,50 c	0,37	0,38	95,60b
T hlađ. / 1g	0,23 a	0,19 b	2,44	0,06	0,64 b	0,08	0,00	1,09	82,94a	0,63	10,23	0,73 c	0,21 b	0,54 ab	0,48	0,36	95,61b
T zamrzav. / 1g	0,16 c	0,19 b	2,43	0,06	0,64 b	0,08	0,00	0,99	83,07a	0,62	10,23	0,71 c	0,27 a	0,53 b	0,48	0,35	95,64b
Črna II																	
Mlado ulje	0,14 c	0,22 b	2,36 b	0,02 c	0,74 a	0,08	0,00	1,02	82,62b	0,57 b	10,81a	0,81 a	0,13	0,47 bc	0,44 bc	0,34	95,83a
sobna *T* / 1g	0,18 b	0,19 c	2,42 a	0,06 a	0,64 b	0,07	0,00	1,00	83,13a	0,50 b	10,26c	0,81 a	0,16	0,56 a	0,47 b	0,38	95,71b

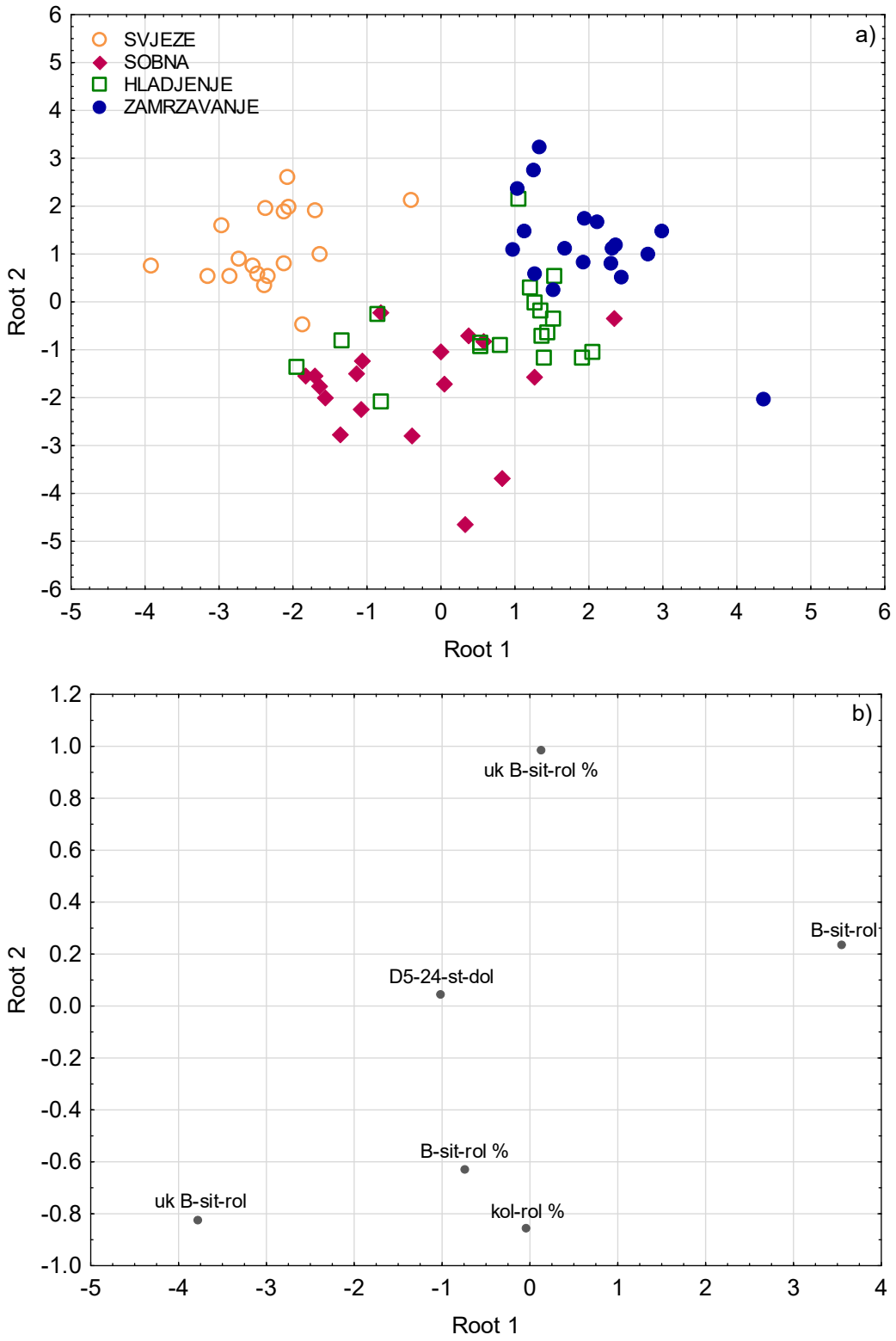
Tretman	kolesterol	24-metilen-kolesterol	kampesterol	kampestanol	stigmasterol	Δ^7-kampesterol	$\Delta^{5,23}$-stigmastadien	klerosterol	β-sitosterol	sitostanol	Δ^5-avenasterol	$\Delta^{5,24}$-stigmastadien	Δ^7-stigmastenol	Δ^7-avenasterol	eritrodiol	uvaol	ukupni β-sitosterol
	%																
T hlađ. / 1g	0,21 [a]	0,25 [a]	2,36 [b]	0,06 [ab]	0,76 [a]	0,06	0,00	1,49	82,19[b]	0,58 [b]	10,74[ab]	0,69 [b]	0,15	0,46 [c]	0,42 [c]	0,35	95,69[b]
T zamrzav. / 1ç	0,16 [bc]	0,25 [a]	2,41 [a]	0,05 [b]	0,76 [a]	0,08	0,00	1,02	82,60[b]	0,81 [a]	10,58[b]	0,69 [b]	0,12	0,47 [b]	0,50 [a]	0,33	95,70[b]
Črna III																	
Mlado ulje	0,18	0,26	2,47	0,02 [b]	0,80	0,08	0,00	1,00	82,76	0,42	10,65	0,78 [a]	0,13 [c]	0,46	0,58	0,38 [a]	95,61[a]
sobna *T* / 1g	0,17	0,31	2,52	0,05 [a]	0,81	0,08	0,00	0,96	82,69	0,45	10,50	0,72 [b]	0,27 [a]	0,47	0,59	0,34 [b]	95,33[c]
T hlađ. / 1g	0,27	0,29	2,44	0,05 [a]	0,80	0,08	0,00	1,78	82,04	0,52	10,46	0,64 [c]	0,17 [b]	0,45	0,57	0,33 [b]	95,44[bc]
T zamrzav. / 1ç	0,16	0,30	2,51	0,04 [a]	0,82	0,07	0,00	0,96	82,94	0,76	10,25	0,57 [d]	0,18 [b]	0,44	0,62	0,34 [b]	95,47[b]
Rosinjola I																	
Mlado ulje	0,26	0,09 [b]	3,53	0,10 [a]	0,69	0,08	0,00	0,99	84,06[a]	0,65	8,12	0,84	0,13	0,46	0,81	0,41	94,66
sobna *T* / 1g	0,27	0,13 [a]	3,50	0,07 [b]	0,70	0,09	0,00	1,00	83,94[a]	0,58	8,22	0,79	0,23	0,49	0,88	0,41	94,52
T hlađ. / 1g	0,24	0,12 [a]	3,48	0,07 [b]	0,69	0,09	0,02	1,00	84,04[a]	0,84	7,91	0,73	0,30	0,47	0,88	0,39	94,54
T zamrzav. / 1ç	0,33	0,12 [a]	3,56	0,07 [b]	0,69	0,07	0,00	1,49	83,55[b]	0,74	7,91	0,74	0,27	0,47	0,86	0,38	94,44
Rosinjola II																	
Mlado ulje	0,21	0,18	3,72	0,16	3,39 [a]	0,22	0,28	1,03	76,50	0,60	10,07[ab]	0,86	1,63 [c]	1,16	0,94 [c]	0,36	89,34[a]
sobna *T* / 1g	0,24	0,21	3,55	0,23	3,39 [a]	0,22	0,29	0,95	76,65	0,50	10,20[a]	0,78	1,63 [c]	1,15	0,96 [c]	0,36	89,37[a]
T hlađ. / 1g	0,18	0,21	3,58	0,25	3,41 [a]	0,21	0,31	1,02	76,45	0,50	10,21[a]	0,76	1,72 [a]	1,18	1,09 [a]	0,36	89,26[b]
T zamrzav. / 1ç	0,20	0,21	3,61	0,24	3,33 [b]	0,22	0,30	1,00	76,78	0,60	9,95 [b]	0,75	1,66 [b]	1,13	1,03 [b]	0,33	89,38[a]
Rosinjola III																	
Mlado ulje	0,21 [b]	0,25 [b]	3,11 [b]	0,05 [b]	2,86 [b]	0,10 [b]	0,00 [c]	1,07	76,33[a]	0,44 [b]	14,05[b]	0,85 [b]	0,14 [d]	0,54 [b]	1,25 [b]	0,41	92,74[a]
sobna *T* / 1g	0,31 [a]	0,25 [b]	3,38 [a]	0,18 [a]	3,19 [a]	0,18 [a]	0,20 [a]	1,24	76,24[ab]	1,00 [a]	10,92[c]	0,81 [c]	1,13 [a]	0,97 [a]	1,02 [c]	0,38	90,40[c]
T hlađ. / 1g	0,21 [b]	0,30 [a]	3,06 [c]	0,05 [b]	2,85 [b]	0,10 [b]	0,00 [c]	0,90	76,48[a]	0,47 [b]	13,97[b]	0,68 [d]	0,40 [b]	0,54 [b]	1,36 [a]	0,42	92,50[b]
T zamrzav. / 1ç	0,24 [b]	0,29 [a]	3,08 [c]	0,03 [b]	2,85 [b]	0,11 [b]	0,03 [b]	0,97	76,03[b]	0,39 [b]	14,20[a]	0,90 [a]	0,33 [c]	0,55 [b]	1,35 [a]	0,41	92,52[b]

Statistički značajne razlike između različitih razina faktora skladištenje utvrđene su zasebno za svaki tretman sorta × stupanj zrelosti i obilježene su različitim slovima (LSD test, $p < 0,05$). Ukupni β-sitosterol: $\Delta^{5,23}$-stigmastadienol, klerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ^5-avenasterol i $\Delta^{5,24}$-stigmastadienol.

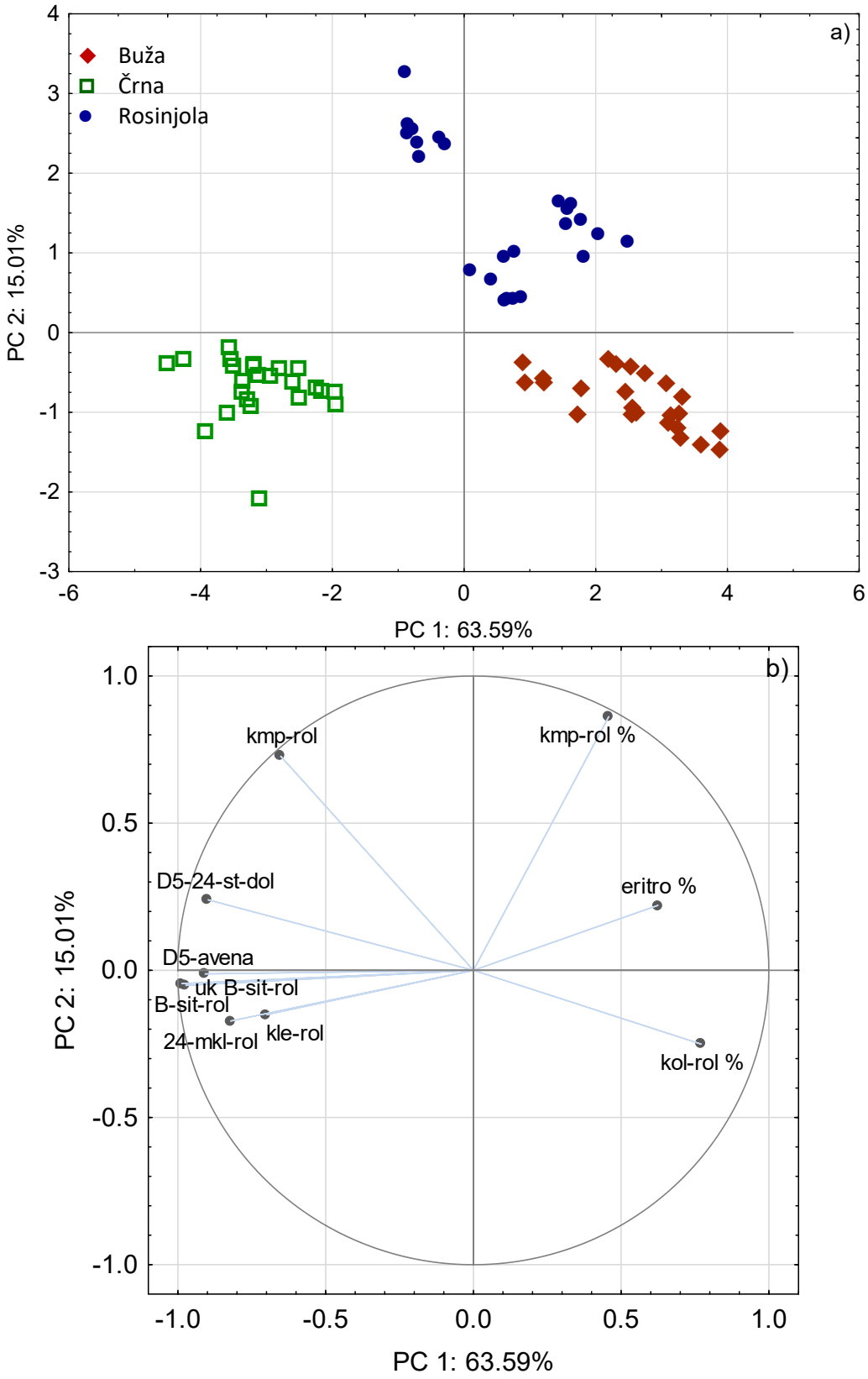
4.5. POSTOJANOST STEROLA I TRITERPENSKIH DIOLA KAO POKAZATELJA SORTE I STUPNJA ZRELOSTI



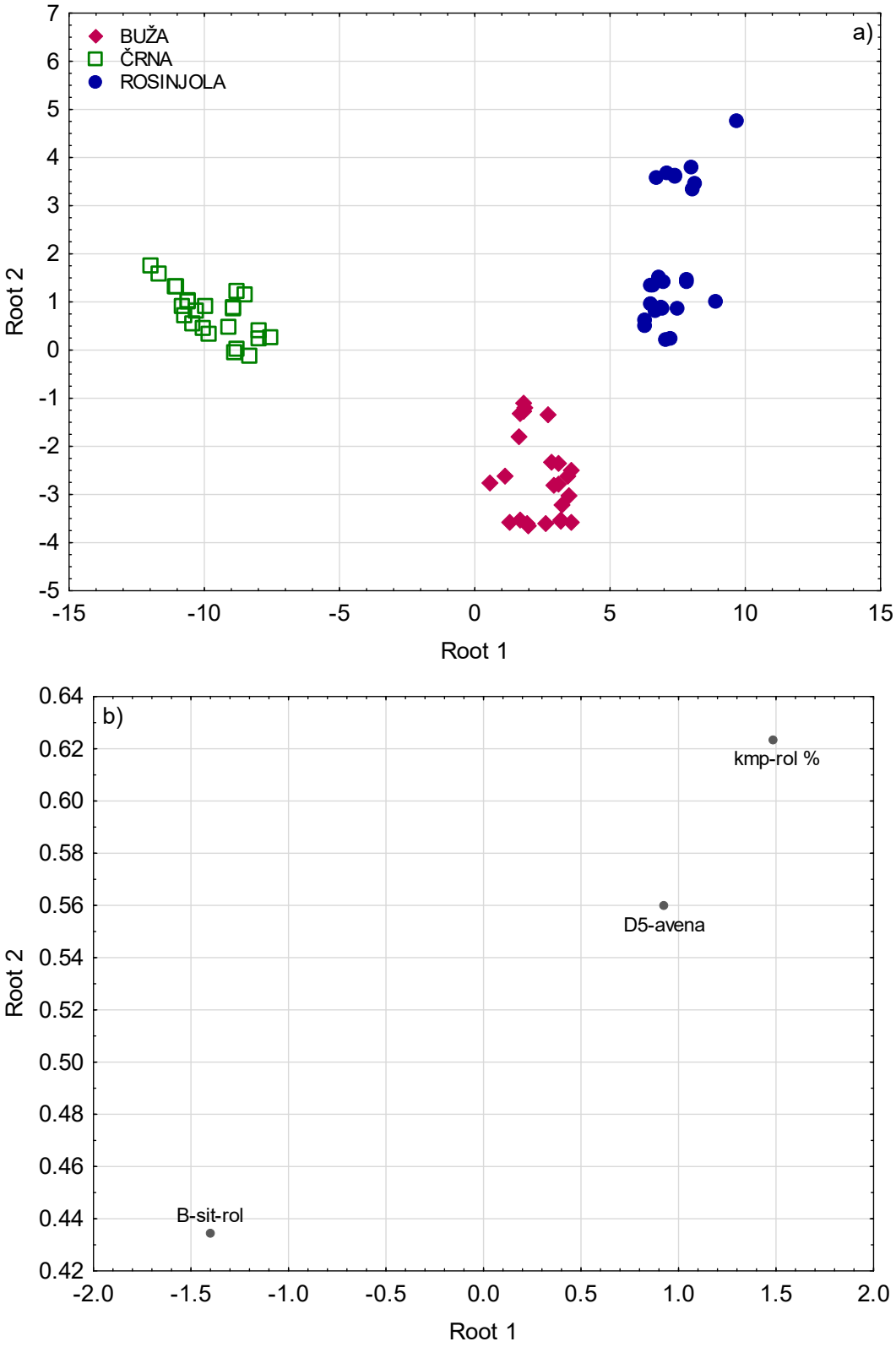
Slika 54 (a) Razdvajanje na osnovi trajanja i temperature skladištenja (nenadzirano, PCA) maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



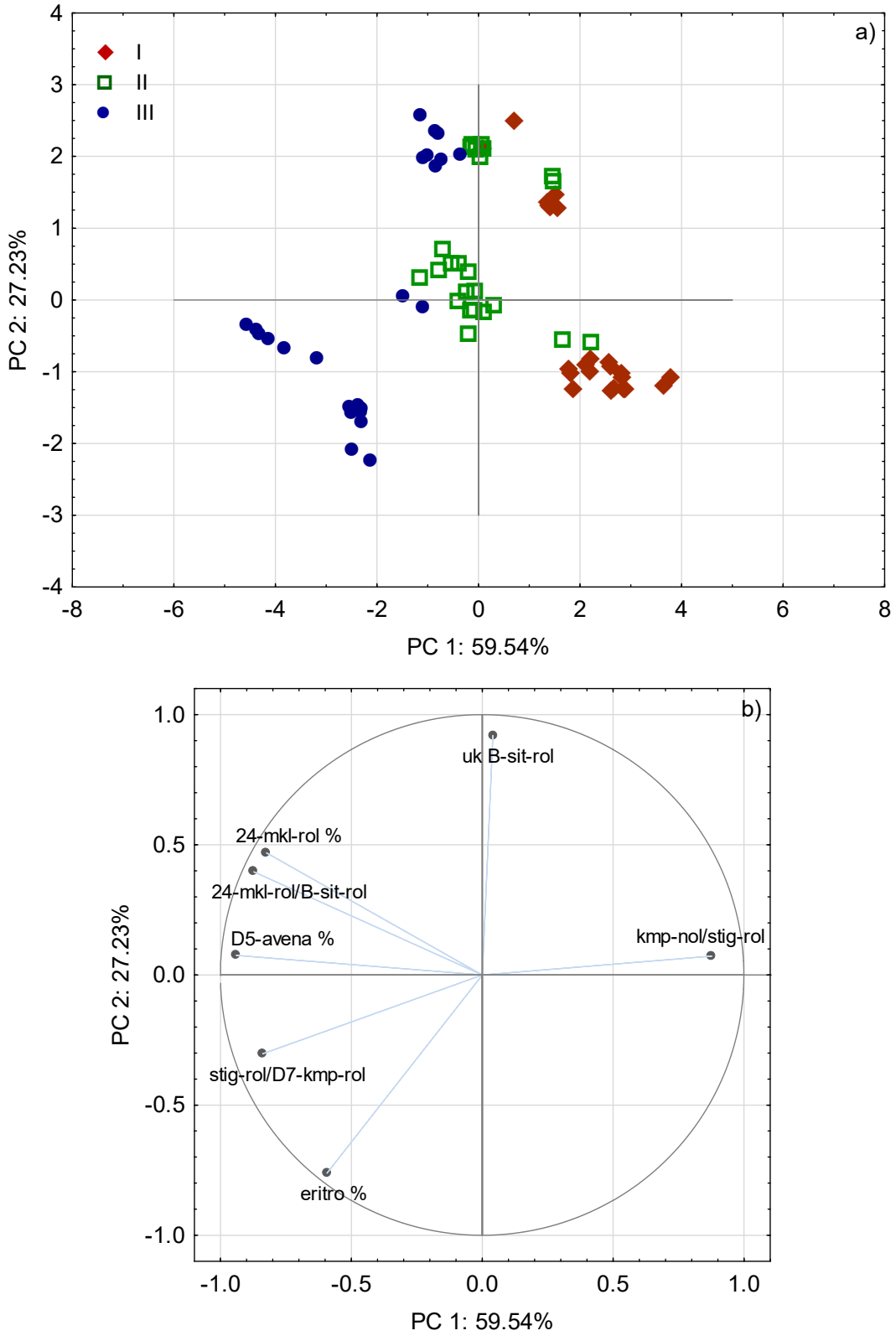
Slika 55 (a) Razdvajanje na osnovi trajanja i temperature skladištenja (nadzirano, LDA) maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2



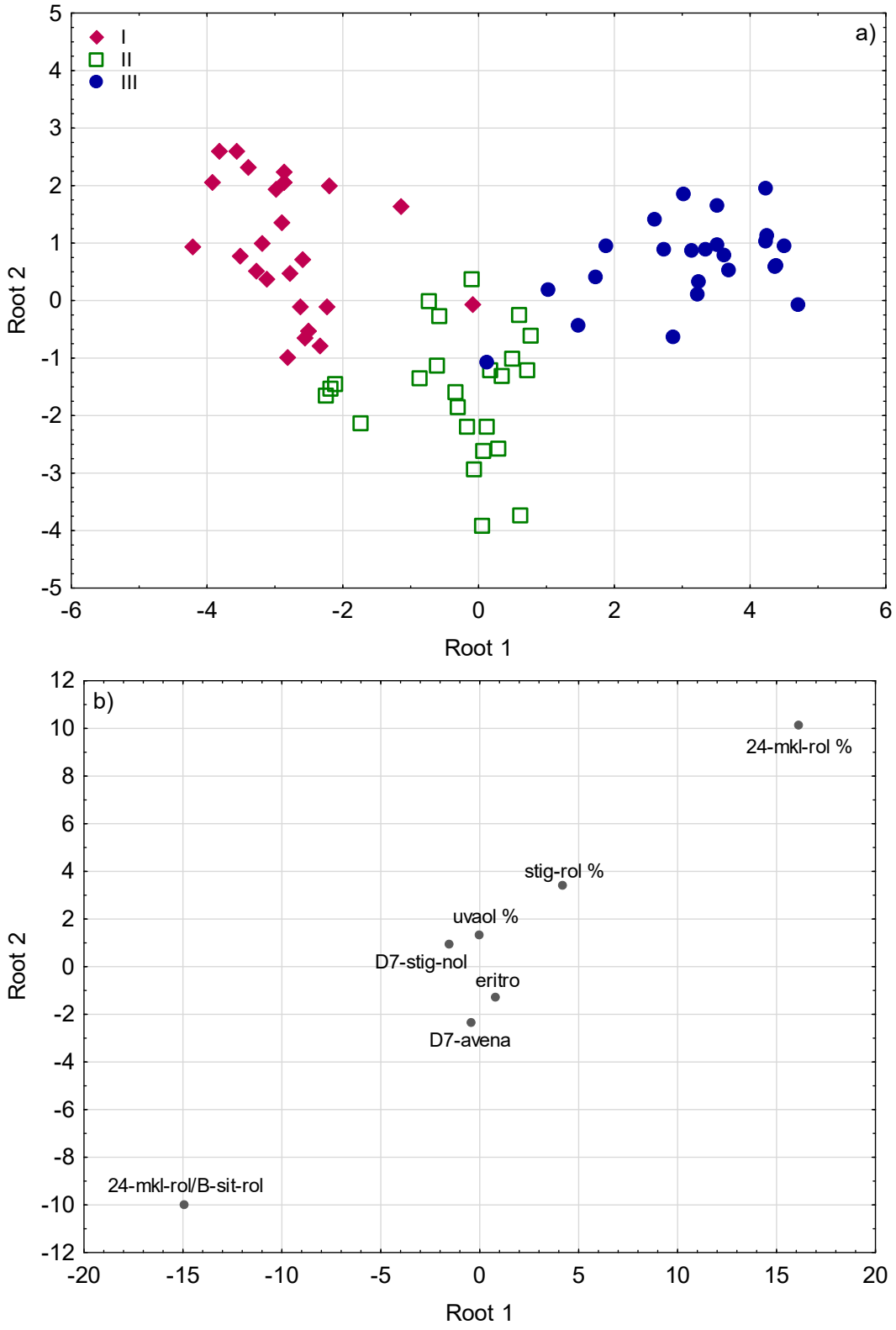
Slika 56 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nenadzirano, PCA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; (b) Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 57 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nadzirano, LDA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2



Slika 58 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nenadzirano, PCA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%" te omjera) uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 59 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nadzirano, LDA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija sterola i triterpenskih diola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%" te omjera) uzduž smjerova Root 1 i Root 2

4.6. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA ALIFATSKE ALKOHOLE

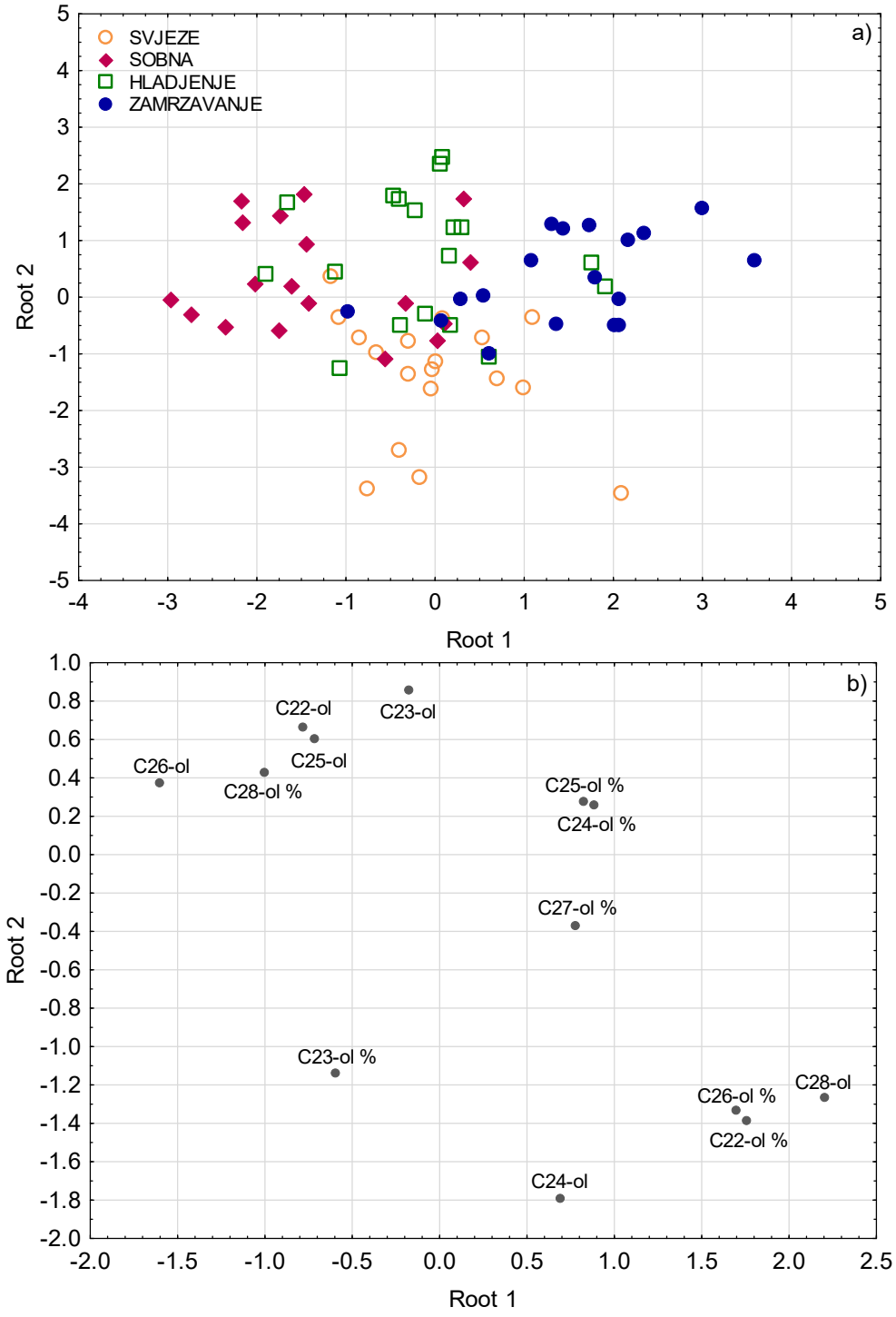
Tablica 7 Utjecaj skladištenja maslinovog ulja pri različitim temperaturama na koncentracije i relativne udjele alifatskih alkohola

Tretman	decosanol	tricosanol	tetracosanol	pentacosanol	hexacosanol	heptacosanol	octacosanol	UKUPNI ALIFATSKI	decosanol	tricosanol	tetracosanol	pentacosanol	hexacosanol	heptacosanol	octacosanol
	mg/100 g								%						
Buža I															
Mlado ulje	1,24	0,20	2,35	0,26	3,53	0,19	1,50	9,27	13,49	2,12 a	25,36	2,80	38,09	2,01	16,13
sobna *T* / 1g	1,12	0,16	2,16	0,18	3,18	0,15	1,41	8,36	13,39	1,97 b	25,78	2,19	38,06	1,75	16,88
T hlađ. / 1g	1,21	0,16	2,30	0,26	3,38	0,17	1,42	8,90	13,55	1,83 b	25,83	2,91	38,02	1,86	16,01
T zamrzav. / 1ç	1,21	0,18	2,34	0,25	3,49	0,21	1,45	9,14	13,23	1,96 b	25,67	2,75	38,17	2,32	15,91
Buža II															
Mlado ulje	1,66	0,19	2,13	0,21	2,83	0,15	1,26	8,43	19,74	2,23	25,22	2,47	33,56	1,82	14,96
sobna *T* / 1g	1,55	0,19	2,01	0,21	2,68	0,13	1,17	7,93	19,53	2,33	25,33	2,60	33,84	1,64	14,72
T hlađ. / 1g	1,63	0,19	2,12	0,22	2,86	0,15	1,26	8,43	19,31	2,24	25,22	2,56	33,92	1,83	14,92
T zamrzav. / 1ç	1,70	0,18	2,19	0,23	2,88	0,14	1,21	8,53	19,95	2,17	25,68	2,65	33,75	1,67	14,13
Buža III															
Mlado ulje	2,17 a	0,20 b	2,92 a	0,24 ab	3,68 a	0,20	1,45 ab	10,86 a	20,03	1,87 b	26,87 b	2,19 a	33,84	1,88	13,33
sobna *T* / 1g	2,11 a	0,27 a	3,00 a	0,19 c	3,44 ab	0,19	1,31 bc	10,52 a	20,10	2,60 a	28,50 a	1,83 b	32,71	1,80	12,46
T hlađ. / 1g	2,18 a	0,20 b	2,93 a	0,27 a	3,71 a	0,19	1,54 a	11,01 a	19,84	1,77 b	26,64 b	2,41 a	33,65	1,69	14,01
T zamrzav. / 1ç	1,95 b	0,18 b	2,51 b	0,21 bc	3,07 b	0,15	1,19 c	9,26 b	21,08	1,92 b	27,12 b	2,22 a	33,19	1,67	12,80
Črna I															
Mlado ulje	0,96 b	0,17	2,11 a	0,37	4,72 a	0,25	1,97 a	10,54 a	9,09 b	1,57	20,04 b	3,54	44,74 a	2,39	18,63 a
sobna *T* / 1g	1,08 a	0,14	1,83 c	0,33	4,11 bc	0,18	1,64 c	9,31 b	11,63 a	1,47	19,66 c	3,54	44,14 b	1,92	17,65 b
T hlađ. / 1g	0,88 c	0,14	1,97 b	0,34	4,01 c	0,21	1,70 b	9,24 b	9,47 b	1,50	21,32 a	3,67	43,39 c	2,26	18,40 a
T zamrzav. / 1ç	0,85 c	0,13	1,96 b	0,36	4,41 ab	0,25	1,86 ab	9,83 ab	8,69 b	1,32	19,90 bc	3,70	44,82 a	2,54	18,93 a
Črna II															

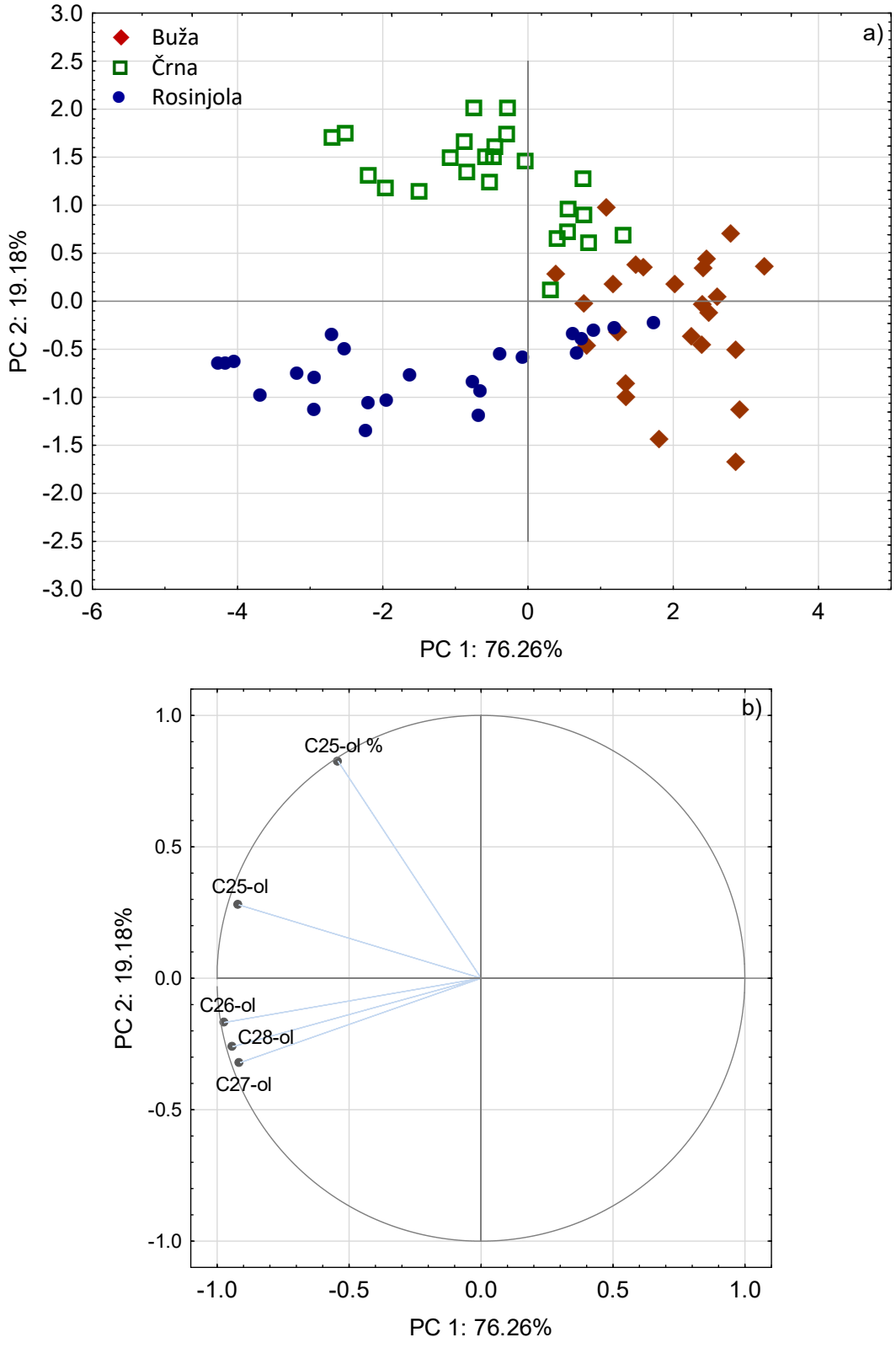
Tretman	decosanol	tricosanol	tetracosanol	pentacosanol	hexacosanol	heptacosanol	octacosanol	UKUPNI ALIFATSKI	decosanol	tricosanol	tetracosanol	pentacosanol	hexacosanol	heptacosanol	octacosanol
	mg/100 g								%						
Mlado ulje	1,03	0,15	1,85 b	0,32	4,30 b	0,22 ab	1,60 b	9,48 b	10,92 a	1,59	19,57	3,42	45,33	2,30	16,89
sobna *T* / 1g	0,96	0,17	2,16 a	0,38	4,63 a	0,26 a	1,92 a	10,47 a	9,19 b	1,57	20,58	3,61	44,15	2,43	18,29
T hlađ. / 1g	1,03	0,13	1,83 b	0,32	4,16 b	0,18 b	1,60 b	9,20 b	11,10 a	1,38	19,78	3,44	45,02	1,93	17,36
T zamrzav. / 1ç	1,03	0,15	1,83 b	0,32	4,15 b	0,19 b	1,55 b	9,23 b	11,15 a	1,60	19,87	3,50	44,97	2,08	16,83
Črna III															
Mlado ulje	1,45	0,18	2,20 b	0,28	3,76	0,18	1,47	9,52 a	15,21	1,87	23,11	2,94	39,51	1,89	15,46
sobna *T* / 1g	1,49	0,19	2,32 a	0,30	3,71	0,17	1,49	9,66 a	15,39	1,99	24,01	3,05	38,36	1,79	15,41
T hlađ. / 1g	1,50	0,18	2,16 bc	0,28	3,75	0,20	1,52	9,60 a	15,63	1,86	22,51	2,95	39,08	2,11	15,87
T zamrzav. / 1ç	1,50	0,17	2,10 c	0,27	3,60	0,17	1,40	9,21 b	16,30	1,87	22,81	2,95	39,05	1,81	15,21
Rosinjola I															
Mlado ulje	0,50 a	0,11 a	1,75	0,36	5,79	0,35 a	2,69 ab	11,54 a	4,36	0,93 a	15,13 ab	3,08	50,20 ab	3,01	23,28 b
sobna *T* / 1g	0,51 a	0,11 a	1,74	0,37	5,77	0,36 a	2,76 a	11,62 a	4,39	0,95 a	14,93 b	3,19	49,69 b	3,09	23,76 a
T hlađ. / 1g	0,46 b	0,07 c	1,64	0,32	5,50	0,32 b	2,59 bc	10,90 b	4,21	0,68 b	15,04 b	2,93	50,50 a	2,89	23,75 a
T zamrzav. / 1ç	0,47 b	0,09 b	1,64	0,33	5,40	0,31 b	2,48 c	10,73 b	4,39	0,87 a	15,31 a	3,04	50,33 a	2,90	23,16 b
Rosinjola II															
Mlado ulje	2,28 ab	0,27	4,01 a	0,36	5,25 a	0,28	2,27	14,73 a	15,63	1,85	27,28	2,42	35,54	1,92	15,37
sobna *T* / 1g	2,16 bc	0,25	3,63 b	0,32	4,78 b	0,26	2,11	13,52 b	15,98	1,85	26,87	2,39	35,34	1,94	15,63
T hlađ. / 1g	2,30 a	0,26	3,87 a	0,38	5,04 ab	0,27	2,17	14,28 ab	16,11	1,84	27,07	2,64	35,30	1,89	15,15
T zamrzav. / 1ç	2,04 c	0,22	3,31 c	0,30	4,21 c	0,23	1,79	12,10 c	16,86	1,84	27,32	2,49	34,77	1,90	14,84
Rosinjola III															
Mlado ulje	1,93 b	0,23	3,71 a	0,28 b	3,70 b	0,22 b	1,46 b	11,53 b	16,73	2,02 a	32,15 a	2,42	32,06 b	1,94 a	12,69 b
sobna *T* / 1g	2,03 a	0,22	3,66 a	0,31 a	4,43 a	0,25 a	1,90 a	12,80 a	15,86	1,69 b	28,58 b	2,42	34,61 a	1,99 a	14,85 a
T hlađ. / 1g	1,95 b	0,23	3,78 a	0,28 b	3,76 b	0,20 bc	1,49 b	11,70 b	16,66	1,96 a	32,33 a	2,43	32,14 b	1,72 b	12,76 b
T zamrzav. / 1ç	1,86 c	0,21	3,47 b	0,26 c	3,39 c	0,19 c	1,35 c	10,74 c	17,35	2,00 a	32,35 a	2,41	31,59 b	1,76 b	12,54 b

Statistički značajne razlike između različitih razina faktora skladištenje utvrđene su zasebno za svaki tretman sorta × stupanj zrelosti i obilježene su različitim slovima (LSD test, $p < 0,05$).

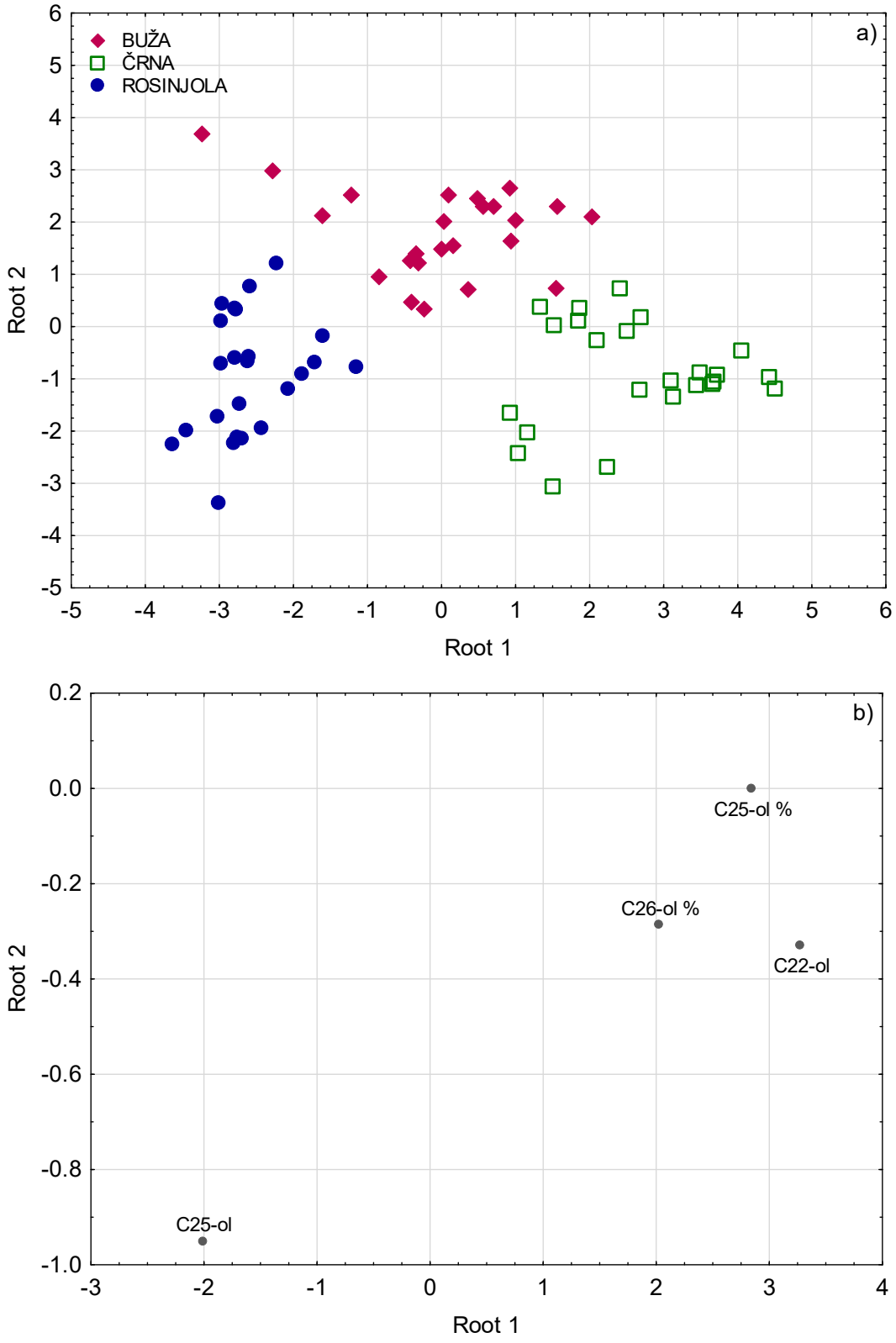
4.7. POSTOJANOST ALIFATSKIH ALKOHOLA KAO POKAZATELJA SORTE I STUPNJA ZRELOSTI



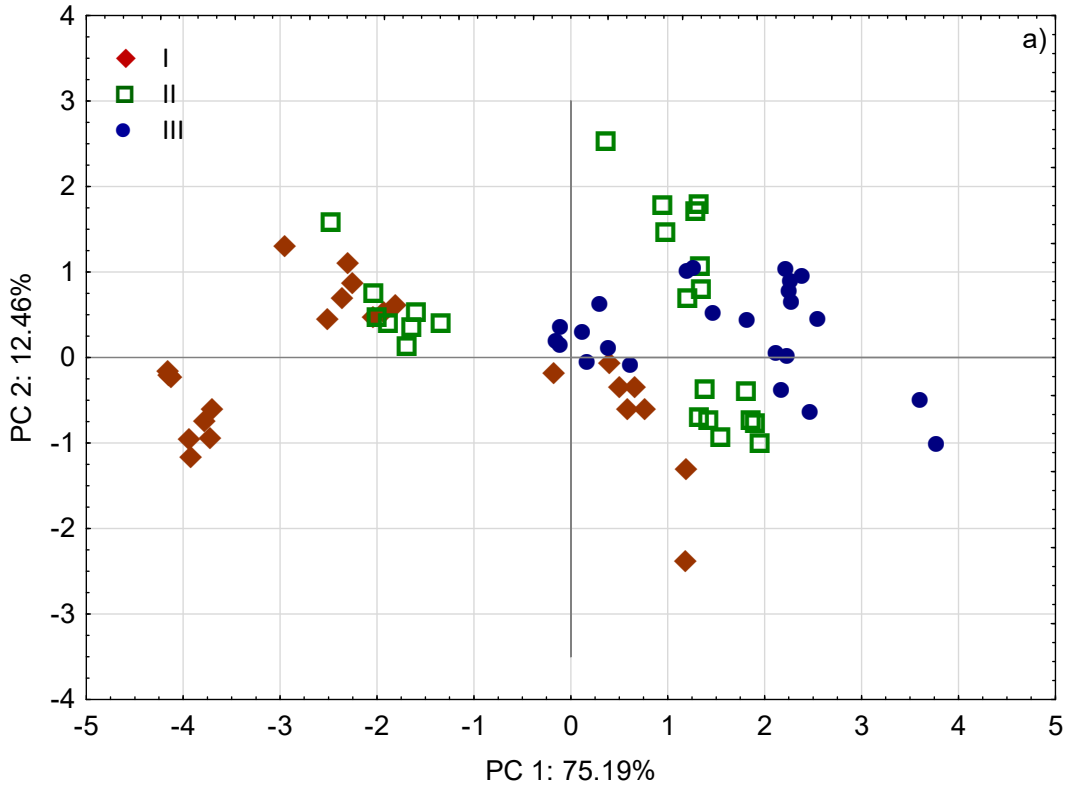
Slika 60 (a) Razdvajanje na osnovi trajanja i temperature skladištenja (nadzirano, LDA) maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2

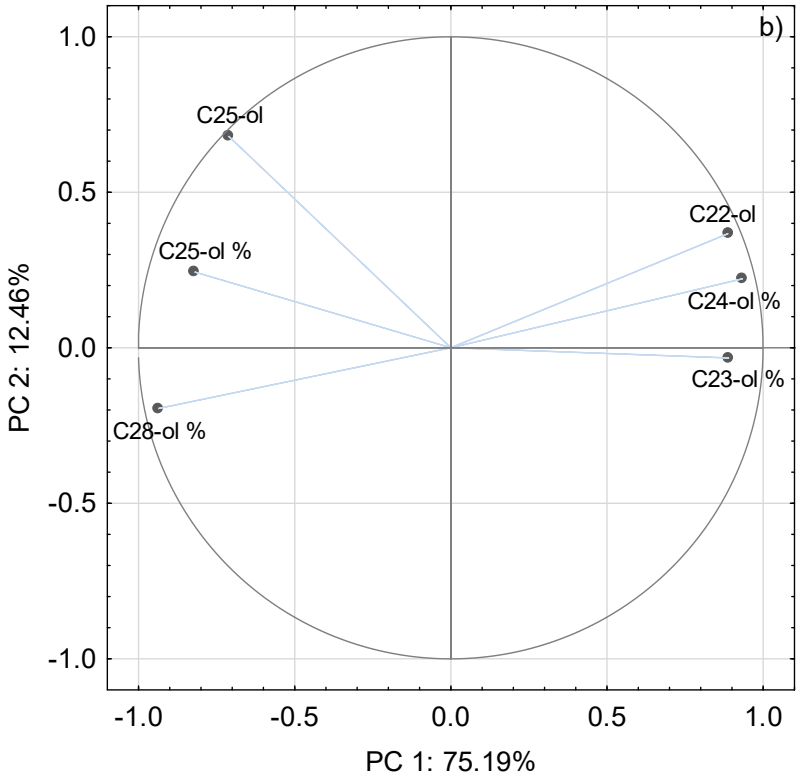


Slika 61 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nenadzirano, PCA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2

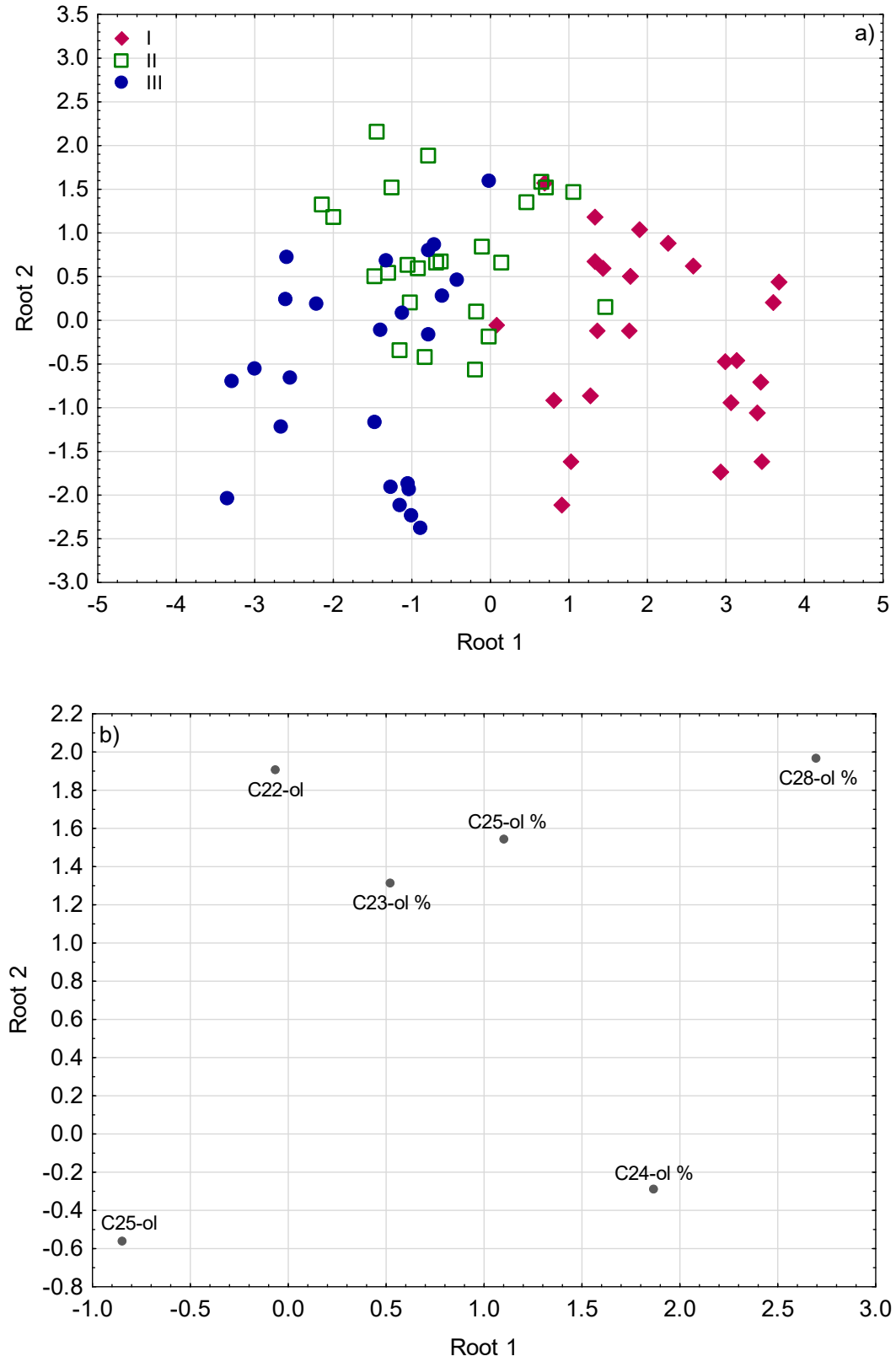


Slika 62 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nadzirano, LDA svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2





Slika 63 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nenadzirano, PCA svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 64 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nadzirano, LDA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija alifatskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2

4.8. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA TRITERPENSKE ALKOHOLE

Tablica 8 Utjecaj skladištenja maslinovog ulja pri različitim temperaturama na prosječne koncentracije (n=2) triterpenskih alkohola

Tretman	δ-amirin	obtusifoliol	β-amirin	butirospermol	gramisterol + cikloeukalenol	cikloartenol	24-metilen-cikloartenol	citrostadienol	UKUPNI 4-MONOMETIL-STEROLI	UKUPNI-4,4-DITMETIL STEROLI	UKUPNI TRI-TERPENSKI ALKOHOLI
	mg/100 g										
Buža I											
Mlado ulje	1,47	6,06	3,14	5,86 a	2,34	27,66	40,37	16,60	25,01	78,51 a	103,52
sobna *T* / 1g	1,61	6,33	2,29	5,13 b	2,56	24,83	35,56	14,84	23,73	69,43 b	93,16
T hlađ. / 1g	1,40	6,30	3,25	6,08 a	2,37	28,74	41,88	17,40	26,08	81,36 a	107,44
T zamrzav. / 1g	1,38	7,37	3,19	5,67 ab	2,22	26,61	38,76	15,80	25,39	75,61 ab	101,00
Buža II											
Mlado ulje	1,60 c	7,02 c	3,68 c	6,68 b	2,71 b	31,75	60,06	15,91 b	25,63 b	103,76	129,38 b
sobna *T* / 1g	1,71 a	8,63 b	4,22 ab	7,45 a	3,05 a	34,93	66,27	17,88 a	29,56 a	114,58	144,14 a
T hlađ. / 1g	1,67 b	8,75 b	4,15 b	7,17 a	2,90 ab	34,38	64,80	17,25 a	28,90 a	112,17	141,07 a
T zamrzav. / 1g	1,71 a	10,13 a	4,43 a	7,08 ab	2,80 b	33,99	63,89	16,87 ab	29,80 a	111,10	140,90 a
Buža III											
Mlado ulje	2,18	7,51	5,89	9,06	3,46	53,97	107,76	15,49 ab	26,46	178,86	205,32
sobna *T* / 1g	1,95	6,88	5,42	7,87	3,35	49,47	94,91	13,67 bc	23,90	159,62	183,52
T hlađ. / 1g	2,18	7,64	6,01	9,34	3,53	57,19	110,00	16,19 a	27,36	184,72	212,08
T zamrzav. / 1g	1,96	7,91	5,58	8,25	2,91	50,14	95,69	12,39 c	23,21	161,62	184,82
Črna I											
Mlado ulje	2,07 a	8,94 b	3,93 b	12,02	3,70	37,17	49,43 b	22,88	35,52	104,61 b	140,13
sobna *T* / 1g	1,80 b	8,71 b	3,58 c	11,52	3,95	37,37	62,40 a	21,41	34,07	116,66 a	150,73
T hlađ. / 1g	1,95 a	8,62 b	3,96 b	12,49	3,64	38,43	50,82 b	23,40	35,65	107,66 b	143,31
T zamrzav. / 1g	2,03 a	10,59 a	4,26 a	12,26	3,60	37,70	49,72 b	22,54	36,73	105,96 b	142,69
Črna II											
Mlado ulje	1,96	8,42	3,52	11,51	3,90	37,15	62,39 a	21,54	33,86	116,52 ab	150,38 ab

Tretman	δ-amirin	obtusifoliol	β-amirin	butirospermol	gramisterol + cikloeukalenol	cikloartenol	24-metilen-cikloartenol	citrostadienol	UKUPNI 4-MONOMETIL-STEROLI	UKUPNI-4,4-DITMETIL STEROLI	UKUPNI TRI-TERPENSKI ALKOHOLI
	mg/100 g										
sobna *T* / 1g	2,05	8,74	3,90	11,60	3,84	36,80	48,95 b	22,24	34,82	103,30 c	138,12 b
T hlađ. / 1g	2,02	9,40	3,91	12,13	4,08	40,22	66,79 a	22,76	36,24	125,06 a	161,30 a
T zamrzav. / 1g	1,92	9,11	3,70	10,89	3,86	36,74	61,59 a	21,29	34,25	114,85 b	149,10 ab
Črna III											
Mlado ulje	1,80	8,33 c	3,45	10,77	3,82	39,85	82,63	16,89	29,04	138,50	167,55
sobna *T* / 1g	1,87	9,30 b	3,72	10,74	4,03	41,00	84,95	17,29	30,63	142,26	172,89
T hlađ. / 1g	1,88	9,88 b	3,86	11,69	3,89	43,18	89,47	17,87	31,63	150,08	181,71
T zamrzav. / 1g	1,80	10,94 a	3,81	10,31	3,60	38,72	80,22	16,18	30,72	134,87	165,59
Rosinjola I											
Mlado ulje	2,02 b	7,32 c	5,12 b	11,92 b	2,08 ab	42,83 b	20,59 b	20,63 b	30,04 b	82,47 b	112,51 b
sobna *T* / 1g	2,01 b	8,35 b	5,52 a	12,82 a	2,27 a	46,96 a	22,93 a	22,71 a	33,34 a	90,23 a	123,57 a
T hlađ. / 1g	2,16 a	9,56 a	5,76 a	13,01 a	2,30 a	47,77 a	22,95 a	23,08 a	34,93 a	91,65 a	126,58 a
T zamrzav. / 1g	1,85 c	8,30 b	4,88 b	10,95 c	1,89 b	40,30 b	19,07 b	19,73 b	29,93 b	77,05 b	106,98 b
Rosinjola II											
Mlado ulje	1,77 ab	9,66 b	6,40 b	9,43 ab	5,49 ab	49,62 b	71,82 b	25,26 b	40,42 b	139,05 b	179,46 b
sobna *T* / 1g	1,80 a	11,40 a	6,95 a	9,96 a	5,84 a	53,07 a	76,36 a	27,56 a	44,80 a	148,15 a	192,95 a
T hlađ. / 1g	1,73 b	10,14 b	6,54 b	9,37 b	5,25 b	48,84 b	69,28 b	24,15 b	39,54 b	135,76 b	175,30 b
T zamrzav. / 1g	1,52 c	8,85 c	5,53 c	8,10 c	4,43 c	42,77 c	60,42 c	20,42 c	33,71 c	118,35 c	152,06 c
Rosinjola III											
Mlado ulje	1,69 b	7,76 c	6,81 b	9,35 b	4,15	64,44 ab	75,23 b	25,13 b	37,04 b	157,53 a	194,57 b
sobna *T* / 1g	1,81 a	9,89 a	7,19 a	10,37 a	5,43	60,70 bc	80,25 a	27,74 a	43,07 a	160,33 a	203,40 ab
T hlađ. / 1g	1,73 ab	9,48 a	7,36 a	9,82 b	4,38	67,58 a	78,88 ab	26,03 b	39,88 b	165,37 a	205,25 a
T zamrzav. / 1g	1,52 c	8,43 b	6,26 c	8,58 c	1,94	59,03 c	68,42 c	17,79 c	28,16 c	143,80 b	171,96 c

Statistički značajne razlike između različitih razina faktora skladištenje utvrđene su zasebno za svaki tretman sorta × stupanj zrelosti i obilježene su različitim slovima (LSD test, $p < 0,05$). Ukupni 4-monometil-steroli obuhvaćaju spojeve: obtusifoliol, gramisterol + cikloeukalenol, citrostadienol; Ukupni-4,4-ditmetil-steroli obuhvaćaj spojeve: δ-amirin, β-amirin, butirospermol, cikloartenol, 24-metilen-cikloartenol

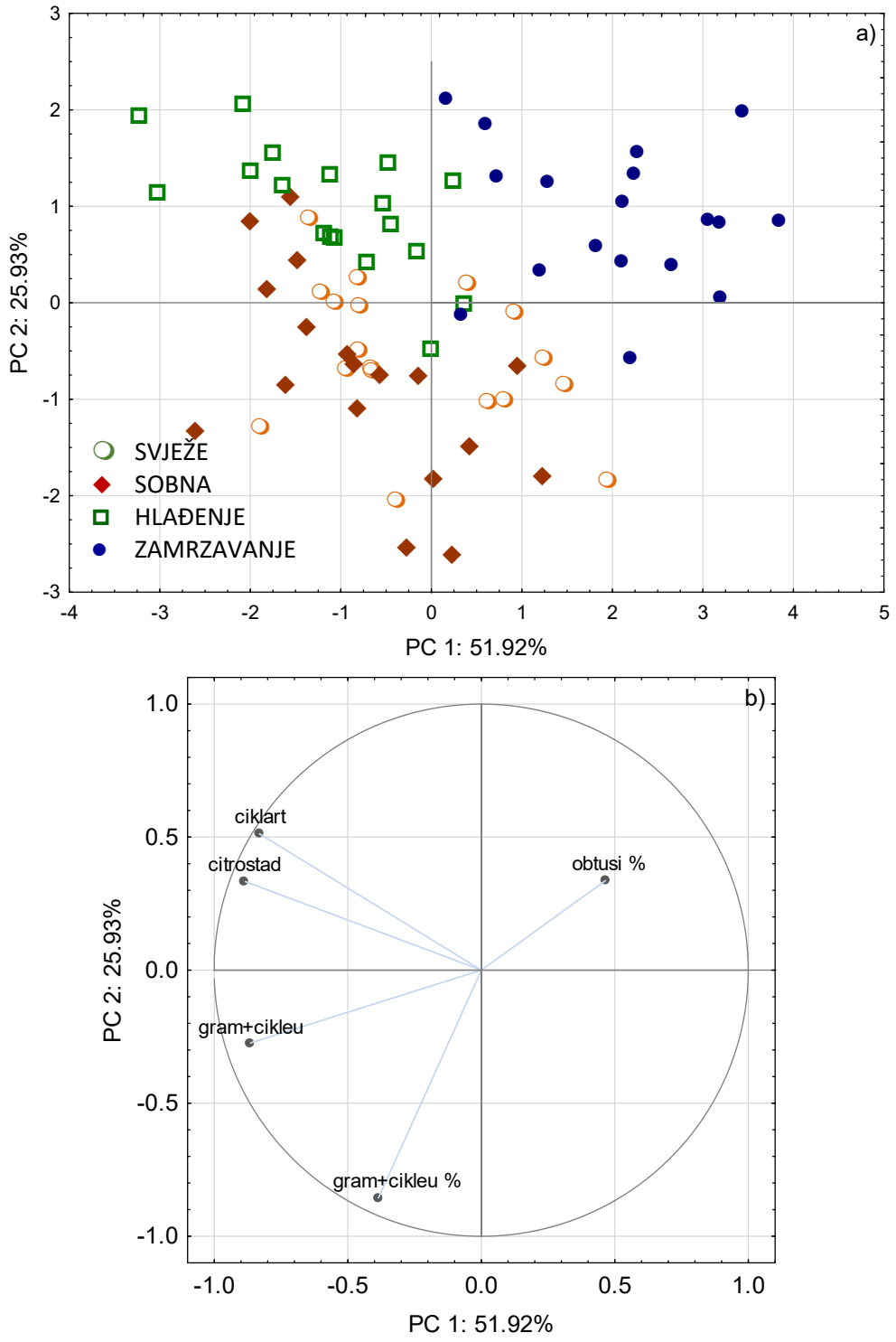
Tablica 9 Utjecaj skladištenja maslinovog ulja pri različitim temperaturama na relativne udjele triterpenskih alkohola

Tretman	δ-amirin	obtusifoliol	β-amirin	butirospermol	gramisterol + cikloeukalenol	cikloartenol	24-metilen-cikloartenol	citrostadienol	UKUPNI 4-MONOMETIL-STEROLI	UKUPNI 4,4-DITMETIL STEROLI
					%					
Buža I										
Mlado ulje	1,42	5,87	3,03	5,66	2,27 b	26,72	38,99	16,04	24,17	75,83
sobna *T* / 1g	1,73	6,78	2,47	5,51	2,75 a	26,66	38,18	15,92	25,45	74,55
T hlađ. / 1g	1,30	5,87	3,03	5,66	2,21 b	26,75	38,98	16,20	24,28	75,72
T zamrzav. / 1g	1,36	7,30	3,16	5,61	2,20 b	26,35	38,37	15,64	25,14	74,86
Buža II										
Mlado ulje	1,23	5,42 c	2,85 b	5,16	2,09	24,54 a	46,42 a	12,29 a	19,81 c	80,19 a
sobna *T* / 1g	1,19	5,99 c	2,93 b	5,17	2,12	24,23 c	45,98 ab	12,41 a	20,51 b	79,49 b
T hlađ. / 1g	1,19	6,20 b	2,94 b	5,08	2,06	24,37 b	45,94 ab	12,23 ab	20,49 b	79,51 b
T zamrzav. / 1g	1,21	7,19 a	3,14 a	5,03	1,99	24,12 c	45,34 b	11,97 b	21,15 a	78,85 c
Buža III										
Mlado ulje	1,06	3,65 b	2,87	4,41	1,69 b	26,29	52,48	7,54 ab	12,88 a	87,12 b
sobna *T* / 1g	1,06	3,75 b	2,95	4,29	1,83 a	26,95	51,72	7,45 b	13,02 a	86,98 b
T hlađ. / 1g	1,03	3,60 b	2,83	4,41	1,66 b	26,97	51,87	7,63 a	12,90 a	87,10 b
T zamrzav. / 1g	1,06	4,28 a	3,02	4,46	1,57 c	27,13	51,77	6,70 c	12,56 b	87,44 a
Črna I										
Mlado ulje	1,47 a	6,38 b	2,80 b	8,57 a	2,64 a	26,53 b	35,28 b	16,33 a	25,35 b	74,65 c
sobna *T* / 1g	1,19 c	5,78 c	2,38 c	7,65 b	2,62 a	24,79 c	41,39 a	14,20 c	22,60 d	77,40 a
T hlađ. / 1g	1,36 b	6,01 c	2,76 b	8,72 a	2,54 b	26,82 a	35,46 b	16,33 a	24,88 c	75,12 b
T zamrzav. / 1g	1,42 ab	7,42 a	2,98 a	8,59 a	2,52 b	26,42 b	34,85 c	15,80 b	25,74 a	74,26 d
Črna II										
Mlado ulje	1,30 b	5,60 d	2,34 c	7,65 b	2,59 b	24,70 bc	41,49 a	14,32 b	22,51 c	77,49 a
sobna *T* / 1g	1,49 a	6,33 a	2,83 a	8,40 a	2,78 a	26,64 a	35,44 b	16,10 a	25,21 a	74,79 c
T hlađ. / 1g	1,25 b	5,83 c	2,42 b	7,52 b	2,53 b	24,93 b	41,40 a	14,11 b	22,46 c	77,54 a

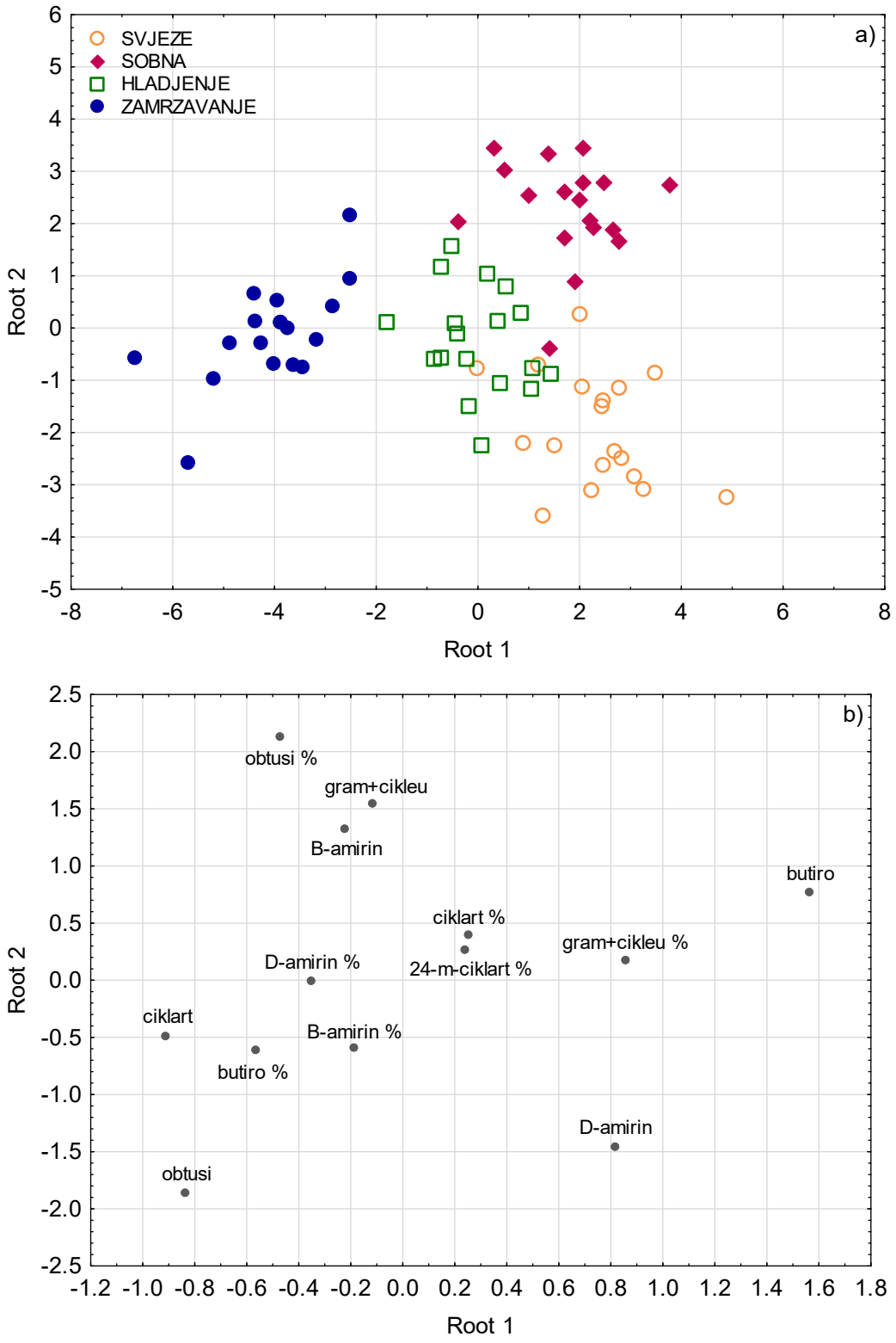
Tretman	δ-amirin	obtusifoliol	β-amirin	butirospermol	gramisterol + cikloeukalenol	cikloartenol	24-metilen-cikloartenol	citrostadienol	UKUPNI 4-MONOMETIL-STEROLI	UKUPNI-4,4-DITMETIL STEROLI
T zamrzav. / 1g	1,29 b	6,11 b	2,48 b	7,30 b	2,59 b	24,64 c	41,31 a	14,28 b	22,97 b	77,03 b
Črna III										
Mlado ulje	1,07	4,97 d	2,06 b	6,43	2,28 a	23,79	49,32 a	10,08 a	17,33 c	82,67 a
sobna *T* / 1g	1,08	5,38 c	2,15 b	6,21	2,33 a	23,71	49,14 a	10,00 ab	17,72 b	82,28 b
T hlađ. / 1g	1,03	5,44 b	2,12 b	6,43	2,14 b	23,76	49,24 a	9,83 bc	17,41 c	82,59 a
T zamrzav. / 1g	1,09	6,61 a	2,30 a	6,23	2,17 b	23,39	48,45 b	9,77 c	18,55 a	81,45 c
Rosinjola I										
Mlado ulje	1,79 a	6,51 c	4,55	10,59 a	1,85	38,07	18,30 b	18,34	26,70 b	73,30 a
sobna *T* / 1g	1,63 c	6,76 b	4,47	10,37 ab	1,84	38,00	18,55 a	18,38	26,98 b	73,02 a
T hlađ. / 1g	1,71 b	7,55 a	4,55	10,28 b	1,81	37,74	18,13 c	18,23	27,60 a	72,40 b
T zamrzav. / 1g	1,73 ab	7,76 a	4,57	10,24 c	1,77	37,67	17,82 d	18,45	27,97 a	72,03 b
Rosinjola II										
Mlado ulje	0,99	5,38 b	3,57	5,25	3,06 a	27,65 b	40,02	14,07 a	22,52 b	77,48 b
sobna *T* / 1g	0,93	5,91 a	3,60	5,16	3,03 a	27,51 b	39,58	14,28 a	23,22 a	76,78 c
T hlađ. / 1g	0,99	5,79 a	3,73	5,35	3,00 a	27,86 ab	39,51	13,77 ab	22,55 b	77,45 b
T zamrzav. / 1g	1,00	5,82 a	3,64	5,33	2,91 b	28,13 a	39,74	13,43 b	22,17 c	77,83 a
Rosinjola III										
Mlado ulje	0,87	3,99 c	3,50 c	4,81 b	2,13	33,12 b	38,66 bc	12,92 b	19,04 b	80,96 b
sobna *T* / 1g	0,89	4,86 a	3,54 bc	5,10 a	2,67	29,84 c	39,46 ab	13,64 a	21,17 a	78,83 c
T hlađ. / 1g	0,84	4,62 b	3,59 ab	4,78 b	2,13	32,92 b	38,43 c	12,68 b	19,43 ab	80,57 bc
T zamrzav. / 1g	0,88	4,90 a	3,64 a	4,99 a	1,14	34,32 a	39,78 a	10,35 c	16,39 c	83,61 a

Statistički značajne razlike između različitih razina faktora skladištenje utvrđene su zasebno za svaki tretman sorta × stupanj zrelosti i obilježene su različitim slovima (LSD test, $p < 0,05$). Ukupni 4-monometil-steroli obuhvaćaju spojeve: obtusifoliol, gramisterol + cikloeukalenol, citrostadienol; Ukupni-4,4-ditmetil-steroli obuhvaćaj spojeve: δ-amirin, β-amirin, butirospermol, cikloartenol, 24-metilen-cikloartenol

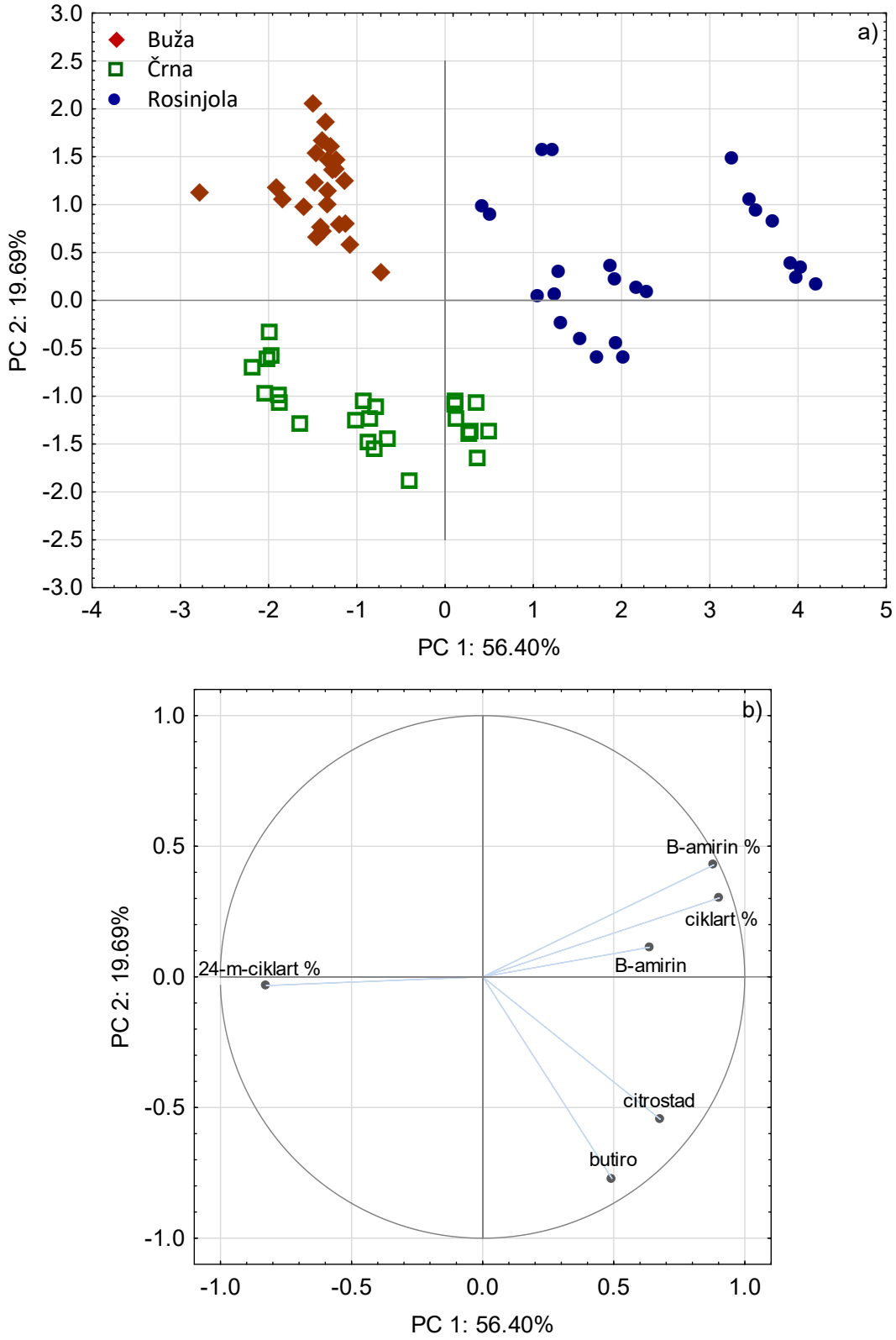
4.9. POSTOJANOST TRITERPENSKIH ALKOHOLA KAO POKAZATELJA SORTE I STUPNJA ZRELOSTI



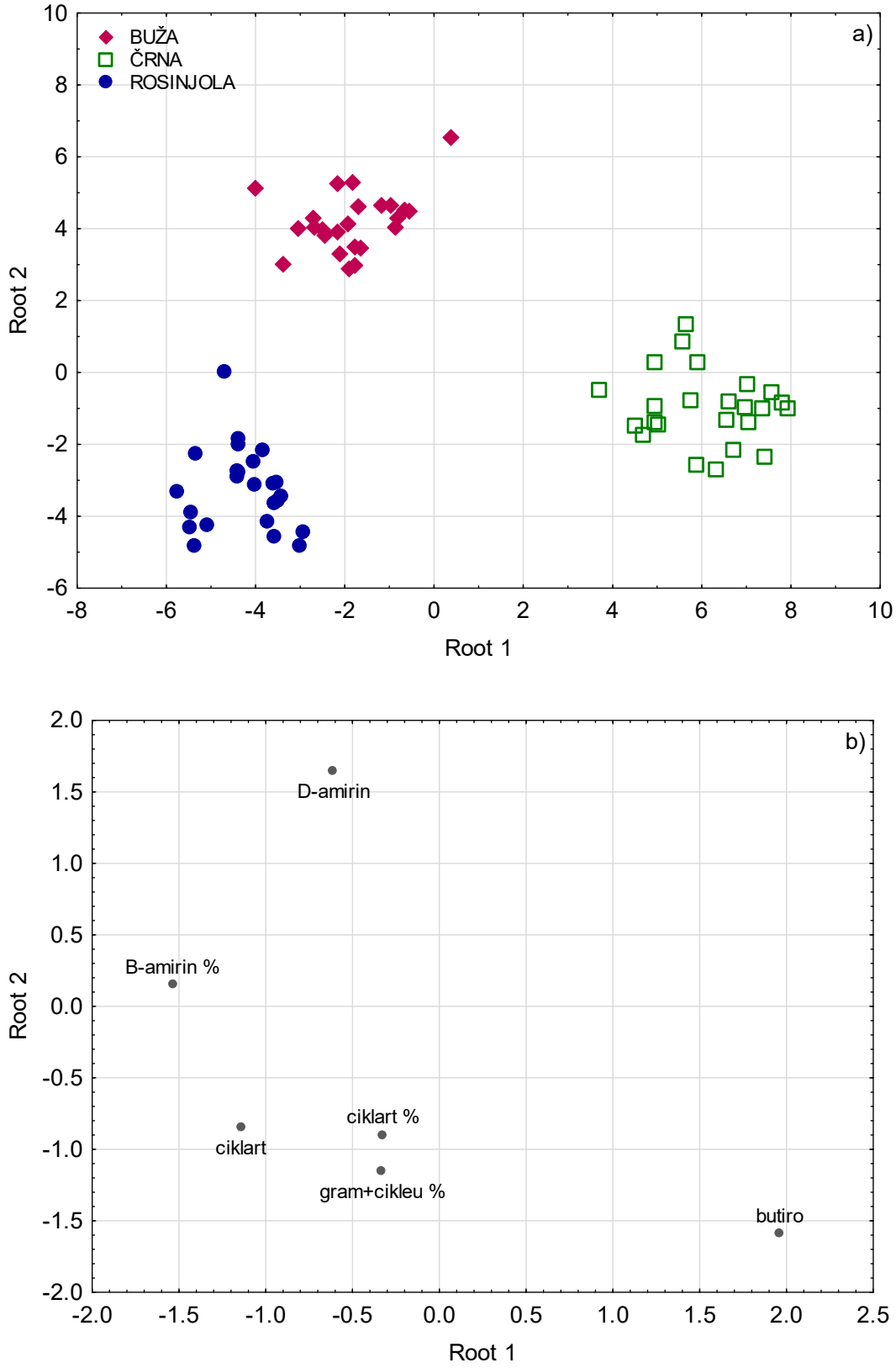
Slika 65 (a) Razdvajanje na osnovi trajanja i temperature skladištenja (nenadzirano, PCA) maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



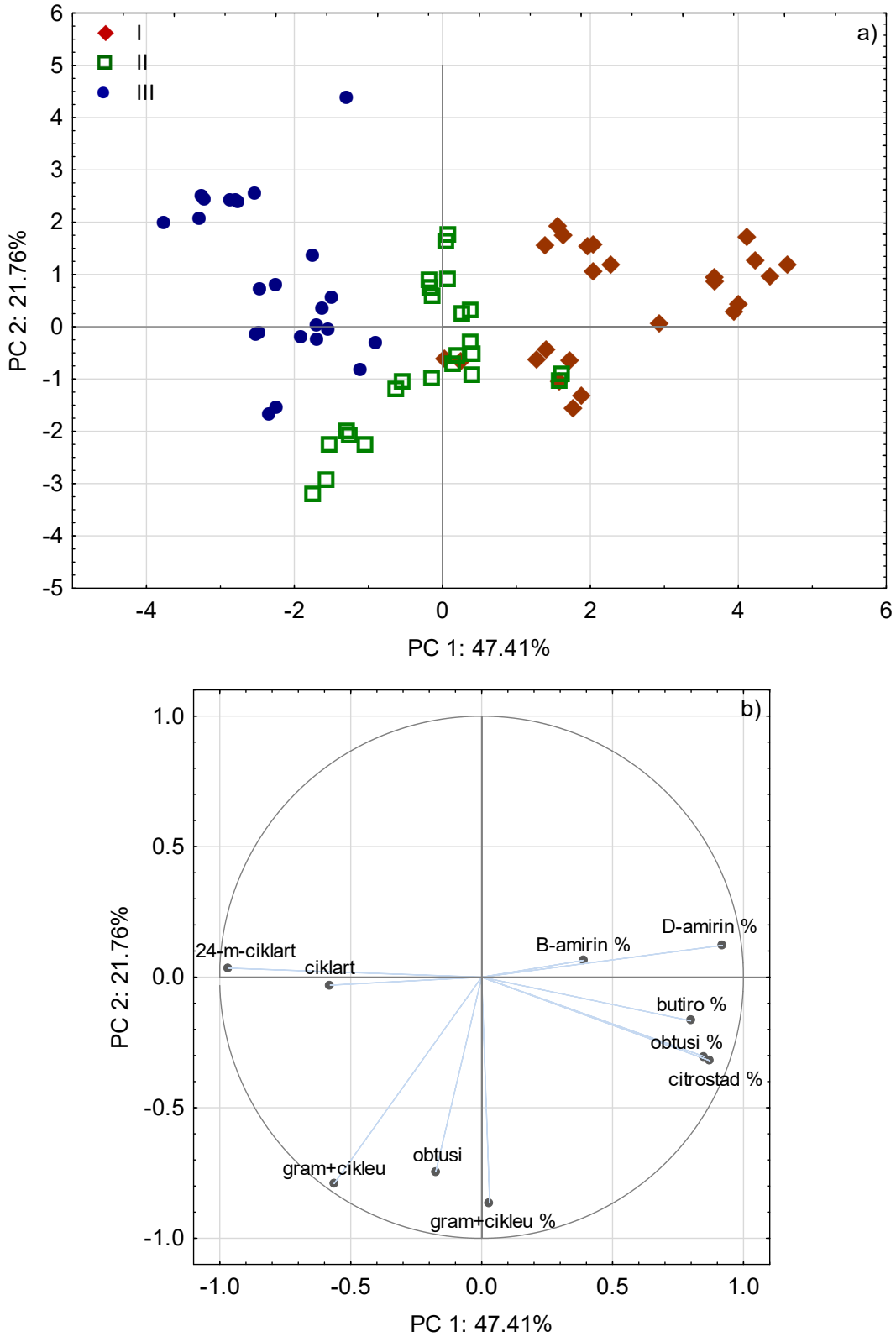
Slika 66 (a) Razdvajanje na osnovi skladištenja (nadzirano, LDA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2



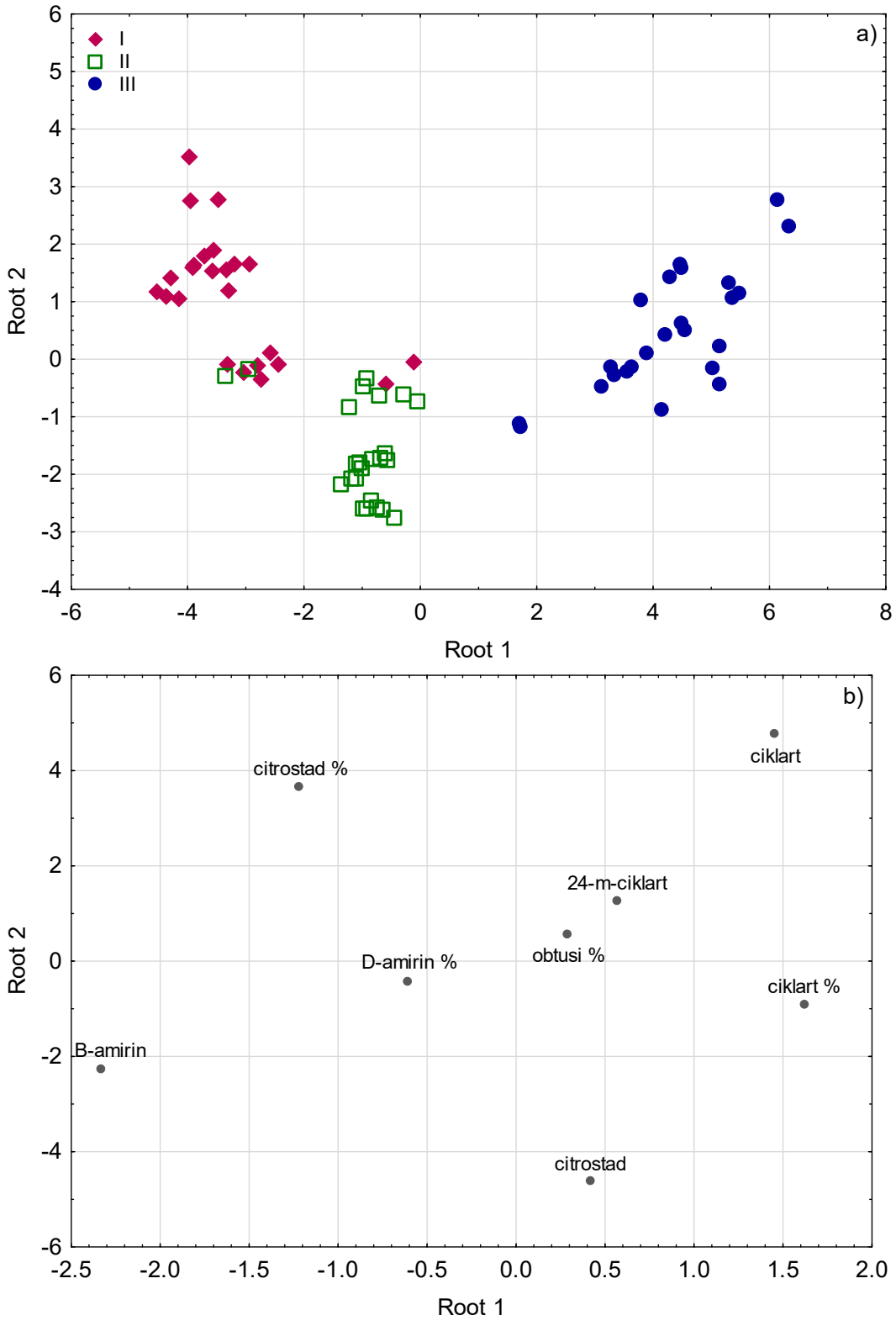
Slika 67 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nenadzirano, PCA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 68 (a) Razdvajanje na osnovi sorte (nadzirano, LDA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2



Slika 69 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nenadzirano, PCA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s glavnim sastavnicama PC1 i PC2; **(b)** Projekcija faktorskih opterećenja odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova PC 1 i PC 2



Slika 70 (a) Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti (nadzirano, LDA) svježih i skladištenih maslinovih ulja dobivenih od maslina triju sorti ubranih u tri stupnja zrelosti u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (Root 1 i Root 2); **(b)** Projekcija standardiziranih koeficijenata odabranih varijabli (koncentracija triterpenskih alkohola u mg/kg, odnosno njihovih relativnih udjela označenih s „%") uzduž smjerova Root 1 i Root 2

5. RASPRAVA

5.1. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA SASTAV STEROLA I TRITERPENSKIH DIOLA U SVJEŽIM ULJIMA

U istraživanim maslinovim uljima hrvatskih sorti Buža, Črna i Rosinjola proizvedenim od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti identificirano je 14 sterola i to redom kolesterol, 24-metilen-kolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ^7-kampesterol, $\Delta^{5,23}$-stigmastadienol, klerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ^5-avenasterol, $\Delta^{5,24}$-stigmastadienol, Δ^7-stigmastenol i Δ^7-avenasterol, te dva triterpenska diola, eritrodiol i uvaol. Brasikasterol nije identificiran ni u jednom uzorku. Međusobni odnosi koncentracija i relativnih udjela pojedinačnih sterola i triterpenskih diola odgovarali su odredbama Uredbe Europske komisije (EK, 2019.) i podacima iz literature o njihovom sastavu u djevičanskom maslinovom ulju (Sánchez Casas i sur., 2004.; Koutsafakis i sur., 1999.). Sterol pronađen u najvišoj koncentraciji u svim uljima uključenim u istraživanje bio je β-sitosterol, nakon njega najvišu koncentraciju imao je Δ^5-avenasterol te zatim, redom, kampesterol, stigmasterol i klerosterol (**Tablica 5**).

Svi uzorci ulja uključenih u istraživanje ispunjavali su sljedeće zahtjeve Uredbe Europske komisije (EK, 2019.) (**Tablica 1**): koncentracija ukupnih sterola bila je viša od 100 mg/100 g, relativni udio kolesterola bio je niži od 0,5 %, relativni udio brasikasterola, koji nije identificiran, bio je niži od 0,1 %, a relativni udio kampesterola bio je niži od 4,0 %. Relativni udio stigmasterola bio je niži od udjela kampesterola te je zbroj relativnih udjela eritrodiola i uvaola bio niži od 4,5 %. Međutim, udio ukupnog β-sitosterola u pojedinim uzorcima sorte Rosinjola iz srednjeg (II) i kasnijeg stupnja zrelosti (III) nije dosegao potrebnu minimalnu vrijednost od 93 % propisanu Uredbom (EK, 2019.) (**Slika 21; Tablica 6**), dok je udio Δ^7-stigmastenola u pojedinim uzorcima iste sorte bio viši od propisanog maksimuma od 0,5 % (**Slika 17; Tablica 6**). O spomenutim odstupanjima raspravljeno je u sljedećim odlomcima.

Prosječne koncentracije (mg/100 g ulja) i relativni udjeli (%) sterola i triterpenskih diola u maslinovim uljima hrvatskih sorti Buža, Črna i Rosinjola proizvedenim od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I, II i III) prikazani su na **Slikama 5 – 22**. Jednosmjernom analizom varijance koja je provedena odvojeno za dva istraživana faktora, sortu i stupanj zrelosti, utvrđene su statistički značajne razlike između prosječnih koncentracija i relativnih udjela većine identificiranih sterola i triterpenskih diola u uzorcima iste sorte različitih stupnjeva zrelosti (označene malim slovima odvojeno za svaku pojedinu sortu), kao i u uzorcima različitih sorti istog stupnja zrelosti (označene velikim slovima odvojeno za svaki pojedini stupanj zrelosti). Iako su za neke spojeve iz ove skupine utvrđeni ponavljajući obrasci razlika na osnovi jednog faktora neovisni o utjecaju drugog faktora, uočene su i interakcije, odnosno različiti utjecaji jednog faktora na različitim razinama drugog faktora.

Za koncentraciju kolesterola nisu utvrđene statističke razlike ni u odnosu na sortu ni u odnosu na stupanj zrelosti, dok je relativni udio tog sterola bio niži u uzorcima sorte Črna ranijeg (I) i srednjeg stupnja zrelosti (II) u odnosu na ekvivalentne uzorke druge dvije sorte (**Slika 5**). U prethodnim istraživanjima uglavnom je utvrđeno da je razina kolesterola relativno konstantna tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja (Rivera del Álamo i sur., 2004.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Yorulmaz i sur., 2013.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.). Objavljene su i studije u kojima je utvrđen stalni porast (Sönmez i sur., 2018.) ili sniženje koncentracije i/ili relativnog udjela tijekom dozrijevanja (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Chtourou i sur., 2017.), dok postoje i rezultati koji su pokazali porast u ranijoj pa sniženje razine kolesterola u kasnijoj fazi dozrijevanja (Sönmez i sur., 2018.).

Najviše koncentracije 24-metilen-kolesterola pronađene su u uljima sorte Črna sva tri stupnja zrelosti (**Slika 6**). Ulja Buže ranijeg stupnja zrelosti (I) sadržavala su višu koncentraciju nego ekvivalentna ulja Rosinjole, dok je kod ulja kasnijeg stupnja zrelosti (III) utvrđeno obrnuto. Najviši relativni udjeli tog sterola pronađeni su također uglavnom u uljima Črne, s tom razlikom da se ta ulja nisu razlikovala od ulja Buže srednjeg stupnja zrelosti (II), dok među uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) sve tri sorte nije bilo značajne razlike. Ulja Buže ranijeg stupnja zrelosti (I) bila su karakterizirana višim relativnim udjelom 24-metilen-kolesterola u odnosu na ulja Rosinjole proizvedena od maslina ekvivalentne zrelosti. Koncentracija i relativni udio 24-metilen-kolesterola povisili su se u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I) kod svih sorti. Dok se u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) koncentracije više nisu značajnije mijenjale s izuzetkom ulja Buže u kojem je čak zabilježeno i blago sniženje, relativni udjeli dodatno su se povisili kod sorti Črna i Rosinjola, a kod Buže snizili. U većini prethodnih istraživanja zabilježena je prilično stabilna razina 24-metilenkolesterola u različitim fazama zrelosti (Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Lazzez i sur., 2008.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmazi sur., 2013.), iako su utvrđeni i obrasci slični onima u ovom istraživanju, s porastom koncentracija tijekom većeg dijela razdoblja dozrijevanja (Sánchez Casas i sur., 2004.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.).

Najviša koncentracija kampesterola u uljima prva dva stupnja zrelosti (I i II) utvrđena je kod sorte Rosinjola, dok je među uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) Črna bila najbogatija tim sterolom (**Slika 7**). Ulja Buže sadržavala su najnižu koncentraciju u sva tri stadija zrelosti. Relativni udio kampesterola bio je najviši u uljima Rosinjole, a najniži u uljima Črne u sva tri stupnja zrelosti. Što se tiče promjena tijekom dozrijevanja, kod sve tri sorte zabilježen je porast koncentracije u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I), nakon čega je uslijedilo sniženje koncentracije u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III). Za relativne udjele slično je utvrđeno kod ulja Buže i kod ulja Rosinjole iako bez statistički značajne razlike između ulja ranijeg (I) i srednjeg stupnja zrelosti (II) kod posljednje spomenute sorte, dok je kod ulja Črne zabilježen obrnuti obrazac sa sniženjem relativnog udjela kampesterola u ulju srednjeg (II) i

naknadnim povišenjem u ulju kasnijeg stupnja zrelosti (III). U prethodnim istraživanjima razina kampesterola bila je konstantna ili varijabilna tijekom dozrijevanja (Gutiérrez i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Matos i sur., 2007.; Boulkroune i sur., 2017.; Ajana i El Antari, 1998.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmazi sur., 2013.), dok je u nekoliko slučajeva utvrđen i porast njegove razine u različitim razdobljima (Guillaume i sur., 2012.; Vekiari i sur., 2010.; Boulkroune i sur., 2017.). Sniženje koncentracije ili relativnog udjela kampesterola češće je zabilježeno u drugoj polovici ciklusa dozrijevanja (Koutsaftakis i sur., 1999.; Vekiari i sur., 2010.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.; Yorulmaz i sur., 2013.), što je utvrđeno i u ovom istraživanju (**Slika 7**).

Razlike između relativnih udjela kampestanola utvrđene su samo u uljima ranijeg (I) i kasnijeg stupnja zrelosti (III) te je najniži udio u oba slučaja pronađen u uljima sorte Črna (**Slika 8**). U uljima ranijeg stupnja zrelosti (I) najviši udio pronađen je u ulju Rosinjole, a u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) nije utvrđena značajna razlika između udjela kampestanola u uljima Buže i Rosinjole. Značajne promjene tijekom dozrijevanja utvrđene su samo u uljima Črne, sa zabilježenim sniženjem koncentracije i relativnog udjela u srednjem (II) u odnosu na raniji stupanj zrelosti (I) te bez naknadnih promjena u ulju kasnijeg stupnja zrelosti (III). Promjene u razini kampestanola tijekom dozrijevanja zabilježene u ranijim istraživanjima također su bile raznolike te su zabilježeni i porast (Boulkroune i sur., 2017.) i sniženje (Yorulmaz i Konuskan, 2017.), kao i relativno stabilne vrijednosti tijekom cijelog ciklusa (Sánchez Casas i sur., 2004.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Boulkroune i sur., 2017.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmaz i sur., 2013.).

Koncentracija stigmasterola bila je najviša u uljima od sorte Rosinjola, osim u ranijem stupnju zrelosti (I) kada je najvišu koncentraciju sadržavalo ulje Črne (**Slika 9**). Najniža koncentracija pronađena je u uljima Buže, osim u kasnijem stupnju zrelosti (III) kada je najniža koncentracija pronađena u ulju Črne. U sva tri stupnja zrelosti najviši relativni udio stigmasterola pronađen je u uljima Rosinjole. Najniži udio u srednjem (II) i kasnijem stupnju zrelosti (III) sadržavalo je ulje Črne. Promjene koncentracije i relativnog udjela stigmasterola tijekom dozrijevanja bile su značajne te je zabilježen porast u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I) kod sve tri sorte. Kod ulja sorte Rosinjola ta promjena bila je iznimno izražena. Porast koncentracije i relativnog udjela stigmasterola nastavio se i u uljima trećeg stupnja zrelosti (III) Buže i nešto manje Črne, dok je kod Rosinjole zabilježeno sniženje. Porast koncentracije ili relativnog udjela stigmasterola u maslinovom ulju u određenim fazama dozrijevanja utvrđen je i u prethodnim istraživanjima (Guillaume i sur., 2012.; Boulkroune i sur., 2017.; Sönmez i sur., 2018.), iako su zabilježeni i drugačiji obrasci promjena, sa sniženjem (Koutsaftakis i sur., 1999.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Chtourou i sur., 2017.) ili relativno konstantnim, odnosno

neravnomjerno fluktuirajućim razinama (Gutiérrez i sur., 1999.; Yorulmazi sur., 2013.; Kaliora i sur., 2013.; Boulkroune i sur., 2017.; Taticchi i sur., 2019.).

U ranijem stupnju zrelosti (I) koncentracija Δ^7-kampesterola bila je najviša u ulju sorte Črna, a njegov relativni udio u ulju sorte Buža (**Slika 10**). Ulja sorte Rosnjola sadržavala su najvišu koncentraciju i relativni udio u srednjem stupnju zrelosti (II), dok kod kasnijeg stupnja zrelosti (III) nije bilo značajnih razlika između sorti. Promjene kod dozrijevanja zabilježene su samo kod ulja Rosinjole, u kojima je zabilježen porast u srednjem (II) u odnosu na raniji stupanj zrelosti (I), nakon čega je uslijedilo sniženje u ulju kasnijeg stupnja zrelosti (III). Za Δ^7-kampesterol su također utvrđeni različiti obrasci promjena tijekom dozrijevanja (Guillaume i sur., 2012.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Chtourou i sur., 2017.).

Razlika u koncentraciji i relativnom udjelu $\Delta^{5,23}$-stigmastadienola utvrđena je samo između ulja od maslina srednjeg stupnja zrelosti (II), s izraženo višim vrijednostima u uljima od sorte Rosinjola (**Slika 11**). Promjene u dozrijevanju zabilježene su jedino kod te sorte, s već spomenutim izraženo povišenim vrijednostima koncentracije i relativnog udjela u ulju srednjeg stupnja zrelosti (II), dok su razlike između ulja ranijeg (I) i kasnijeg stupnja zrelosti (III) bile uglavnom male. U literaturi gotovo da i nema podataka o promjenama koncentracije ili relativnog udjela $\Delta^{5,23}$-stigmastadienola u uljima od maslina ubranih u različitim stupnjevima zrelosti. Guillaume i suradnici (2012.) zabilježili su sniženje pa porast relativnog udjela ovog spoja tijekom dozrijevanja, što je bio obrazac suprotan od onog utvrđenog kod sorte Rosinjola u ovom istraživanju.

U odnosu na većinu identificiranih sterola i triterpenskih diola, utjecaj sortnog podrijetla na koncentraciju i relativni udio klerosterola nije bio izražen. Razlike između sorti utvrđene su jedino u uljima ranijeg (I) i kasnijeg stupnja zrelosti (III), gdje su ulja Črne sadržavala najviše, a ulja Buže najniže koncentracije (**Slika 12**). Ulje Rosinjole srednjeg stupnja zrelosti (II) sadržavalo je višu koncentraciju nego ulje iste sorte ranijeg stupnja zrelosti (I). Većina dosadašnjih studija utvrdila je slične, relativno male i nekonzistentne promjene u razinama klerosterola tijekom dozrijevanja (Sánchez Casas i sur., 2004.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Boulkroune i sur., 2017.; Lazzez i sur., 2008.; Taticchi i sur., 2019.; Yorulmazi sur., 2013.), iako su zabilježeni i drugačiji slučajevi poput porasta (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.) te sniženja koncentracije ili relativnog udjela u ranijoj fazi dozrijevanja (Koutsaftakis i sur., 1999.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Chtourou i sur., 2017.).

Koncentracija najzastupljenijeg sterola u istraživanim uzorcima, a i maslinovim uljima općenito, β-sitosterola, bila je najviša u uljima sorte Črna, a najniža u uljima Buže u sva tri stupnja zrelosti (**Slika 13**). S druge strane, ulje Rosinjole ranijeg stupnja zrelosti (I) sadržavalo je najviši, a

ekvivalentno ulje Črne najniži relativni udio β-sitosterola. Kod ulja srednjeg (II) i kasnijeg stupnja zrelosti (III), najviši relativni udio zabilježen je u uljima sorte Črna, a najniži u uljima sorte Rosinjola. Tijekom dozrijevanja vrlo sličan obrazac zabilježen je kod sve tri sorte, s povišenjem koncentracije u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I), nakon čega je uslijedilo sniženje koncentracije u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III). Obrnuto od toga, kod sve tri sorte zabilježeno je sniženje relativnog udjela β-sitosterola u prvoj fazi dozrijevanja, koje je kod sorte Buža nastavljeno i u ulju kasnijeg stupnja zrelosti (III). Različiti autori utvrdili su porast koncentracije β-sitosterola u ranijoj fazi razvoja ploda masline (Vekiari i sur., 2010.; Yorulmazi sur., 2013.; Wang i sur., 2021.) koji nije nastavljen do kraja praćenog razdoblja dozrijevanja, kada je ustanovljena stabilizacija (Yorulmazi sur., 2013.) ili njeno sniženje (Vekiari i sur., 2010.; Wang i sur., 2021.). Chtourou i sur. (2017) zabilježili su i obrnutu dinamiku sa sniženjem nakon čega je uslijedio porast, dok su u drugim studijama utvrđene neujednačene fluktuacije koncentracije tog sterola (Matos i sur., 2007.; Boulkroune i sur., 2017.; Lazzez i sur., 2008.; Kaliora i sur., 2013.). Opadanje relativnog udjela β-sitosterola tijekom dijela ili kroz cijelo razdoblje dozrijevanja kakvo je uglavnom utvrđeno u ovom istraživanju zabilježeno je u brojnim studijama (Koutsaftakis i sur., 1999.; Guillaume i sur., 2012.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.), dok su drugi autori izvijestili o relativno konstantnim ili neujednačenim promjenama njegovog relativnog udjela (Gutiérrez i sur., 1999.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Taticchi i sur., 2019.; Salvador i sur., 2001., Lazzez i sur., 2008.). Za sorte Picholine (Ajana i El Antari, 1998.), Halhalı (Yorulmaz i Konuskan, 2017.) i Ayvalik (Wang i sur., 2021.) utvrđeno je konstantno sniženje koncentracija u cijelom razdoblju dozrijevanja.

Ulje Črne sadržavalo je najvišu koncentraciju sitostanola u ranijem (I) i srednjem stupnju zrelosti (II) (**Slika 14**). Najniža koncentracija u srednjem stupnju zrelosti (II) pronađena je u ulju Buže, dok između ulja različitih sorti kasnijeg stupnja zrelosti (III) nije bilo značajnih razlika. Među uljima različitih sorti nisu zabilježene razlike u relativnim udjelima. Koncentracija i relativni udio sitostanola u uljima Črne te njegova koncentracija u uljima Rosinjole bili su niži u uljima kasnijeg (III) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I). Promjene razine sitostanola tijekom dozrijevanja u većini prijašnjih studija bile su obilježene postojanom razinom (Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Lazzez i sur., 2008.; Yorulmazi sur., 2013.) ili sniženjem koncentracije ili relativnog udjela (Koutsaftakis i sur., 1999.; Guillaume i sur., 2012.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.), dok je povišenje zabilježeno rijetko (Vekiari i sur., 2010.).

U sva tri stupnja zrelosti najvišu koncentraciju Δ^5-avenasterola sadržavalo je ulje Črne, a najnižu ulje Buže (**Slika 15**). Među uljima ranijeg stupnja zrelosti (I) najviši relativni udio pronađen je u ulju Črne, a među uljima srednjeg stupnja zrelosti (II) u uljima Buže. Na obje spomenute razine ulje Rosinjole sadržavalo je najniži udio. Međutim, u uljima od zrelih plodova

(III) ulje Rosinjole sadržavalo je najviši relativni udio, dok je najniži udio pronađen u ulju Črne. Kod svih sorti koncentracija i relativni udio Δ^5-avenasterola porasli su u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I). U uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) Buže i Črne zabilježeno je blago sniženje koncentracije, dok je u ekvivalentnom ulju Rosinjole (III) utvrđen daljnji porast koncentracije u odnosu na ulje srednjeg stupnja zrelosti (II). Daljnji porast u posljednjoj fazi dozrijevanja (III) utvrđen je i za relativni udio Δ^5-avenasterola, osim kod ulja sorte Črna gdje nije bilo promjene u odnosu na ulja srednjeg stupnja zrelosti (II). Prvi dio ciklusa dozrijevanja u većini je prethodnih studija također bio obilježen porastom razine Δ^5-avenasterola (Ajana i El Antari, 1998.; Koutsaftakis i sur., 1999.; Gutiérrez i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Matos i sur., 2007.; Vekiari i sur., 2010.; Guillaume i sur., 2012.; Yorulmazi sur., 2013.; Fernández-Cuesta i sur., 2013.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Boulkroune i sur., 2017.; Sönmez i sur., 2018.), dok je sniženje bilježeno rijetko (Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.). U nekoliko studija uočeno je povećanje razine Δ^5-avenasterola i u drugoj fazi dozrijevanja (Ajana i El Antari, 1998.; Koutsaftakis i sur., 1999.; Gutiérrez i sur., 1999.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.). Kao i u slučaju β-sitosterola i nekih drugih sterola, u nekoliko studija zabilježena je promjena dinamike akumulacije s obzirom na obrazac uočen u prethodnoj fazi dozrijevanja (Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Guillaume i sur., 2012.; Fernández-Cuesta i sur., 2013.). Pojedini autori zabilježili su relativno stabilne ili nejednoliko fluktuirajuće razine Δ^5-avenasterola tijekom dozrijevanja (Salvador i sur., 2001.; Matos i sur., 2007.).

Najviša koncentracija $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola u svakoj od tri izučavane faze dozrijevanja pronađena je u uljima Črne, a najniža u uljima Buže (**Slika 16**). Relativni udio istog stenola u ranijem stupnju zrelosti (I) bio je niži u ulju Buže u odnosu na ulja druge dvije sorte, što je utvrđeno i u uljima srednjeg stupnja zrelosti (II), s tom razlikom da su ulja Rosinjole u toj fazi sadržavala najviši udio. Tijekom dozrijevanja, porast koncentracije $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola zabilježen je u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I). Kod ulja Buže taj je porast nastavljen i u posljednjoj fazi dozrijevanja (III), dok je u uljima Črne i Rosinjole zabilježeno sniženje. Relativni udio $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola porastao je u ulju Buže kasnijeg (III) u odnosu na ulje iste sorte srednjeg stupnja zrelosti (II), u uljima Rosinjole su zabilježene manje fluktuacije, dok u uljima Črne nije bilo promjena tijekom dozrijevanja. Različiti autori utvrdili su različite obrasce promjena razine $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola u uljima različitih sorti tijekom dozrijevanja. U pojedinim fazama utvrđen je porast, uglavnom koncentracije (Vekiari i sur., 2010.; Guillaume i sur., 2012.; Boulkroune i sur., 2017.), u pojedinim fazama sniženje razine (Koutsaftakis i sur., 1999.; Lazzez i sur., 2008.; Lazzez i sur., 2011.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.), dok su za većinu istraživanih sorti utvrđene manje (Sánchez Casas i sur., 2004.; Lazzez i sur., 2008., 2011.; Vekiari i sur., 2010.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Yorulmazi sur., 2013.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz

i Konuskan, 2017.; Boulkroune i sur., 2017.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.) ili neujednačene promjene (Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Boulkroune i sur., 2017.; Chtourou i sur., 2017.).

Koncentracija Δ^7-stigmastenola bila je najviša u uljima od sorte Črna ranijeg (I) i kasnijeg stupnja zrelosti (III) te u uljima sorte Rosinjola u srednjem stupnju zrelosti (II) (**Slika 17**). U svim fazama dozrijevanja, najniža koncentracija pronađena je u uljima Buže. Ulja Buže srednjeg (II) i kasnijeg stupnja zrelosti (III) sadržavala su najniži, a ekvivalentna ulja Rosinjole najviši relativni udio Δ^7-stigmastenola. Tijekom dozrijevanja, manje izražene promjene uočene su za relativni udio Δ^7-stigmastenola u uljima Buže, dok je promjena koncentracije i relativnog udjela istog stenola, s izraženo višim vrijednostima u uljima srednjeg stupnja zrelosti (II), utvrđena za ulja Rosinjole. Za Δ^7-stigmastenol su u literaturi također objavljeni raznovrsni obrasci promjena tijekom dozrijevanja. Većina studija zabilježila je relativno postojane vrijednosti (Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Boulkroune i sur., 2017.; Sönmez i sur., 2018.; Lazzez i sur., 2008.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.), ali su za pojedine sorte bilježena i povišenja (Yorulmaz i Konuskan, 2017.) i sniženja njegove razine (Koutsaftakis i sur., 1999.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Yorulmazi sur., 2013.) tijekom cijelog ili u pojedinim fazama dozrijevanja.

Promjene tijekom dozrijevanja uzrokovale su da koncentracija Δ^7-avenasterola u ranijem stupnju zrelosti (I) bude najviša u ulju Črne, u srednjem (II) u ulju Rosinjole, a u kasnijem stupnju zrelosti (III) u ulju Buže (**Slika 18**). Osim u srednjoj fazi dozrijevanja (II) kada je najniža koncentracija pronađena u ulju Buže, najniže količine Δ^7-avenasterola sadržavala su ulja Rosinjole. Razlike između relativnih udjela Δ^7-avenasterola u uljima različitih sorti također su bile bitno određene stupnjem zrelosti. Ulja Buže imala su najviši udio u početnoj (I) i završnoj fazi (III), dok je u srednjem stupnju zrelosti (II) spomenuti sterol bio najzastupljeniji u ulju Rosinjole. Najniži udio u ranoj fazi dozrijevanja (I) imalo je ulje Rosinjole, a u srednjem (II) i završnom stupnju zrelosti (III) ulje Črne. Tijekom dozrijevanja, promjene u sadržaju Δ^7-avenasterola bile su različite za svaku sortu. U uljima Buže je zabilježeno sniženje pa porast koncentracije i relativnog udjela, u uljima Črne se sniženje koncentracije nastavilo i u kasnijoj fazi dozrijevanja (III), a relativni se udio nakon početnog pada nije mijenjao, dok je za Rosinjolu ponovno zabilježen izrazit porast vrijednosti u srednjem stupnju zrelosti (II), nakon čega je posljednjoj fazi (III) uslijedilo njihovo sniženje na nešto više razine u odnosu na raniji stupanj zrelosti (I). Kao i u ovom istraživanju, za brojne sorte utvrđen je čitav spektar različitih obrazaca promjena sadržaja Δ^7-avenasterola tijekom dozrijevanja. Zabilježene su relativno stabilne vrijednosti tijekom cijelog razdoblja (Sánchez Casas i sur., 2004.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmazi sur., 2013.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Boulkroune i sur., 2017.; Sönmez i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.), dok je druge sorte karakteriziralo izmjenjivanje različitih promjena koje su uključivale i porast i sniženje koncentracija i/ili relativnih udjela (Matos i sur.,

2007.; Vekiari i sur., 2010.; Guillaume i sur., 2012.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.). Za sortu Ayvalik zabilježen je konstantan porast (Sönmez i sur., 2018.), a za sortu Sari Hasebi konstantno snižavanje relativnog udjela tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja (Yorulmaz i Konuskan, 2017.).

Ulje Rosinjole sadržavalo je najvišu koncentraciju eritrodiola u ranijem (I) i srednjem (II), a ulje Buže u kasnijem stupnju zrelosti (III) (**Slika 19**). Najniža koncentracija u prve dvije faze dozrijevanja pronađena je u uljima Buže, a u kasnijoj fazi (III) u ulju Črne. Najviši relativni udio u ranijem stupnju zrelosti (I) pronađen je u uljima Buže i Rosinjole, u srednjem (II) samo u ulju Rosinjole, a u kasnijem (III) samo u ulju Buže. Ulje Črne sadržavalo je najniži relativni udio u svim fazama dozrijevanja. Promjene tijekom dozrijevanja bile su relativno ujednačene u različitim sortama. U uljima Buže i Rosinjole je zabilježen konstantan porast koncentracije i relativnog udjela od ranijeg (I) do kasnijeg stupnja zrelosti (III), dok je u ulju Črne porast uočen samo u posljednjoj fazi dozrijevanja (III). U literaturi je pronađeno relativno malo podataka o promjenama eritrola tijekom dozrijevanja. Promjenjivi relativni udio utvrdili su Koutsaftakis i suradnici (1999.) s porastom te Fuentes de Mendoza i suradnici (2013.) sa sniženjem u završnom dijelu promatranog razdoblja dozrijevanja, dok je za sortu Oueslati utvrđeno uglavnom opadanje koncentracije tijekom cijelog ciklusa dozrijevanja (Chtourou i sur., 2017.). Više autora prikazivalo je promjene zbroja koncentracije dva glavna triterpenska diola, eritrodiola i uvaola tijekom dozrijevanja. Utvrđena je uglavnom promjenjiva dinamika, sa sniženjem ili konstantnim relativnim udjelima nakon čega je uslijedio porast (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Sönmez i sur., 2018.) ili obrnuto (Yorulmazi sur., 2013.; Taticchi i sur., 2019.; Boulkroune i sur., 2017.), ali su bilježene i relativno stabilne koncentracije ili relativni udjeli tijekom cijelog razdoblja (Sánchez Casas i sur., 2004.).

Uvaol je u najvišoj koncentraciji u ranijem stupnju zrelosti pronađen u ulju Črne, a u najnižoj u ulju Buže, dok je u kasnijem stupnju zrelosti (III) ulje Rosinjole sadržavalo nižu koncentraciju nego preostala dva ulja (**Slika 20**). Najniži relativni udio u kasnijem stupnju zrelosti (III) pronađen je u ulju Črne. U uljima Buže je tijekom posljednje faze dozrijevanja utvrđen porast vrijednosti koncentracije i relativnog udjela, dok je kod ulja Rosinjole u srednjem stupnju zrelosti (II) pronađen niži relativni udio uvaola nego u preostala dva. Osim već spomenutih promjena izraženih za zbroj koncentracija/udjela eritrodiola i uvaola, u prethodnim istraživanjima utvrđeni su uglavnom promjenjivi obrasci promjena ili stabilne razine uvaola tijekom dozrijevanja maslina u proizvedenim maslinovim uljima (Koutsaftakis i sur., 1999.; Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Chtourou i sur., 2017.).

Razlike u koncentraciji ukupnog β-sitosterola među sortama bile su identične onima utvrđenim za β-sitosterol, što je i očekivano jer spomenuti spoj čini daleko najveći udio u ukupnom β-sitosterolu. Najviša koncentracija pronađena je u uljima sorte Črna, a najniža u uljima Buže u sva tri stupnja zrelosti (**Slika 21**). Za relativni udio ukupnog β-sitosterola među sortama su

utvrđeni jednaki odnosi kao i za koncentraciju, što se u manjoj mjeri razlikovalo od odnosa utvrđenih za β-sitosterol kao pojedinačni spoj (**Slika 13**). Obrazac promjene koncentracije ukupnog β-sitosterola bio je sličan kod sve tri sorte: utvrđeno je povišenje u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I), nakon čega je uslijedilo sniženje koncentracije u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III). Relativni udio se u uljima Buže i Črne u prvoj fazi dozrijevanja nije mijenjao, dok je u kasnijem stupnju zrelosti (III) uočeno opadanje njegove vrijednosti. U uljima Rosinjole uočena je drugačija dinamika te se relativni udio ukupnog β-sitosterola u ulju srednjeg (II) u odnosu na raniji stupanj zrelosti (I) značajno snizio, da bi u ulju kasnijeg stupnja zrelosti (III) bilo zabilježeno povišenje njegove vrijednosti. Porast pa pad razina ukupnog β-sitosterola tijekom dozrijevanja zabilježen je i u prethodno objavljenim studijama (Fuentes de Mendoza i sur., 2013.; Sönmez i sur., 2018.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.). Za neke sorte uočen je i konstantan porast relativnog udjela (Yorulmaz i Konuskan, 2017.), a utvrđene su i relativno stabilne vrijednosti tijekom cijelog razdoblja (Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Mena i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.).

U sva tri roka zrelosti koncentracija ukupnih sterola bila je najviša u uljima sorte Črna, a najniža u uljima sorte Buža (**Slika 22**). Takve razlike podudarale su se s onima zabilježenim za dva najzastupljenija sterola, β-sitosterol (**Slika 13**) i Δ^5-avenasterol (**Slika 15**), kao i za ukupni β-sitosterol (**Slika 21**). Promjene tijekom dozrijevanja također su bile slične za ulja sve tri sorte i podudarale su se s promjenama koncentracije (ukupnog) β-sitosterola: utvrđeno je povišenje u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulja ranijeg stupnja zrelosti (I), nakon čega je uslijedilo sniženje koncentracije u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) (**Slike 21 i 22**). Ulje Buže kasnijeg stupnja zrelosti (III) sadržavalo je višu koncentraciju ukupnih sterola nego ulje iste sorte ranijeg stupnja zrelosti (I), dok kod ostalih sorti nije bilo razlika između koncentracija ukupnih sterola pronađenih u uljima proizvedenih od maslina ubranih u ranijoj (I) i kasnijoj fazi dozrijevanja (III). Kao i za gotovo sve identificirane pojedinačne sterole, dinamika nakupljanja ukupne koncentracije sterola rijetko je održavala isti tijek tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja, iako su zabilježene neke iznimke. U nekoliko studija uočeno je da koncentracija ukupnih sterola u određenom trenutku tijekom dozrijevanja dostiže određenu razinu nakon čega se smanjuje ili ne mijenja (Matos i sur., 2007.; Lazzez i sur., 2008.; Guillaume i sur., 2012.; Yorulmazi sur., 2013.; Sönmez i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.), što je potvrđeno i u ovom radu. Objavljeni su i rezultati koji su za pojedine sorte prikazali konstantan porast (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Fernández-Cuesta i sur., 2013.) ili konstantno sniženje (Gutiérrez i sur., 1999.; Matos i sur., 2007.; Taticchi i sur., 2019.), dok su utvrđene i relativno stabilne vrijednosti tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja (Gutiérrez i sur., 1999.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Kaliora i sur., 2013.; Boulkroune i sur., 2017.; Sönmez i sur., 2018.). U pojedinim studijama utvrđene su uglavnom neravnomjerne fluktuacije koncentracije ukupnih sterola (Matos i sur., 2007.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Boulkroune i sur., 2017.).

O utjecaju sorte

Prema klasifikaciji na osnovi koncentracije ukupnih sterola koju su predložili Kyçyk i suradnici (2016.), u ovom se istraživanju Buža pokazala kao sorta od koje se može proizvesti maslinovo ulje vrlo niske do niske koncentracije (117,8 – 145,0 mg/100 g), ulja Črne sadržavala su visoku do vrlo visoku koncentraciju (207,8 – 227,7 mg/100 g), dok su ulja Rosinjole sadržavala nisku do srednje visoku koncentraciju ukupnih sterola (148,3 – 181,3 mg/100 g), ovisno o stupnju zrelosti. Allouche i suradnici (2009.) predložili su klasifikaciju maslinovih ulja na osnovi koncentracije eritrodiola prema kojoj bi sadržaj tog triterpenskog alkohola u svim uljima proizvedenim u ovom istraživanju (0,92 – 2,30 mg/100 g) bio okarakteriziran kao nizak.

U prethodnim istraživanjima ustanovljena je velika varijabilnost po pitanju koncentracija i relativnih udjela sterola i triterpenskih diola u uljima različitih sorti diljem svijeta. Koncentracija ukupnih sterola u većini izučavanih ulja kretala se u rasponu od 100 do 300 mg/100 g, iako su u mnogim maslinovim uljima pronađene vrijednosti niže od granice od 100 mg/100 g propisane Uredbom Europske komisije (EK, 2019.), kao na primjer u uljima španjolskih sorti Benizal i Martin Galgo (Pardo i sur., 2013.; Sena-Moreno i sur., 2015.; Pardo i sur., 2020.), uljima grčke sorte Koroneiki (Stefanoudaki i sur., 2000.; Skiada i sur., 2019.; 2020.a; 2020.b) te uljima više talijanskih (Deiana i sur., 2019.) i turskih autohtonih sorti (Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Demirag i Konuskan, 2021.). Kao ekstremne primjere vrijedi istaknuti ulje turske sorte Sarı Hasebi sa samo 35,8 mg/100 g ukupnih sterola (Yorulmaz i Konuskan, 2017.) nasuprot čak 450 mg/100 g ukupnih sterola pronađenih u ulju također turske sorte Buyuk Topak Ulak (Demirag i Konuskan, 2021.). Velika varijabilnost utvrđena je i među pojedinačnim sterolima. Na primjer, relativni udio jednog od najvažnijih sterola u maslinovom ulju, Δ^5-avenasterola, kretao se od 1,82 % u ulju sorte Buyuk Topak Ulak (Demirag i Konuskan, 2021.) do 31 % u ulju tuniške sorte El Hor (Krichène i sur., 2010.).

U mnogim prethodno objavljenim studijama utvrđena je značajna negativna korelacija između relativnih udjela dva najzastupljenija sterola, β-sitosterola i Δ^5-avenasterola (Stefanoudaki i sur., 2000.; Alves i sur., 2005.; Haddada i sur., 2007.; Oueslati i sur., 2009.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Fuentes i sur., 2015.). U ovom istraživanju jaka negativna korelacija između relativnih udjela spomenuta dva glavna sterola u uljima različitih sorti utvrđena je u ranijem (I) i kasnijem stupnju zrelosti (III), s koeficijentima korelacije *r* od -0,982, odnosno -0,987. U srednjem stupnju zrelosti korelacija je bila jaka, ali pozitivna (r = 0,804), što je potvrdilo tezu da stupanj zrelosti ima veliki utjecaj na sastav sterola u uljima različitih sorti. Za razliku od relativnih udjela, u ovom je istraživanju između koncentracija β-sitosterola i Δ^5-avenasterola utvrđena jaka pozitivna korelacija u svakom od tri stupnja zrelosti, s koeficijentima korelacije *r*, redom, 0,978, 0,997 i 0,725. Poznato je da ulje iz koštice masline sadrži značajno viši udio β-sitosterola u odnosu na Δ^5-avenasterol nego ulje iz pulpe (Ranalli i sur., 2002.). Također je otkriveno da ulja dobivena iz plodova masline manje veličine, s

vjerojatno većim omjerom masa koštice i pulpe, imaju više β-sitosterola i manje Δ^5-avenasterola nego ulja iz većih plodova iste sorte (Guillaume i sur., 2012.). Na temelju takvih pretpostavki nije isključena mogućnost da sorte s većim udjelom koštice u plodovima daju ulja s većim omjerom β-sitosterol/Δ^5-avenasterol, što je mogao biti djelomičan uzrok razlika utvrđenih u ovom istraživanju, iako između istraživanih sorti nisu utvrđene pravilnosti u razlikama omjera ta dva sterola u različitim stupnjevima zrelosti (rezultati nisu prikazani). Drugi i vjerojatniji uzrok proizlazi iz činjenice da je Δ^5-avenasterol prekursor u biosintezi β-sitosterola (Schaller, 2004.) i da je različita enzimska aktivnost, npr. enzima Δ^{24}-izomeraze/reduktaze (**Slika 2**) određena genotipom, odnosno sortnim podrijetlom, mogla rezultirati razlikama u sintezi i nakupljanju, odnosno omjeru ovih sterola u plodovima maslina i uljima pojedinih sorti. S druge strane, Gutiérrez i suradnici (1999.) pretpostavili su aktivnost drugog enzima iz skupine desaturaza koji može prevesti β-sitosterol u Δ^5-avenasterol, a koji je također mogao imati određeni utjecaj. Kyçyk i suradnici (2016.) svrstali su djevičanska maslinova ulja od 43 različite sorte iz kolekcije svjetskih sorti u pet skupina na temelju omjera relativnih udjela β-sitosterola i Δ^5-avenasterola.

Za pretpostaviti je da su i razlike između koncentracija i relativnih udjela drugih sterola i triterpenskih diola u uljima različitih sorti u velikoj mjeri bile posljedica različite ekspresije pojedinih gena i rezultirajuće enzimske aktivnosti. Biosinteza sterola i triterpenskih diola u maslini regulirana je, osim već spomenutom Δ^{24}-izomerazom/reduktazom, i nizom drugih enzima, čija je aktivnost snažno predodređena upravo sortnim porijeklom (Schaller, 2004.). U jednom od koraka biosinteze sterola dolazi do grananja tog biosintetskog puta, što dovodi do stvaranja 24-etil-sterola kao što su β-sitosterol i stigmasterol u jednoj, odnosno 24-metil-sterola kao što je kampesterol u drugoj grani. Spomenuti steroli nastaju iz zajedničkog prekursora gramisterola (24-metilen-lofenol) reakcijama reguliranim djelovanjem dvaju enzima, SAM-24-metilen-lofenol-C-24-metiltransferaze 2 (SMT2) i C-4α-sterol-metil-oksidaze 2 (SMO2) (**Slika 2**). Moguće je da su, na primjer, viša koncentracija i relativni udio kampesterola u uljima sorte Rosinjola utvrđeni u ovom istraživanju (**Slika 7**) bili posljedica jače ekspresije SMO2 i biosinteze 24-metil(en) sterola i/ili, još vjerojatnije, slabije ekspresije SMT2 i biosinteze 24-etil(iden) sterola. Nadalje, pretpostavljena je mogućnost da su razlike između koncentracija ukupnih sterola u uljima različitih sorti maslina, pa tako i onih uključenih u ovo istraživanje, bile značajno određene aktivnošću i koncentracijama drugih enzima, kao, na primjer, skvalen sintaze koja regulira sintezu skvalena kao zajedničkog prekursora svih sterola, u „nadmetanju“ sa seskviterpen ciklazom koja preusmjerava put sinteze prema seskviterpenima (Piironen i sur., 2000.). Važnost pojedinih enzima u biosintezi sterola empirijski je dokazana u drugim biljkama. Petostruko povećanje aktivnosti 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaze (HMGR) rezultiralo je nakupljanjem 15 puta više koncentracije slobodnih i esterificiranih sterola, dok je, s druge strane, smanjenje ekspresije gena SMO1 rezultiralo pojačanom

akumulacijom 24-metilen-cikloartanola, a smanjenje ekspresije gena SMO2 pojačanom akumulacijom citrostadienola, i to u oba slučaja nauštrb sinteze krajnjih produkata, sterola (Schaller, 2004.). Na djelotvornost enzima utjecaj može imati i dostupnost supstrata u maslini, kao i drugi čimbenici, kao što su, na primjer, pedoklimatski uvjeti, razina biotičkog i abiotičkog stresa i drugo (Piironen i sur., 2000.).

Iznimno visoke razine stigmasterola pronađene su u uljima sorte Rosinjola srednjeg (II) i kasnijeg (III) stupnja zrelosti (**Slika 9**). U ranijim istraživanjima utvrđeno je da taj sterol može biti pokazatelj lošije kvalitete ploda masline i maslinovog ulja (Koutsaftakis i sur., 1999.; Temime i sur., 2008.) te nije isključena mogućnost da su plodovi spomenutih uzoraka bili dijelom oštećeni ili slično, što nije zapaženo vizualnim pregledom. Visoke razine stigmasterola i njegovog derivata Δ^7-stigmastenola (**Slika 17**) uzrokovale su da relativni udio ukupnog β-sitosterola u uljima Rosinjola srednjeg (II) i kasnijeg (III) stupnja zrelosti nije dosegao zakonski minimum od 93 % za djevičanska maslinova ulja (**Slika 21**; EK, 2019.). Nadalje, relativni udio Δ^7-stigmastenola u uzorku Rosinjole srednjeg stupnja zrelosti bio je viši od najviše dopuštene vrijednosti od 0,5 % dopuštene Uredbom Europske komisije (**Slika 17**; EK, 2019.). Ovakva odstupanja relativnih udjela stigmasterola, Δ^7-stigmastenola i posljedično ukupnog β-sitosterola mogla bi izazvati probleme kod provjere autentičnosti maslinovog ulja ove sorte te je svakako potrebno provesti dodatna istraživanja i utvrditi je li u pitanju bila slučajna devijacija ili sortna karakteristika. Slični slučajevi previsokog relativnog udjela Δ^7-stigmasterola (Ceci i Carelli, 2007.; Krichène i sur., 2010.; Noorali i sur., 2014.; Yorulmaz i sur., 2014.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Kyçyk i sur., 2016.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.), odnosno udjela ukupnog β-sitosterola nižeg od minimalnih 93 % (Ceci i Carelli, 2007.; Krichène i sur., 2010.; Noorali i sur., 2014.; Bozdogan Konuskan i Mungan, 2016.; Kyçyk i sur., 2016.; Salazar-García i sur., 2019.) zabilježeni su i u uljima drugih sorti. Isto tako, u više je sortnih maslinovih ulja utvrđen relativni udio kampesterola viši od 4,0 % (Koutsaftakis i sur., 1999.; Rivera del Álamo i sur., 2004.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Ceci i Carelli, 2007.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Lerma-García i sur., 2011.; Sena-Moreno i sur., 2015.; Kyçyk i sur., 2016.; Deiana i sur., 2019.; Salazar-García i sur., 2019.; Skiada i sur., 2019), što je najviša vrijednost za djevičanska maslinova ulja dopuštena Uredbom Europske komisije (EK, 2019.). U prethodnim istraživanjima zapažena su i druga odstupanja od vrijednosti propisanih Uredbom, kao na primjer, relativni udio kolesterola viši od 0,5 % (Lerma-García i sur., 2011.; Yorulmaz i sur., 2014.) ili relativni udio zbroja eritrodiola i uvaola viši od 4,5 % (Allouche i sur., 2009.; Skiada i sur., 2019.).

Multivarijatna analiza za razlikovanje na osnovi sorte

Analiza varijance pokazala je da između prosječnih koncentracija i relativnih udjela pojedinih sterola i triterpenskih diola u istraživanim maslinovim uljima postoje značajne razlike s obzirom na sortu i stupanj zrelosti (**Slike 5 – 22**).

S ciljem utvrđivanja pokazatelja sortnog podrijetla koji su najmanje ovisni o stupnju zrelosti, provedena je analiza glavnih sastavnica (engl. *Principal Component Analysis*, *PCA*) s uzorcima svježih ulja. U preliminarnim pokušajima uspješnog razdvajanja kao varijable su najprije izabrani steroli i triterpenski dioli koji su se u analizi varijance pokazali kao najuspješniji u razlikovanju sorti (najviše *F* vrijednosti) te su naknadno uzeti u obzir i pojedini steroli s nižim *F* vrijednostima. Relativno uspješno razdvajanje s obzirom na sortu uzoraka svježih ulja dobivenih od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti uzduž prve dvije glavne sastavnice PC 1 i PC 2 (engl. *Principal Component, PC*) postignuto je s devet varijabli. Na **Slici 23 a** prikazane su projekcije pojedinih uzoraka istraživanih ulja u dvodimenzionalnom prostoru uvjetovanom s PC 1 i PC 2, dok su na **Slici 23 b** prikazane projekcije varijabli, odnosno sterola i triterpenskih diola na osnovi kojih je razdvajanje postignuto. Prve dvije glavne sastavnice zajedno su obuhvaćale 82,32 % ukupne varijance. Prva sastavnica PC 1 sadržavala je 63,75 % ukupne varijance pa su se i uzorci od različitih sorti uglavnom razdvojili uzduž njenog smjera, dok je dodatno razdvajanje uzoraka sorte Rosinjola od ostalih postignuto uzduž PC 2. Uzorci maslinovog ulja od sorte Buža locirani u četvrtom kvadrantu Kartezijevog sustava, s pozitivnim faktorskim opterećenjem (*engl. Factor Loading*) uzduž sastavnice PC 1 i negativnim uzduž sastavnice PC 2, korelirali su s višim relativnim udjelima kolesterola i eritrodiola. Steroli s negativnim faktorskim opterećenjem na PC1, kao što su glavni steroli β-sitosterol i Δ^5-avenasterol (kao i ukupni β-sitosterol) te klerosterol, $\Delta^{5,24}$-stigmastadienol, 24-metilen-kolesterol i uvaol, najviše su doprinijeli razdvajanju uzoraka sorte Črna od ostalih (**Slika 23**). Uzorci maslinovog ulja od sorte Rosinjola bili su karakterizirani visokim faktorskim opterećenjima kampesterola i kampestanola. Uzorci sorti Buža i Črna bili su dobro grupirani, dok je kod uzoraka Rosinjole uočen veći rasap kao posljedica većeg utjecaja stupnja zrelosti. Slabije razdvajanje uzoraka Rosinjole stupnja zrelosti III od uzoraka Buže najvjerojatnije je bilo posljedica viših udjela eritrodiola pronađenih u tim uzorcima (**Tablica 6**).

Analiza glavnih sastavnica (PCA) omogućila je koristan uvid u odnose sortnog podrijetla od kojih su proizvedena maslinova ulja uključena u istraživanje s koncentracijama i relativnim udjelima pojedinih sterola i triterpenskih diola. Međutim za relevantnu statističku klasifikaciju i razlikovanje (diferencijaciju) te konačnu potvrdu učinkovitosti pokazatelja sortnog podrijetla i/ili stupnja zrelosti, podaci su obrađeni nadziranom multivarijatnom tehnikom statističke analize, linearnom diskriminantnom analizom (engl. *Linear Discriminant Analysis*, *LDA*). Linearna diskriminantna analiza (LDA) primijenjena je na set s 18 uzoraka svježih ulja i 34 varijable (koncentracije i relativni udjeli pojedinačnih sterola i triterpenskih diola te ukupnog β-

sitosterola). Takav model postigao je 100% točnu klasifikaciju svježih maslinovih ulja na osnovi sorte neovisno o stupnju zrelosti izdvojivši tri varijable. Jasno razdvajanje uzoraka ulja LDA analizom u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije (*Root 1* i *Root 2*) na osnovi sorte prikazano je **Slici 24 a**, dok je projekcija standardiziranih koeficijenata varijabli uključenih u model prikazana na **Slici 24 b**. Prva odabrana varijabla bila je koncentracija β-sitosterola. Nakon tog koraka 77,78 % svih uzoraka te 100 % uzoraka sorte Črna bilo je ispravno klasificirano. Uključivanje relativnog udjela kampesterola klasificiralo je ispravno i sve uzorke Buže, dok je uključivanjem posljednje varijable, relativnog udjela Δ^5-avenasterola, svih 18 uzoraka bilo ispravno klasificirano na osnovi sortnog podrijetla. Najviša koncentracija β-sitosterola utvrđena je u uljima od sorte Črna, a najniža u uljima Buže, dok je udio kampesterola bio najviši u uljima Rosinjole, a najniži u uljima od sorte Črna. Utvrđene su statistički značajne razlike među sve tri sorte s obzirom na relativni udio Δ^5-avenasterola, ali u svakom stupnju zrelosti različita sorta imala je najviši, odnosno najniži relativni udio tog spoja. Na temelju rezultata ovog rada i podataka iz do sada provedenih studija može se s vrlo velikom sigurnošću zaključiti da sorta ima presudan utjecaj na koncentracije i relativne udjele sterola i triterpenskih diola u djevičanskom maslinovom ulju. U velikoj većini prethodnih studija koncentracije i/ili relativni udjeli sterola u različitim sortnim uljima statistički su uspoređeni analizom varijance (ANOVA) i raznim post-hoc testovima. U većini slučajeva pronađene su značajne razlike između sorti za svaki pojedini istraživani sterol i triterpenski diol. U određenom broju studija primijenjene su analiza glavnih sastavnica (PCA), linearna diskriminantna analiza (LDA) i hijerarhijska klaster analiza (HCA), kao i druge multivarijantne statističke tehnike, s ciljem izrade statističkih modela koji omogućuju najbolje moguće razlikovanje maslinovih ulja na osnovi sorte. Treba napomenuti da su se objavljene studije uvelike razlikovale u: eksperimentalnom dizajnu, uključujući broj uspoređenih sorti, tipu uključenih uzoraka (na primjer eksperimentalno ili industrijski proizvedena ulja, ulja u komercijalnoj prodaji) i njihovom broju, interakciji s drugim čimbenicima (godina berbe, zemljopisno podrijetlo, stupanj zrelosti, parametri uzgoja i prerade i drugo), kombinaciji s drugim fizikalno-kemijskim parametrima maslinovog ulja i slično. Imajući to u vidu, pri usporedbi uspješnosti razlikovanja maslinovih ulja na osnovi sortnog podrijetla i učinkovitosti pojedinih statističkih modela navedeno je potrebno uzeti u obzir.

U ovom radu, najbolje razdvajanje PCA analizom postignuto je uključivši više varijabli, među kojima i glavne, odnosno najzastupljenije sterole poput β-sitosterola, Δ^5-avenasterola, kampesterola i klerosterola (**Slika 25**). Nadalje, LDA analiza izdvojila je upravo tri najzastupljenija sterola, β-sitosterol, Δ^5-avenasterol i kampesterol, kao najučinkovitije pokazatelje sortnog podrijetla maslinovih ulja tri istraživanje sorte (**Slika 26**). Takvi rezultati bili su u skladu s prethodnim istraživanjima, gdje su brojne studije nakon analize univarijatnim i/ili multivarijatnim statističkim metodama izdvojile upravo β-sitosterol (Lerma-García i sur., 2011.;

Galeano Diaz i sur., 2005.; López-Cortés i sur., 2013.; Salazar-García i sur., 2019.; Kyçyk i sur., 2016.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Marini i sur., 2004.; Giuffrè i i Louadj, 2013.; Vekiari i sur., 2010.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Manai-Djebali i sur., 2012.; Ceci i Caerelli, 2007.; Olmo-García i sur., 2019.; Noorali i sur., 2014.), kampesterol (Lerma-García i sur., 2011.; Rivera del Álamo i sur., 2004.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Galeano Diaz i sur., 2005.; López-Cortés i sur., 2013.; Salazar-García i sur., 2019.; Pardo i sur., 2020.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Marini i sur., 2004.; Yorulmaz i sur., 2014.; Alves i sur., 2005.; Boulkroune i sur., 2017.; Noorali i sur., 2014.), Δ^5-avenasterol (Rivera del Álamo i sur., 2004.; Galeano Diaz i sur., 2005.; Kyçyk i sur., 2016.; Giansante i sur., 2003.; Marini i sur., 2004.; Giuffrè i i Louadj, 2013.; Vekiari i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Ilyasoglu i sur., 2007.; Matos i sur., 2007.; Olmo-García i sur., 2019.; Noorali i sur., 2014.), ali i stigmasterol (Galeano Diaz i sur., 2005.; López-Cortés i sur., 2013.; Salazar-García i sur., 2019.; Marini i sur., 2004.; Ilyasoglu i sur., 2010.; Yorulmaz i sur., 2014.; Matos i sur., 2007.; Noorali i sur., 2014.) kao sterole na osnovi čijih se koncentracija ili relativnih udjela mogu najbolje razlikovati maslinova ulja različitih sorti. Ostali steroli i triterpenski dioli bili su korisni pokazatelji sorte u manjem broju studija, a neki tek sporadično. Zanimljivo je spomenuti istraživanje u kojem su autori primijenili neciljanu metabolomsku analizu s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, *UPLC*) vezanu s hibridnim spektrometrom masa na principu kvadrupola i vremena preleta iona nakon elektroraspršenja (engl. *Electron Spray Ionisation/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, ESI/QTOF-MS*) kojom su identificirali iznimno velik broj sterola, mnogo veći nego što je to moguće učiniti standardnom metodom i standardnim analitičkim tehnikama. U toj studiji autori su multivarijatnim tehnikama statističke analize kao pokazatelje sortnog podrijetla s najvećim potencijalom izdvojili neuobičajene i u području istraživanja maslinovog ulja do tada nepoznate sterole, kao što su ajugalakton, 7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoil-CoA i dva izomerna oblika pseudoprotodioscina (Ghisoni i sur., 2019.).

Važnost uspješnog razlikovanja istraživanih svježih ulja na osnovi sorte multivarijatnim tehnikama u ovom istraživanju (**Slike 23** i **24**) je i u tome što je navedeno postignuto unatoč činjenici da su se uzorci razlikovali po stupnju zrelosti maslina od kojih su proizvedeni te da su postojale značajne interakcije između sorte i stupnja zrelosti (**Slike 5 – 22**). Navedeno upućuje na zaključak da među sterolima u maslinovom ulju postoje pokazatelji sorte dovoljno robusni da zadržavaju informaciju o sortnom podrijetlu kroz razdoblje dozrijevanja, što može biti iskorišteno za potvrdu njihove sortne autentičnosti bez obzira na stupanj zrelosti.

Vrijedi napomenuti da je u do danas objavljenoj literaturi među studijama u kojima su korišteni isključivo podaci o sastavu sterola i triterpenskih diola (Ranalli i sur., 2002.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Alves i sur., 2005.; Matos i sur., 2007.; Lerma-García i sur., 2009., 2011.; López-Cortés i sur., 2013.; Skiada i sur., 2020.a, 2020.b) objavljen vrlo mali broj primjera uspješnog

razlikovanja maslinovih ulja na osnovi sorte multivarijatnim statističkim tehnikama kada su uključeni uzorci bili proizvedeni od plodova različitog stupnja zrelosti (Sánchez Casas i sur., 2004.; Matos i sur., 2007.). Objavljene su i studije koje su uspjele razviti robusne statističke modele u kojima razlikovanje sorti samo na osnovi podataka o sastavu sterola i triterpenskih diola nije bilo ugroženo drugim interferirajućim čimbenicima, kao što su godina berbe (Lerma-García i sur., 2009., 2011.) ili zemljopisno podrijetlo (Lerma-García i sur., 2009., 2011.; Skiada i sur., 2020.).

O utjecaju stupnja zrelosti

Rezultati ovog (**Slike 5 – 22**), a i prethodnih istraživanja pokazali su da se obrasci akumulacije sterola i triterpenskih diola u maslini tijekom dozrijevanja, a zatim i njihove razine u proizvedenim maslinovim uljima, značajno razlikuju među sortama. Do danas su utvrđene značajne interakcije utjecaja stupnja zrelosti ne samo sa sortom već i drugim faktorima, kao na primjer s godinom berbe. Na primjer, u studiji koja je obuhvaćala četiri godine, odnosno sezone berbe, ukupna koncentracija sterola u maslinovim uljima sorte Cornicabra neznatno se snizila tijekom dozrijevanja u dvije godine istraživanja, u trećoj je zabilježen značajniji pad, dok je u četvrtoj zabilježen značajan porast (Salvador i sur., 2001.).

Obrazac promjene koncentracija većeg broja analiziranih sterola tijekom dozrijevanja, pa tako i glavnog predstavnika β-sitosterola kao i ukupnih sterola, s porastom koncentracija u ranijoj fazi nakon kojeg je uslijedilo njihovo snižavanje, zabilježen je i u prethodnim istraživanjima drugih autora (Matos i sur., 2007.; Lazzez i sur., 2008.; Guillaume i sur., 2012.; Yorulmazi sur., 2013.; Sönmez i sur., 2018.; Taticchi i sur., 2019.). Gutierrez i suradnici (1999.) primijetili su konstantno snižavanje koncentracije ukupnih sterola. Takav obrazac bio je izraženiji kod sorte Picual nego kod sorte Hojiblanca, što je još jednom dokazalo da je sorta ključan čimbenik. Sakouhi i sur. (2009.a) su sniženje koncentracije sterola objasnili činjenicom da u kasnijim fazama dozrijevanja ploda masline aktivnost enzima koji sudjeluju u biosintezi sterola usporava, a stopa pretvorbe sterola u druge srodne oblike, kao što su stanoli i steril esteri, reakcijama dehidracije, hidrogenacije i dehidrogenacije se povećava. Nadalje, koncentracija sterola se tijekom kasnije faze dozrijevanja snižava i zbog povećane proizvodnje sastojaka osapunjive frakcije, među ostalima i triglicerida koji čine i do preko 98 % ukupne mase maslinovog ulja, što 'razrjeđuje' neosapunjivu frakciju uključujući i sterole kao njene sastojke (Sánchez Casas i sur., 2004.). Ranije je pokazano da različite sorte pokazuju različitu dinamiku nakupljanja ulja tijekom dozrijevanja. Ranalli i suradnici (1998.) primijetili su da su plodovi sorte Leccino najviši udio ulja dostigli pri indeksu zrelosti od oko 5, odnosno s prevladavajućom crnom pokožicom i ljubičastom pulpom, dok su masline sorte Frantoio najviše ulja nakupile pri indeksu nešto nižem od 4, s uglavnom crno-crvenkastom pokožicom i zelenom pulpom. Navedeno je ukazalo da je ne samo enzimska aktivnost, već i stupanj tzv. 'razrjeđenja' sterola

uslijed nakupljanja triglicerida tijekom razvoja i dozrijevanja ploda genetski predodređen. Oscilacije koncentracija sterola tijekom dozrijevanja masline pripisivane su i njihovoj pretvorbi u steroidne hormone i vitamine koji reguliraju rast i razvoj nezrelih tkiva biljke (Jang i sur., 2000.; Sakouhi i sur., 2009.a).

U pojedinim istraživanjima utvrđeno je povećanje sadržaja ukupnih sterola u kasnijim fazama dozrijevanja (Fernández-Cuesta i sur., 2013.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.). Taticchi i sur. (2019.) pretpostavili su da u kasnijim fazama zrelosti plodova masline visoke razine depolimerizirajućih enzima omogućuju bolje razaranje različitih tkiva ploda tijekom mljevenja i tako olakšavaju ekstrakciju sterola iz stanica masline u vodenu/uljnu fazu. Slično tome, povišenje koncentracije i relativnog udjela eritrodiola u uljima sve tri sorte tijekom dozrijevanja utvrđeno u ovom istraživanju (**Slika 19**) vjerojatno nije bilo posljedica samo biosintetskih aktivnosti u plodu, već i činjenice da se eritrodiol i ostali triterpenski dioli u većim količinama nalaze u pokožici masline koja tijekom dozrijevanja postaje tanja i krhkija te se lakše razara i fragmentira tijekom mljevenja plodova u preradi, što dovodi do povećanog stupnja ekstrakcije tih spojeva u ulje (Sánchez Casas i sur., 2004.).

U mnogim objavljenim istraživanjima zabilježena je snažna negativna korelacija između relativnih udjela β-sitosterola i Δ^5-avenasterola tijekom dozrijevanja (Camera i sur., 1985.; Koutsaftakis i sur., 1999.; Guillaume i sur., 2012.; Sánchez Casas i sur., 2004.; Yorulmaz i Konuskan, 2017.; Ajana i El Antari, 1998.; Sönmez i sur., 2018.). Isto je utvrđeno i u ovom radu (**Slike 13 i 15**), gdje su koeficijenti korelacije *r* iznosili -0,979 za Bužu, -0,983 za Črnu i -0,765 za Rosinjolu. Aparicio i Luna (2002.) objasnili su takvu pojavu na temelju sniženja omjera koštice i pulpe u plodovima tijekom dozrijevanja, što rezultira manjim udjelom ulja iz koštice koje sadrži veći omjer β-sitosterol/Δ^5-avenasterol nego ulje koje se nakuplja u pulpi ploda (Ranalli i sur., 2002.). Druga mogućnost je da aktivnost pojedinih enzima u kasnijoj fazi dozrijevanja slabi (Sakouhi i sur., 2009.a), što vjerojatno uključuje i već spomenutu Δ^{24}-izomerazu/reduktazu koja prevodi Δ^5-avenasterol u β-sitosterol (Schaller, 2004.). Vrijedi spomenuti da su u ovom radu, za razliku od relativnih udjela, koeficijenti korelacije između koncentracija β-sitosterola i Δ^5-avenasterola bili uglavnom pozitivni i relativno visoki (podaci nisu prikazani), što upućuje na zaključak da se tijekom dozrijevanja njihov omjer donekle mijenja, ali koncentracije zapravo pokazuju relativno slične fluktuacije. Navedeno je zapravo logično jer oba spoja potječu iz istog biosintetskog puta, odnosno njegove grane (**Slika 2**).

Treba napomenuti da su se objavljena istraživanja, uključujući i ovu studiju, međusobno razlikovala s obzirom na državu i regiju u kojoj su provedena, što znači da su bila obilježena posebnim pedoklimatskim i agroekološkim uvjetima predodređenim zemljopisnim podrijetlom i položajem. Istraživanja su provođena u velikom vremenskom rasponu u različitim godinama, odnosno sezonama berbe, gdje je svaka od njih bila obilježena neponovljivim vremenskim uvjetima. Također, vremenski okviri razdoblja dozrijevanja koji su istraživani bili su značajno

različiti, od duljih, kao na primjer u istraživanju Ajane i El Antarija (1998.) od kolovoza do veljače s 11 termina berbe, do kraćih, kao na primjer u studiji Yorulmaza i Konuskana (2017.) koja je uključivala tri termina berbe u listopadu i studenom. Također treba imati na umu da su u nekim publikacijama objavljene promjene relativnih udjela sterola, dok su druge studije izrazile dinamiku promjena sterola tijekom dozrijevanja u jedinicama koncentracije. Imajući sve to u vidu, nije bilo jednostavno donijeti jednoznačne zaključke na osnovi podataka iz literature.

Multivarijatna analiza za razlikovanje na osnovi stupnja zrelosti

S ciljem utvrđivanja pokazatelja stupnja zrelosti koji su najmanje ovisni o sorti, provedena je PCA analiza s uzorcima svježih ulja. U preliminarnim pokušajima razdvajanja kao varijable su korišteni uglavnom steroli i triterpenski dioli koji su se u analizi varijance pokazali kao najuspješniji u razlikovanju stupnja zrelosti (najviše *F* vrijednosti). Međutim, kako su u pitanju bili uglavnom spojevi koji su istovremeno bili zaslužni za najznačajnije statistički značajne razlike između ulja različitih sorti, takvi modeli nisu bili uspješni. Razdvajanje uzoraka svježih ulja dobivenih od maslina tri sorte na osnovi stupnja zrelosti postignuto je tek sa sterolima s najvišim *F* vrijednostima iz analize varijance u kombinaciji s omjerima koncentracija ili relativnih udjela određenih sterola i triterpenskih diola (**Slika 25**). Prve dvije glavne sastavnice zajedno su obuhvaćale 70,60 % ukupne varijance. Iako je razdvajanje bilo relativno uspješno, utvrđen je određen rasap uzoraka kao posljedica sortnog podrijetla. Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti postignuto je uglavnom uzduž PC1, gdje su varijable s pozitivnim faktorskim opterećenjima, kao što su omjer udjela uvaola i koncentracije stigmasterola te omjer relativnog udjela klerosterola i Δ^5-avenasterola, bile karakteristične za raniji stupanj zrelosti (I), a varijable s negativnim faktorskim opterećenjima na PC 1, kao što su relativni udjeli Δ^5-avenasterola, 24-metilen-kolesterola i eritrodiola te koncentracija 24-metilen-kolesterola, za uzorke iz kasnijeg stupnja zrelosti (III). Uzorci iz srednjeg stupnja zrelosti (II) gravitirali su prema sjecištu osi PC 1 i PC 2 te su bili povezani s omjerom sitostanola i uvaola.

Primjenom LDA analize na set 18 svježih ulja i 34 varijable sa stupnjem zrelosti kao grupirajućim faktorom postignuta je 100 % ispravna klasifikacija. Razdvajanje uzoraka i projekcija standardiziranih koeficijenata uključenih varijabli prikazani su na **Slici 26**. Izrađeni model odabrao je pet varijabli. Prva varijabla uključena u model bila je koncentracija 24-metilen-kolesterola na osnovi čega je ispravno klasificirano 100 % uzoraka ranijeg stupnja zrelosti (I). Uključivanjem koncentracije eritrodiola svi uzorci srednjeg stupnja zrelosti (II) također su točno klasificirani. Ispravna klasifikacija svih 18 uzoraka na osnovi stupnja zrelosti postignuta je uključivanjem postotnog udjela uvaola te omjera sitostanola i uvaola. Uključivanje posljednje varijable, relativnog udjela 24-metilen-kolesterola, klasifikacijska učinkovitost modela dodatno je poboljšana. Koncentracija i udio 24-metilen-kolesterola i koncentracija

eritrodiola bili su u porastu s promjenama stupnja zrelosti od I do III, dok je omjer sitostanola i uvaola bio najniži u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III).

U postizanju uspješnog razlikovanja maslinovih ulja različitih sorti na osnovi stupnja zrelosti maslina kao važni su se, uz pojedine glavne sterole, pokazali i omjeri koncentracija ili relativnih udjela pojedinih sterola (**Slike 25** i **26**). Moguće je da je navedeno bilo posljedica slične dinamike promjene razina tih sterola tijekom dozrijevanja unatoč značajnim kvantitativnim razlikama među sortama. Navedeno upućuje na zaključak da među sterolima u maslinovom ulje postoje pokazatelji stupnja zrelosti dovoljno robusni da zadržavaju informaciju o zrelosti maslina unatoč sortnim razlikama, što može biti iskorišteno za potvrdu stupnja zrelosti plodova maslina od kojih je dobiveno ulje bez obzira na sortno podrijetlo.

Prema dostupnim podacima, Koutsaftakis i suradnici (1999.) jedini su do danas uspjeli postići sličan rezultat i grupirati maslinova ulja sorte Koroneiki na osnovi stupnja zrelosti koristeći kanoničku diskriminantnu analizu (*engl. Canonical Discriminant Analysis, CDA*) isključivo s podacima o sastavu sterola, unatoč tome što su uzorci potjecali iz dvije uzastopne godine berbe. Rijetki ostali statistički modeli koji su uspjeli postići grupiranje uzoraka maslinovog ulja na osnovi stupnja zrelosti i to unatoč interakciji sa sortnim podrijetlom ili nekim drugim faktorom kao varijable su koristili sterole u kombinaciji s drugim sastojcima maslinovog ulja. Fuentes de Mendoza i suradnici (2013.) pokazali su da je moguće razlikovati maslinova ulja prema stupnju zrelosti (od zelenih, prošaranih i zrelih maslina) unatoč različitom sortnom podrijetlu korištenjem linearne diskriminantne analize (LDA), koja je korištena i u ovom radu, koristeći određene masne kiseline, trigliceride i sterole kao kombinaciju varijabli. Orozco-Solano i suradnici (2010.) primijetili su određeni stupanj grupiranja uzoraka maslinovog ulja od tri različite sorte prema stupnju zrelosti primjenom analize glavnih sastavnica (PCA) sa sterolima i alifatskim alkoholima kao varijablama. U drugom istraživanju, primjenom PCA i diskriminantne analize postignuto je relativno uspješno razdvajanje ulja od plodova stabala različite starosti na osnovi stupnja njihove zrelosti. Osim sterola i triterpenskih diola, kao varijable su upotrijebljeni i skvalen, klorofili, karotenoidi i alifatski alkoholi (Chtourou i sur., 2017.).

5.2. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA SASTAV ALIFATSKIH ALKOHOLA U SVJEŽIM ULJIMA

U istraživanim maslinovim uljima identificirano je sedam alifatskih alkohola i to redom dokozanol (s 22 atoma ugljika, C22), trikozanol (C23), tetrakozanol (C24), pentakozanol (C25), heksakozanol (C26), heptakozanol (C27) i oktakozanol (C28). Međusobni odnosi koncentracija i relativnih udjela pojedinačnih alifatskih alkohola odgovarali su onima predstavljenim u Uredbi Europske komisije (EK, 2019.) i podacima iz literature o njihovom sastavu u djevičanskom maslinovom ulju, sa značajno višim koncentracijama i relativnim udjelima alkohola s parnim brojem atoma ugljika u molekuli (Stefanoudaki i sur., 2000.; Aparicio i Luna , 2002.; Lazzez i sur., 2008.; Sakouhi i sur., 2010.a; Giuffrè, 2014.b).

Prosječne koncentracije (mg/100 g ulja) i relativni udjeli (%) alifatskih alkohola u maslinovim uljima hrvatskih sorti Buža, Črna i Rosinjola proizvedenim od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I, II i III) prikazani su u **Slikama 27 – 34**. Jednosmjernom analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike između prosječnih koncentracija i relativnih udjela većine identificiranih alifatskih alkohola i na osnovi sorte i na osnovi stupnja zrelosti. Kao i u slučaju sterola i triterpenskih alkohola, za mnoge identificirane alifatske alkohole uočene su i interakcije, odnosno različit utjecaj jednog faktora na različitim razinama drugog faktora.

U uljima sorte ranijeg (I) i kasnijeg stupnja zrelosti (II) najviša koncentracija dokozanola pronađena je u uzorcima od sorte Buža, dok je ulje Rosinjole sadržavalo najvišu koncentraciju u srednjem stupnju zrelosti (II) (**Slika 27**). Najviši relativni udio u sva tri stupnja zrelosti pronađen je u uljima Buže. Najnižu koncentraciju i relativni udio na početku praćenog razdoblja dozrijevanja (I) sadržavalo je ulje Rosinjole, a u preostala dva termina (II i III) ulje Črne. Kod sve tri sorte utvrđen je porast koncentracije i relativnog udjela dokozanola u cijelom ili u dijelu razdoblja dozrijevanja, dok je sniženje koncentracije zabilježeno samo u ulju Rosinjole kasnijeg (III) u odnosu na ulje srednjeg stupnja zrelosti (II).

Ulja ranijeg stupnja zrelosti (I) Buže i Črne sadržavala su višu koncentraciju trikozanola od ekvivalentnog ulja Rosinjole, dok je u dva preostala termina (II i III) najviša koncentracija pronađena u uljima Rosinjole, a najniža u uljima Črne (**Slika 28**). Relativni udio trikozanola u ranijem (I) i srednjem stupnju zrelosti (II) bio je najviši u uljima Buže, dok u kasnijem stadiju nisu utvrđene značajne razlike između sorti. U ulju svake pojedine sorte uočena je različita dinamika promjene koncentracije i relativnog udjela trikozanola tijekom dozrijevanja. U uljima Buže zabilježen je porast pa pad relativnog udjela; u ulju Črne došlo je do blagog porasta u ulju kasnijeg stupnja zrelosti (III), dok je kod Rosinjole zabilježeno veliko povišenje u ulju srednjeg stupnja zrelosti (II) pa blaži pad koncentracije u ulju kasnijeg stupnja zrelosti (III).

Odnosi koncentracija i relativnog udjela tetrakozanola u različitim uljima (**Slika 29)** bili su slični onima trikozanola. Ulja ranijeg stupnja zrelosti (I) Buže i Črne sadržavala su višu koncentraciju

od ekvivalentnog ulja Rosinjole, dok je u dva preostala termina (II i III) najviša koncentracija pronađena u uljima Rosinjole, a najniža u uljima Črne. Slično je, uz manje razlike, utvrđeno i za relativni udio. U uljima Buže i Črne zabilježen je blago povišenje koncentracije i relativnog udjela u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III).

Ulja Črne i Rosinjole sadržavala su višu koncentraciju pentakozanola nego ulje Buže u sva tri stupnja zrelosti, dok je najviši relativni udio u sva tri stadija pronađen u uljima Črne, niži u uljima Rosinjole, a najniži u uljima Buže. Izuzetak je bio srednji stupanj zrelosti gdje nije bilo razlike između ulja potonje dvije sorte (**Slika 30**). Kod sve tri sorte zabilježeno je konstantno sniženje koncentracije i relativnog udjela pentakozanola tijekom dozrijevanja, uz nekoliko izuzetaka kada razlike nisu bile statistički značajne.

Najviša koncentracija heksakozanola u ranijem (I) i srednjem stupnju zrelosti (II) pronađena je u uljima Rosinjole, a najniža u uljima Buže, dok se ulja različitih sorti kasnijeg stupnja zrelosti (III) nisu razlikovala (**Slika 31**). Najviši relativni udio u ranijem stupnju zrelosti pronađen je u ulju Rosinjole, a u druga dva stadija (II i III) u uljima Črne. Ulja Buže sadržavala su najniži relativni udio, osim u kasnijem stupnju zrelosti kada se ulja Buže i Rosinjole nisu razlikovala. U većini slučajeva utvrđeno je sniženje koncentracije ili relativnog udjela heksakozanola tijekom dozrijevanja, iako ne istim intenzitetom kod svih sorti te uz pokoju iznimku, kao na primjer povišenje koncentracije u ulju Buže kasnijeg (III) u odnosu na ulje srednjeg stupnja zrelosti (II) ili održavanje stabilnog relativnog udjela u pojedinim fazama dozrijevanja Buže i Črne.

Ulja sorte Rosinjola sadržavala su najviše koncentracije heptakozanola u svim fazama dozrijevanja, a slično je utvrđeno i za relativni udio u ranijem stupnju zrelosti (I), dok se u daljnjim fazama udjeli u uljima različitih sorti nisu razlikovali (**Slika 32**). U slučajevima kada su utvrđene značajne razlike među uljima iste sorte proizvedenim od maslina različite zrelosti, kao u slučaju Črne i Rosinjole, utvrđen je pad koncentracija, a u pojedinim stadijima i relativnih udjela.

Kao i u slučaju heksakozanola, najviša koncentracija oktakozanola u ranijem (I) i srednjem stupnju zrelosti (II) pronađena je u uljima Rosinjole, a najniža u uljima Buže, dok se ulja različitih sorti kasnijeg stupnja zrelosti (III) nisu razlikovala (**Slika 33**). Najviši udio oktakozanola u ranijem stupnju zrelosti (I) zabilježen je u ulju Rosinjole, a u kasnijem (III) u ulju Črne. U većini slučajeva zabilježene su značajne promjene tijekom dozrijevanja, odnosno značajno sniženje koncentracije i/ili relativnog udjela i to u pojedinim fazama u uljima Buže i Črne ili kroz cijelo razdoblje dozrijevanja u uljima Rosinjole. Kao i kod heksakozanola i heptakozanola, najveće razlike u razini oktakozanola između ulja ranijeg (I) i kasnijeg stupnja zrelosti (III) zabilježene su u uljima Rosinjole.

Koncentracija ukupnih alifatskih alkohola (**Slika 34**) u ranijem stupnju zrelosti (I) bila je viša u uljima od sorti Črna i Rosinjola u odnosu na Bužu, dok je Rosinjola sadržavala najvišu

koncentraciju i u preostala dva stadija (II i III). U srednjem stupnju zrelosti (II) najniža koncentracija pronađena je u ulju Buže, a u kasnijem (III) u ulju Črne. Dinamika nakupljanja ukupnih alifatskih alkohola razlikovala se od sorte do sorte. U uljima Buže je nakon stabilnog razdoblja zabilježeno povišenje koncentracije u kasnijem stupnju zrelosti (III), sniženje koncentracije u ulju Črne srednjeg (II) u odnosu na ulje ranijeg stupnja zrelosti (I) nije nastavljeno nego je u posljednjoj fazi (III) koncentracija ostala nepromijenjena, dok je u uljima sorte Rosinjola nakon porasta u srednjem (II), u kasnijem stupnju zrelosti (III) zabilježeno sniženje koncentracije ukupnih alifatskih alkohola.

O utjecaju sorte

Koncentracija ukupnih alifatskih alkohola u maslinovim uljima u ovom radu kretala se u rasponu od 7,93 do 14,73 mg/100 g (**Slika 34**). Tržišni standardima i propisima EU nije definirana granica koncentracije ukupnih alifatskih alkohola za djevičansko i ekstra djevičansko maslinovo ulje, ali je definirana maksimalna granica za maslinovo ulje lampante od 35 mg/100 g, u slučajevima kada neko ulje sadrži voskove u koncentracijii iznad 30, ali najviše 35 mg/100 g. U usporedbi s drugim sirovinama i namirnicama, pronađene koncentracije bile su sličnog reda veličina kao i one pronađene u lipidima cijelog i mljevenog kukuruza i kineske šećerne trske: do 12 mg/100 g (Harrabi i sur., 2009., Leguizamón i sur., 2009.), pšeničnoj slami: 16 mg/100 g, listovima šećerne trske: 18 mg/100 g (Irmak i sur., 2006.) i ulju rižinih mekinja: 17 mg/100 g (Jung i sur., 2011.). Bile su uglavnom više od koncentracija pronađenih u pšeničnim mekinjama: 3 mg/100 g, pšeničnim klicama: 1 mg/100 g i pšeničnom brašnu: 0,02 mg/100 g (Irmak i sur., 2006.), a niže nego koncentracije pronađene u kori šećerne trske: 27 mg/100 g (Irmak i sur., 2006.), ulju sjemenki perile: 43 mg/100 g, ulju sjemenki grožđa: 24 mg/100 g (Jung i sur., 2011.), ulju kikirikija: do 54 mg/100 g (Cherif i sur., 2010.) i suncokretovom ulju: do 81,46 mg/100 g (Anastasi i sur., 2010.).

Koncentracija ukupnih alifatskih alkohola u maslinovim uljima istraživanim u ovom radu bila je usporediva s koncentracijama zabilježenim u uljima drugih mediteranskih sorti maslina, kao što su, na primjer, talijanska Coratina s koncentracijama od 5,8 do 6,5 (Aparicio i Luna, 2002.), odnosno 6,9 mg/100 g (Stefanoudaki i sur., 2000.), grčka sorta Koroneiki s koncentracijama od 24,3 do 26,7 (Aparicio i Luna, 2002.), odnosno 15,2 mg/100 g (Stefanoudaki i sur., 2000.), te španjolska sorta Picual s koncentracijom od 11,6 mg/100 g (Stefanoudaki i sur., 2000.). Ukupne koncentracije alifatskih alkohola koje su Aparicio i Luna (2002.) pronašli u uljima različitih sorti dosezale su do čak 36,1 mg/100 g u ulju sorte Farga. Rivera del Alamo i suradnici (2004.) utvrdili su ukupne koncentracije alifatskih alkohola između 4,4 i 29,1 mg/100 g u uljima španjolskih sorti Cornicabra, Arbequina, Picual i Hojiblanca, dok su Lazzez i suradnici (2008.) u uljima tuniške sorte Chemlali zabilježili koncentracije od približno 5 do 32 mg/100 g, ovisno o stupnju zrelosti maslina. Giuffrè (2014.b) je utvrdio da se prosječna koncentracija ukupnih

alifatskih alkohola u maslinovim uljima različitih sorti iz jugozapadne Kalabrije (Italija) u različitim godinama berbe kretala u rasponu od 3,8 mg/100 g u ulju sorte Nocellara Messinese do 13,0 mg/100 g u ulju sorte Ottobratica. U drugom sveobuhvatnom istraživanju koje je uzelo u obzir utjecaj faktora dozrijevanja, isti autor pronašao je koncentracije između 2,1 mg/100 g u ulju dobivenom uglavnom od crnih plodova sorte Nocellara Mesinese ubranih kasno (31. prosinca) i 19,4 mg/100 g pronađenih u ulju od zelenih maslina sorte Pendolino (1. listopada) (Giuffrè, 2014.a).

Omjeri glavnih alifatskih alkohola s parnim brojem atoma ugljika uspoređeni su s onima izračunatim na osnovi podataka dostupnih u literaturi (Lazzez i sur., 2008.; Aparicio i Luna , 2002.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Sakouhi i sur., 2010.a; Giuffrè, 2014.b) za druge sorte (Coratina, Koroneiki, Chemlali, Picual, Sayali, Cassanese, Itrana, Leccino, Nocellara Messinese, Nociara, Pendolino, Picholine i Sinopolese) te je tako dobiveno da odnosi dokozanol : tetrakozanol : heksakozanol : oktakozanol u prosjeku iznose: 1,00 : 2,18 : 3,59 : 1,86. Dokozanol je pronađen u najnižim relativnim udjelima u odnosu na druge glavne alifatske alkohole u velikoj većini dosadašnjih studija, dok je najzastupljeniji uglavnom bio heksakozanol (Stefanoudaki i sur., 2000.; Aparicio i Luna , 2002.; Lazzez i sur., 2008.; Sakouhi i sur., 2010.a; Giuffrè, 2014.b). U uljima sorti Buža i Rosinjola uključenim u ovo istraživanje dokozanol se pojavio u najmanjem relativnom udjelu samo u uljima ranijeg stupnja zrelosti (I), dok je u uljima ostalih faza dozrijevanja alkohol pronađen u najnižem udjelu bio oktakozanol (**Slike 27 i 33**). U uzorcima Črne kasnijeg stupnja zrelosti udjeli dokozanola i oktakozanola bili su vrlo slični. Najviši relativni udio u svim uzorcima uključenim u istraživanje imao je heksakozanol, što je bilo u suglasju s drugim autorima (Stefanoudaki i sur., 2000.; Aparicio i Luna , 2002.; Lazzez i sur., 2008.; Sakouhi i sur., 2010.a; Krichene i sur., 2010.; Giuffrè, 2014.b). Relativni udjeli dokozanola, tetrakozanola, heksakozanola i oktakozanola u uljima analiziranim u ovom radu imali su sljedeće prosječne omjere tijekom dozrijevanja: 1,27 : 1,86 : 2,54 : 1,07 u uljima Buže, 1,00 : 1,84 : 3,89 : 1,54 u uljima Črne i 1,11 : 2,60 : 5,45 : 2,45 u uljima Rosinjole. Relativni omjer dobiven za ulja sorte Črna najviše je odgovarao omjerima utvrđenim u ostalim mediteranskim maslinovim uljima (Lazzez i sur., 2008.; Aparicio i Luna , 2002.; Stefanoudaki i sur., 2000.; Sakouhi i sur., 2010.a; Giuffrè, 2014.b). Za ulja Buže i posebno Rosinjole zapažena su određena odstupanja. Osim već spomenutog dokozanola, razlike između koncentracija pojedinih glavnih alkohola najmanje su se međusobno razlikovale u uljima Buže, dok su se udjeli heksakozanola i oktakozanola u uljima Rosinjole drastično mijenjali tijekom dozrijevanja. Uočene osobitosti mogle bi se smatrati specifičnim i potencijalno tipičnim značajkama djevičanskih maslinovih ulja spomenutih sorti. Također, ovi primjeri još su jednom pokazali da je potrebno uzeti u obzir utjecaj stupnja zrelosti kada se provodi karakterizacija i razlikovanje na osnovi sortnog podrijetla. Značajnija odstupanja međusobnih omjera glavnih alifatskih

alkohola ranije su utvrđena za ulja od talijanskih sorti Coratina i Ottobratica, gdje su oni iznosili 1,00 : 2,55 : 8,93 : 4,97, odnosno 1,00 : 1,56 : 1,61 : 1,42 (Giuffrè, 2014.b).

Multivarijatna analiza za razlikovanje na osnovi sorte

S ciljem utvrđivanja pokazatelja sortnog podrijetla koji su najmanje ovisni o stupnju zrelosti, provedena je PCA analiza s uzorcima svježih ulja. Relativno uspješno, iako ne i potpuno razdvajanje uzoraka svježih ulja na osnovi sorte postignuto je s četiri varijable, odnosno alifatskih alkohola koji su se u dvosmjernoj analizi varijance pokazali kao najuspješniji u razlikovanju sorti (najviše *F* vrijednosti). Na **Slici 35 a** prikazane su projekcije pojedinih uzoraka istraživanih ulja u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s dvjema glavnim sastavnicama PC 1 i PC 2, dok su na **Slici 35 b** prikazane projekcije alifatskih alkohola na osnovi kojih je razdvajanje postignuto. Prve dvije glavne sastavnice zajedno su sadržavale 94,50 % ukupne varijance. Uzorci maslinovog ulja sorte Buža pokazali su tendenciju izdvajanja od ostalih uzoraka uglavnom uzduž PC 1, dok su uzorci od Rosinjole bili razdvojeni od ostalih uglavnom uzduž PC 2. Uzorci sorte Buža korelirali su s relativnim udjelom dokozanola koji je imao visoko pozitivno faktorsko opterećenje na PC 1. Visok postotni udio pentakozanola bio je karakterističan za ulja sorte Črna, dok je njegova viša koncentracija u uljima sorti Črna i Rosinjola bila zaslužna za razdvajanje od uzoraka ulja Buže. Za razdvajanje ulja Rosinjole od ulja ostalih sorti najzaslužnije su bile visoke koncentracije heptakozanola. Kod te sorte uočen je najveći rasap položaja pojedinačnih uzoraka u koordinatnom sustavu. Navedeno je najvjerojatnije bilo posljedica utjecaja stupnja zrelosti na koncentraciju dokozanola, koja je u uljima Rosinjole iz srednjeg (II) i kasnijeg (III) stupnja zrelosti također bila relativno visoka, bliska onima pronađenim u uljima sorte Buža.

Linearna diskriminantna analiza primijenjena je na set podataka dobiven analizom svježih ulja koji je sadržavao 18 uzoraka i 14 varijabli (koncentracije i relativni udjeli pojedinačnih alifatskih alkohola). Takav model postigao je 100 % točnu klasifikaciju svježih maslinovih ulja na osnovi sorte neovisno o stupnju zrelosti izdvojivši četiri varijable. Jasno razdvajanje uzoraka ulja LDA analizom u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije diskriminantne funkcije na osnovi sorte prikazano je **Slici 36 a**, dok je projekcija standardiziranih koeficijenata varijabli uključenih u model prikazana na **Slici 36 b**. Prva odabrana varijabla bila je koncentracija pentakozanola što je rezultiralo ispravnom klasifikacijom 100 % uzoraka sorte Buža. Uključivanje relativnog udjela pentakozanola klasificiralo je ispravno i sve uzorke sorte Črna, dok je uključivanjem koncentracije dokozanola postignuta ispravna klasifikacija svih 18 uzoraka na osnovi sortnog podrijetla. Uključivanjem posljednje varijable, koncentracije tetrakozanola, poboljšana je LDA klasifikacija na osnovi sorte. Najniža koncentracija pentakozanola pronađena je u uljima sorte Buža, dok je najviši relativni udio istog alifatskog

alkohola bio karakterističan za ulja sorte Črna. Najviša prosječna koncentracija tetrakozanola odlikovala je većinu uzoraka sorte Rosinjola.

Na temelju rezultata ovog rada i podataka iz do sada provedenih studija može se s vrlo velikom sigurnošću zaključiti da sorta ima značajan utjecaj na koncentracije i relativne udjele alifatskih alkohola u djevičanskom maslinovom ulju. Među objavljenim podacima nisu pronađeni multivarijatni statistički modeli koji su uspjeli postići razlikovanje maslinovih ulja različitih sorti samo na osnovi sastava alifatskih alkohola. Bianchi i suradnici (2001.) postigli su relativno zadovoljavajuće razdvajanje ulja šest talijanskih sorti koristeći alifatske alkohole u kombinaciji sa sterolima, triterpenskim alkoholima i masnim kiselinama. Autori su utvrdili značajnije varijacije u razinama alifatskih alkohola između i unutar grupa pojedinih sorti u odnosu na druge istraživane spojeve. Pretpostavili su da je navedeno mogla biti posljedica utjecaja okolišnog stresa koji najviše pogađa pokožicu ploda masline, a u kojoj je glavnina alifatskih alkohola akumulirana. Talijanska ulja od sedam sorti maslina uspješno su razlikovana PCA analizom i kanoničkom diskriminantnom analizom i to koristeći alifatske i triterpenske alkohole kao varijable (Ranalli i sur., 2002.). Boulkroune i suradnici (2017.) uspješno su razdvojili uzorke maslinovog ulja četiri alžirske sorte pomoću LDA analize. Uz pojedine sterole i triterpenske diole, LDA analiza je kao varijable najkorisnije za razdvajanje izdvojila i dokozanol, pentakozanol i heptakozanol, što je uvelike bilo u slaganju s rezultatima PCA i LDA analize u ovom radu (**Slike 35 i 36**). Giansante i suradnici (2003.) postigli su relativno dobro razdvajanje uzoraka ulja četiri sorte maslina pomoću PCA analize koristeći tetrakozanol i heksakozanol u kombinaciji sa sterolima, triterpenskim alkoholima, triterpenskim diolima, masnim kiselinama i skvalenom, dok je uspješnost klasifikacije od 96 % LDA analizom na osnovi sorte postignuta s osam varijabli, među kojima je bio i heksakozanol. Iako su analizom varijance pronašli razlike između koncentracija alifatskih alkohola u maslinovim uljima sorti Coratina (Italija), Picual (Španjolska) i Koroneiki (Grčka). Stefanoudaki i suradnici (2000.) nisu utvrdili učinkovitost tih spojeva kao varijabli za razlikovanje na osnovi sorte pomoću kanoničke diskriminantne analize, za razliku od parametara kvalitete, masnih kiselina, sterola i određenih senzornih svojstava.

Važnost uspješnog razlikovanja istraživanih ulja na osnovi sorte multivarijatnim tehnikama u ovom istraživanju (**Slike 35** i **36**) je i u tome što je navedeno postignuto unatoč činjenici da su se uzorci razlikovali po stupnju zrelosti maslina te unatoč značajnim interakcijama između sorte i stupnja zrelosti (**Slike 27** – **34**). Navedeno upućuje na zaključak da među alifatskim alkoholima u maslinovom ulju postoje pokazatelji sorte dovoljno robusni da zadržavaju informaciju o sortnom podrijetlu kroz razdoblje dozrijevanja, što može biti iskorišteno za potvrdu njihove autentičnosti bez obzira na stupanj zrelosti.

O utjecaju stupnja zrelosti

Sniženje koncentracija i relativnih udjela alifatskih alkohola duljeg lanca od pentakozanola do oktakozanola, zabilježeno u uljima Črne i Rosinjole, a u pojedinim slučajevima i u uljima Buže (Slike 27 – 33), bilo je u skladu je s rezultatima koje je ranije dobio Giuffrè (2014.a). Giuffrè (2014.b) je također primijetio nedosljedne obrasce promjena koncentracija alkohola kraćih ugljikovih lanaca od dokozanola do tetrakozanola u uljima različitih sorti. U ovom radu izuzetak su bila ulja Buže, gdje je za sve alifatske alkohole osim dokozanola uočeno sniženje koncentracija u uljima srednjeg (II) u odnosu na ulje ranijeg stupnja zrelosti (I) s ponovnim povišenjem u ulju kasnijeg stupnja zrelosti (III) (Slike 27 – 33). Slično je ranije uočeno i za ulja sorte Sinapolese (Giuffrè, 2014.a). Orozco-Solano i suradnici (2010.) proučavali su nakupljanje alifatskih alkohola tijekom dozrijevanja u plodovima i listovima maslina sorti Gordal, Manzanilla i Picual. Autori su primijetili uglavnom nelinearne varijacije tijekom petomjesečnog razdoblja dozrijevanja od rujna do siječnja, a koncentracije svih alifatskih alkohola dosegle su svoj maksimum u relativno zrelim maslinama ljubičaste i crne boje. Slično su primijetili Ranalli i suradnici (1998.) za druge sorte. Takvi obrasci naizgled su se prilično razlikovali od onih utvrđenih u ovom radu i u istraživanju koje je proveo Giuffrè, (2014.a), iako je sniženje koncentracija alkohola od pentakozanola do oktakozanola utvrđeno kod sorti Gordal i Manzanilla u razdoblju promjene boje maslina od zelenih do prošaranih (Orozco-Solano i sur., 2010.) u određenoj mjeri bilo usporedivo s promjenama utvrđenim u ovom radu u razdoblju između ranijeg (I) i srednjeg stupnja zrelosti (II) (Slike 30 – 33). S druge strane, isti autori (Orozco-Solano i sur., 2010.) su u maslinama sorte Picual utvrdili varijacije udjela alkohola kraćeg lanca dokozanola, trikozanola i tetrakozanola obrnuto proporcionalne onima pentakozanola, heksakozanola, heptakozanola i oktakozanola, što je bio slučaj i u ovom radu. Sakouhi i suradnici (2010.b) zabilježili su drugačije obrasce u maslinama sorte Meski: ukupni i pojedinačni alifatski alkoholi dosegli su najvišu razinu u 26. tjednu, a najnižu u 38. tjednu nakon cvatnje. Suprotno obrnutim obrascima dinamike promjena alkohola kraćih i duljih lanaca koje su zabilježili Orozco-Solano i suradnici (2010.), Sakouhi i suradnici (2010.b) utvrdili su istovremeni porast ili sniženje koncentracija svih pojedinačnih kao i ukupnih alifatskih alkohola u različitim fazama dozrijevanja. Boulkroune i suradnici (2017.) zabilježili su konstantno opadanje koncentracija ukupnih alifatskih alkohola u uljima proizvedenim od maslina različitih stupnjeva zrelosti, od rujna/listopada do prosinca/siječnja. Za pojedinačne alifatske alkohole utvrdili su uglavnom slične promjene, ali su u pojedinim razdobljima dozrijevanja određene sorte pokazivale različite obrasce. Svi navedeni slučajevi potvrdili su da masline različitih sorti, uvjetovane genetskim predispozicijama i pod utjecajem različitih okolišnih i pedoklimatskih uvjeta pokazuju različitu dinamiku nakupljanja alifatskih alkohola tijekom dozrijevanja.

Alifatski alkoholi u biljkama uglavnom nastaju kao međuproizvodi i prekursori njihovih estera s masnim kiselinama dugog lanca, voskova (Samuels i sur., 2008.). Utvrđeno je da se stupanj

sinteze voskova podudara s proširenjem površine biljke, odnosno ploda, pa je vjerojatno da maksimalna koncentracija alifatskih alkohola duljeg lanca u plodovima masline koincidira sa završetkom faze rasta plodova, a koji se postiže u ranijoj fazi dozrijevanja (Samuels i sur., 2008.). Moguće je da je uočeno sniženje razina alkohola duljeg lanca tijekom dozrijevanja (**Slike 30 – 33**) bilo posljedica usporavanja njihove sinteze zbog prestanka širenja pokožice i samog ploda u tom razdoblju. Poznato je da endogena enzimska aktivnost u plodu masline općenito opada tijekom dozrijevanja (Salas i sur., 1999.) pa je također pretpostavljena i mogućnost da je smanjenje aktivnosti acil reduktaze masnih kiselina (engl. Fatty Acid Reductase, FAR) iz kojih alifatski alkoholi nastaju (Samuels i sur., 2008.) bilo uzrokom sniženja njihovih koncentracija tijekom dozrijevanja. Razlozi sniženja koncentracija pentakozanola, heksakozanola, heptakozanola i oktakozanola mogli su biti i prirodna enzimska razgradnja, kemijska oksidacija u dugolančane aldehide i masne kiseline, kao i kontinuirano povećanje udjela triglicerida, odnosno 'razrjeđivanje' neosapunjive frakcije (Sánchez Casas i sur., 2004.).

Multivarijatna analiza za razlikovanje na osnovi stupnja zrelosti

Primjenom PCA analize na koncentracije i relativne udjele alifatskih alkohola nije se uspjelo postići potpuno razdvajanje istraživanih svježih ulja na osnovi stupnja zrelosti, što je bila posljedica značajnog utjecaja sortnog podrijetla. Nakon preliminarnih pokušaja, izdvojen je model s pet varijabli koje su se u dvosmjernoj analizi varijance pokazale kao najuspješnije u razlikovanju stupnjeva zrelosti (najviše F vrijednosti) (**Slika 37**). Prve dvije glavne sastavnice zajedno su obuhvaćale 91,83 % ukupne varijance. Unatoč nepotpunom međusobnom razdvajanju tri istraživana stupnja zrelosti, relativno su uspješno razdvojeni uzorci ranijeg (I) od uzoraka kasnijeg (III) stupnja zrelosti uzduž sastavnice PC 1. Varijable s pozitivnim faktorskim opterećenjem na PC 1, kao što su koncentracija i relativni udio pentakozanola te relativni udio oktakozanola, bile su karakteristične za uzorke ranijeg stupnja zrelosti (I), dok su uzorci ulja kasnijeg roka zrelosti (III) korelirali s varijablama s negativnim faktorskim opterećenjem na PC 1, odnosno koncentracijom i relativnim udjelom dokozanola.

Primjenom LDA analize na set s 18 svježih ulja i 14 varijabli sa stupnjem zrelosti kao grupirajućim faktorom nije postignuta 100 %-tna uspješnost, već je ukupno ispravno klasificiranih uzoraka bilo 88,89 %. Razdvajanje uzoraka i projekcija standardiziranih koeficijenata uključenih varijabli prikazani su na **Slici 38**. Izrađeni model odabrao je pet varijabli. Nakon uključivanja relativnih udjela oktakozanola i trikozanola ispravno su klasificirani svi uzorci ranijeg stupnja zrelosti (I). Uključivanjem postotnog udjela dokozanola postignuta je i 100 % ispravna klasifikacija uzoraka srednjeg stupnja zrelosti (II), dok uvrštenje koncentracije pentakozanola i relativnog udjela heksakozanola u model nije povećalo ukupni postotak uspješne klasifikacije na osnovi stupnja zrelosti. Dva uzorka kasnijeg stupnja zrelosti (III) ostala su pogrešno klasificirana u grupu srednjeg stupnja zrelosti (II). Najviši prosječni relativni

udio oktakozanola pronađen je u uzorcima ranijeg stupnja zrelosti (I). Prosječna koncentracija pentakozanola i relativni udio heksakozanola bili su viši u uljima ranijeg (I) nego u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III), dok je obrnuto utvrđeno za relativni udio dokozanola.

U postizanju razlikovanja maslinovih ulja različitih sorti na osnovi stupnja zrelosti kao relativno uspješne varijable pokazali su se i alifatski alkoholi. Navedeno potvrđuje da navedeni spojevi pokazuju donekle sličnu dinamiku promjena prilikom dozrijevanja u maslinama različitih sorti, odnosno da su njihovi profili karakteristični za određeni stupanj zrelosti maslina. U do danas objavljenoj literaturi nisu pronađeni multivarijatni statistički modeli kojima su razlikovana i klasificirana maslinova ulja na osnovi stupnja zrelosti na osnovi sastava alifatskih alkohola.

5.3. UTJECAJ SORTE I STUPNJA ZRELOSTI MASLINA NA SASTAV TRITERPENSKIH ALKOHOLA U SVJEŽIM ULJIMA

U istraživanim maslinovim uljima identificirano je devet triterpenskih alkohola i to: četiri 4-metil-sterola, redom obtusifoliol, gramisterol + cikloeukalenol i citrostadienol, te pet 4,4′-dimetil-sterola, redom δ-amirin, β-amirin, butirospermol, cikloartenol i 24-metilen-cikloartenol. Međusobni odnosi koncentracija i relativnih udjela pojedinačnih triterpenskih alkohola iz ovog rada odgovarali su podacima iz literature, sa citrostadienolom, odnosno cikloartenolom i 24-metilen-cikloartenolom kao prevladavajućim spojevima iz ove skupine (Itoh i sur., 1981.; Bianchi i sur., 2001.; Giansante, i sur., 2003.; Sakouhi i sur., 2009.b, 2010.a).

Prosječne koncentracije (mg/100g ulja) i relativni udjeli (%) triterpenskih alkohola u istraživanih uzoraka ulja hrvatskih sorti Buža, Črna i Rosinjola proizvedenim od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I, II i III) prikazani su na **Slikama 39** – **46**, te njihove sume na **Slikama 47** – **49**. Jednosmjernom analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike između prosječnih koncentracija i relativnih udjela većine identificiranih triterpenskih alkohola i na osnovi sorte i na osnovi stupnja zrelosti. Kao i u slučaju sterola, za mnoge identificirane triterpenske alkohole uočene su i interakcije, odnosno različit utjecaj jednog faktora na različitim razinama drugog faktora.

Koncentracija δ-amirina u ranijem stupnju zrelosti (I) bila je viša u uljima Črne i Rosinjole; u srednjem (II) u ulju Črne, a u kasnijem (III) u ulju Buže, koja je u prethodna dva stadija sadržavala najnižu koncentraciju (**Slika 39**). Relativni udio δ-amirina u ranijem stupnju zrelosti (I) bio je viši u ulju Rosinjole nego u preostala dva sortna ulja, dok je ulje iste sorte u srednjem i u kasnijem stupnju imalo najniži udio tog spoja. Tijekom dozrijevanja u ulju Buže je zabilježen porast koncentracije, ali i konstantno snižavanje relativnog udjela tijekom cijelog ciklusa dozrijevanja, dok je kod preostale dvije sorte zabilježeno opadanje razine koje je bilo izraženije, i statistički značajno u svakom stadiju, kod relativnih udjela nego kod koncentracija. Ulje Črne sadržavalo je najvišu koncentraciju obtusifolila u ranijem (I), a ulje Rosinjole u srednjem stupnju zrelosti (II), dok je najniža koncentracija u uljima oba spomenuta stupnja pronađena u onome Buže (**Slika 40**). Dok razlika u kasnijem stupnju zrelosti (III) među koncentracijama tog spoja u uljima različitih sorti nije bilo, razlika među relativnim udjelima pronađena je samo u tom stadiju, i to s najvišom vrijednosti u ulju Črne, a najnižom u ulju Buže. Promjene u koncentracijama bile su raznovrsne i ne uvijek značajne, za razliku od konstantnog snižavanja relativnih udjela kroz cijeli ciklus dozrijevanja kod sve tri sorte.

Ulja Rosinjole sadržavala su najvišu koncentraciju β-amirina u sva tri stupnja zrelosti, dok je najniža pronađena u ulju Buže ranijeg (I), odnosno ulju Črne kasnijeg stupnja zrelosti (III) (**Slika 41**). Najviši relativni udio također je pronađen u uljima Rosinjole, a najniži u uljima Črne sva tri stadija zrelosti. Uočen je porast koncentracija β-amirina tijekom dozrijevanja u uljima

Buže i Rosinjole, iako kod potonje ne statistički značajan u kasnijoj fazi (III). U uljima Črne i Rosinjole zabilježeno je sniženje relativnog udjela tog spoja, ponovno bez razlika između ulja Rosinjole srednjeg (II) i kasnijeg stupnja zrelosti (III).

Koncentracija butirospermola bila je najviša u uljima Črne u sve tri faze dozrijevanja, iako ne značajno različita od one pronađene u ulju Rosinjole ranijeg stupnja zrelosti (I) (**Slika 42**). Najniža koncentracija pronađena je u većini slučajeva u ulju Buže. Slično je utvrđeno i za relativne udjele, uz manje razlike kao na primjer najvišu vrijednost pronađenu u ulju Rosinjole ranijeg stupnja zrelosti (I). Koncentracija butirospermola je u uljima sorte Buža porasla u kasnijem stupnju zrelosti u odnosu na srednji (II), dok je kod Rosinjole uočeno sniženje u srednjem (II) u odnosu na raniji stupanj zrelosti (I). Relativni udjeli snižavali su se sa svakom fazom dozrijevanja u uljima sve tri istraživane sorte, s najznačajnijom promjenom u ulju Rosinjole srednjeg (II) u odnosu na rani stupanj zrelosti (I).

U ranijem stupnju zrelosti (I) koncentracija sume gramisterola i cikloeukalenola bila je najviša u ulju Črne, a u preostala dva stupnja u uljima Rosinjole (**Slika 43**). U srednjem (II) i u kasnijem stupnju zrelosti (III) najniža koncentracija pronađena je u uljima sorte Buža. Ulja Črne sadržavala su najviše relativne udjele osim u srednjem stupnju zrelosti (II) u kojem je najviši udio pronađen u ulju Rosinjole. Najniži udio u ranijoj fazi (I) pronađen je u ulju Rosinjole, a u preostalim stupnjevima zrelosti u uljima Buže. Koncentracija sume gramisterola i cikloeukalenola bila je u porastu tijekom dozrijevanja maslina sorte Buža, dok je u uljima Rosinjole zabilježen vrlo izražen porast, nakon kojeg je uslijedilo nešto blaže sniženje koncentracije. Dok je kod potonje sorte sličan obrazac zabilježen i za relativni udio, relativni udio sume gramisterola i cikloeukalenola u uljima Buže i Črne se snižavao tijekom sve tri promatrane faze dozrijevanja.

Ulja sorte Rosinjola sadržavala su najvišu koncentraciju i relativni udio cikloartenola tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja (**Slika 44**). U uljima Buže i Rosinjole zabilježen je konstantan porast koncentracije tijekom dozrijevanja, dok među uljima sorte Črna nije bilo razlika po tom kriteriju. Črna se isticala i na osnovi promjene relativnih udjela: za razliku od konstantnog opadanja zapaženom u ulju te sorte, u uljima preostale dvije sorte zabilježeno je sniženje pa porast udjela.

Koncentracija 24-metilen-cikloartenola bila je najviša u ulju Črne ranijeg (I), ulju Rosinjole srednjeg (II) te ulju Buže kasnijeg stupnja zrelosti (III) (**Slika 45**). Razlike u relativnim udjelima bile su ujednačenije, s najvišim vrijednostima u uljima sorte Buža, a najnižim u uljima sorte Rosinjola tijekom cijelog promatranog razdoblja dozrijevanja. Vrijedi istaknuti niske vrijednosti koncentracije i relativnog udjela u ulju Rosinjole ranijeg stupnja zrelosti (I). Koncentracije i relativni udjeli bili su u porastu tijekom gotovo cijelog ciklusa dozrijevanja osim u završnoj fazi dozrijevanja Rosinjole, s najvećim 'skokom' u uzorcima ulja Rosinjole iz ranog (I) u srednji stupanj zrelosti (II).

Osim u ranijem stupnju zrelosti kada je najviša vrijednost pronađena u ulju Črne, ulja Rosinjole sadržavala su najvišu koncentraciju citrostadienola (**Slika 46**). Najniže koncentracije pronađene su u uljima Buže. Ulja Rosinjole sva tri stupnja zrelosti sadržavala su najviši relativni udio, iako u srednjem stupnju zrelosti (II) ne značajno različit od onog pronađenog u ulju Črne. Ulje Buže imalo je najniži udio citrostadienola u kasnijoj fazi dozrijevanja. Zabilježeno je sniženje koncentracije citrostadienola u ulju Črne kasnijeg (III) te porast u ulju Rosinjole srednjeg stupnja zrelosti (II) u odnosu na prethodni, dok je kod sve tri sorte zabilježeno konstantno snižavanje relativnog udjela tijekom dozrijevanja.

Ukupna koncentracija 4-metil-sterola bila je najviša u ulju Črne ranijeg (I) i u uljima Rosinjole preostala dva stupnja zrelosti (**Slika 47**). U uljima Buže su zabilježene najniže vrijednosti. Ulja Rosinjole sva tri stupnja zrelosti sadržavala su najviši relativni udio, iako u srednjem stupnju zrelosti (II) ne značajno različit od onog pronađenog u ekvivalentnom ulju Črne. Ulja Buže imala su najniži relativni udio tijekom cijelog promatranog razdoblja dozrijevanja. Slično kao i u slučaju glavnog predstavnika 4-metil-sterola, citrostadienola, zabilježen je porast koncentracije ukupnih 4-metil-sterola u ulju Rosinjole srednjeg (II) te sniženje u uljima Črne i Rosinjole kasnijeg stupnja zrelosti (III) u odnosu na prethodni, dok je kod sve tri sorte zabilježeno konstantno snižavanje relativnog udjela tijekom dozrijevanja.

Koncentracija ukupnih 4,4'-dimetil-sterola pratila je onu najzastupljenijeg spoja iz te skupine, 24-metilen-cikloartenola, s najvišom vrijednosti u ulju Črne ranijeg (I), ulju Rosinjole srednjeg (II) te ulju Buže kasnijeg stupnja zrelosti (III) (**Slika 48**). Najviši relativni udio pronađen je u uljima Buže sva tri stupnja zrelosti, a najniži u uljima Rosinjole, osim u slučaju srednjeg stupnja zrelosti (II) kada se nije razlikovao od onog pronađenog u ulju Črne. Koncentracije i relativni udjeli bili su u porastu tijekom cijelog ciklusa dozrijevanja u uljima sve tri izučavane sorte.

Najvišu koncentraciju ukupnih triterpenskih alkohola u ranijem stupnju zrelosti (I) sadržavalo je ulje Črne, u srednjem (II) ulje Rosinjole, dok su u kasnijoj fazi dozrijevanja (III) ulja Buže i Rosinjole bile bogatije tim spojevima od ulja Črne (**Slika 49**). Ulje sorte Buža imalo je najnižu koncentraciju među uljima srednjeg stupnja zrelosti (II). Zabilježen je porast koncentracije ukupnih triterpenskih alkohola tijekom dozrijevanja, najizraženiji u ulju Rosinjole srednjeg (II) u odnosu na raniji stupanj zrelosti (I), odnosno u ulju Buže kasnijeg (III) u odnosu na srednji stupanj zrelosti (II), dok je u slučaju sorte Črna porast bio umjereniji i ne statistički značajan u ranijoj fazi.

O utjecaju sorte

Različiti triterpenski alkoholi, odnosno 4,4′-dimetil-steroli i 4-metil-steroli, a posebno njihovi glavni predstavnici 24-metilen-cikloartenol, cikloartenol odnosno citrostadienol, u ranijim su se istraživanjima pokazali korisni u karakterizaciji i razlikovanju svježih maslinovih ulja na osnovi sortnog podrijetla uglavnom univarijatnim statističkim metodama, dok su u multivarijatnim

modelima korišteni samo u kombinaciji s drugim sastojcima. Isto tako, u prethodnim istraživanjima nije uzimana u obzir unutarsortna varijabilnost zbog stupnja zrelosti (Bianchi i sur., 2001.; Ranalli i sur., 2002.; Giansante i sur., 2003.; Stefanoudaki i sur., 2000.). U ovom radu, najzastupljeniji 4-metil-sterol u istraživanim uljima tijekom cijelog razdoblja dozrijevanja bio je citrostadienol, dok su najzastupljeniji 4,4′-dimetil-steroli bili 24-metilen-cikloartenol i cikloartenol (**Slike 39** – **46**). Isti spojevi također su pronađeni u najvišim koncentracijama među triterpenskim alkoholima u uljima od maslina sorti Picholine i Sayali uzgojenih u Tunisu (Sakouhi i sur., 2009.b; Sakouhi i sur., 2010.a), uljima talijanskih sorti Bosana, Coratina, Dritta, Frantoio, Moraiolo, Provenzale i Leccino (Bianchi i sur., 2001.; Giansante, i sur., 2003.) te u različitim španjolskim maslinovim uljima (Itoh i sur., 1981.), ali u različitim međusobnim relativnim omjerima. U ovom je radu koncentracija ukupnih 4,4′-dimetil-sterola bila otprilike četiri do šest puta viša od one 4-metil-sterola u različitim fazama dozrijevanja (**Slike 47** i **48**), što je odgovaralo literaturnim podacima gdje su Sakouhi i suradnici (2009.b, 2010.a) utvrdili prosječni omjer od približno 3:1.

Kao i u slučaju sterola (4-desmetil-sterola) pretpostavljeno je da su razlike između koncentracija i relativnih udjela triterpenskih alkohola pronađene u uljima različitih sorti u velikoj mjeri bile posljedica različite ekspresije pojedinih gena i proizašle enzimske aktivnosti. Biosinteza triterpenskih alkohola u maslini regulirana je čitavim nizom enzima, gdje je aktivnost svakog od njih snažno predodređena upravo sortnim podrijetlom (Schaller, 2004.). Većina triterpenskih alkohola analiziranih u ovom radu prekursori su jedni drugima, kao i sterolima (**Slika 2**). Tako iz zajedničkog prekursora triterpenoida 2,3-oksidoskvalena nastaje cikloartenol, koji se prevodi u 24-metilen-cikloartenol, iz kojeg redom, jedan iz drugoga, nastaju cikloeukalenol i obtusifoliol, a zatim nakon nekoliko koraka i gramisterol. Gramisterol služi kao zajednički prekursor sterola pa tako u jednoj grani biosintetskog puta preko međuprodukta citrostadienola nastaju 24-etil-steroli, kao što su β-sitosterol i stigmasterol, a u drugoj 24-metil-steroli kao što je kampesterol. Amirini nastaju u drugim granama biosinteze također polazeći iz istog glavnog prekursora, 2,3-oksidoskvalena (Piironen i sur., 2000.; Schaller, 2004.; Rufino-Palomares i sur., 2015.). Moguće je da su, na primjer, viša koncentracija i relativni udio cikloartenola u uljima sorte Rosinjola (**Slika 44**) bili posljedica snažnije ekspresije gena koji reguliraju korake koji prethode sintezi tog spoja i veće aktivnosti odgovarajućih enzima, kao na primjer cikloartenol sintaze (**Slika 2**). S druge strane, niža koncentracija 24-metilen-cikloartenola u uljima iste sorte (**Slika 45**) mogla je biti rezultat slabijeg djelovanja enzima C24-metiltransferaze koja prevodi cikloartenol u 24-metilen-cikloartenol ili pak snažnije aktivnosti različitih enzima koji prevode 24-metilen-cikloartenol u triterpenske alkohole i sterole u daljnjim koracima biosintetskog puta. Viša koncentracija citrostadienola u uljima sorte Rosinjola (**Slika 46**) išla je u prilog toj pretpostavci. Niža koncentracija β-amirina u uljima sorte Črna (**Slika 41**), kao i eritrodiola koji iz njega nastaje, mogla je biti posljedica slabije aktivnosti β-amirin sintaze.

Multivarijatna analiza za razlikovanje na osnovi sorte

S ciljem utvrđivanja pokazatelja sortnog podrijetla među triterpenskim alkoholima (4-metil i 4,4'-dimetil-sterolima) koji su najmanje ovisni o stupnju zrelosti, provedena je PCA analiza s uzorcima svježih ulja. U preliminarnim pokušajima razdvajanja kao varijable su korišteni uglavnom triterpenski alkoholi koji su se u dvosmjernoj analizi varijance pokazali kao najuspješniji u razlikovanju sorti (najviše *F* vrijednosti) te je odabrano pet varijabli s kojima je postignuto najbolje razdvajanje uzoraka na osnovi sorte. Na **Slici 50 a** prikazane su projekcije pojedinih uzoraka istraživanih ulja u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije sastavnice, PC 1 i PC 2, dok su na **Slici 50 b** prikazane projekcije varijabli, odnosno triterpenskih alkohola na osnovi kojih je razdvajanje postignuto. Prve dvije glavne sastavnice zajedno su obuhvaćale 84,59 % ukupne varijance. Uzorci Buže bili su locirani u trećem kvadrantu Kartezijevog sustava te su pozitivno korelirali s relativnim udjelom 24-metilen-cikloartenola te negativno korelirali s ostalim odabranim varijablama. Položaj uzoraka Rosinjole bio je određen s faktorskim opterećenjima koncentracije citrostadienola i relativnim udjelima cikloartenola i β-amirina, dok je za razdvajanje uzoraka Črne od uzoraka ostalih sorti uglavnom bila zaslužna koncentracija butirospermola. Određeni rasap uzoraka pojedinih sorti bio je posljedica utjecaja stupnja zrelosti. Tako su, na primjer, uzorci Rosinjole ranijeg stupnja zrelosti (I) sadržavali više koncentracije butirospermola od ostalih uzoraka iste sorte (**Slika 42**) te su po tom svojstvu bili slični uzorcima Črne u blizini kojih su bili locirani.

Linearna diskriminantna analiza, primijenjena na set podataka koji je sadržavao 18 uzoraka svježih ulja i 16 varijabli (koncentracije i relativni udjeli pojedinačnih triterpenskih alkohola), proizvela je model koji je bio vrlo uspješan u postizanju 100 % ispravne klasifikacije svježih maslinovih ulja na osnovi sorte neovisno o stupnju zrelosti. Jasno razdvajanje uzoraka ulja uzduž prve dvije diskriminantne funkcije na osnovi sorte prikazano je na **Slici 51 a**, dok je projekcija standardiziranih koeficijenata varijabli uključenih u model prikazana na **Slici 51 b**. Model je uključivao pet varijabli. Nakon uključivanja relativnog udjela β-amirina kao prve varijable, 100 % uzoraka Buže (u kojoj su pronađene najniže prosječne vrijednosti) i 100 % uzoraka Rosinjole (koja je sadržavala najviše prosječne vrijednosti) bilo je klasificirano ispravno. Postotak ukupno ispravno klasificiranih uzoraka samo na osnovi relativnog udjela β-amirina iznosio je 88,89 %. Uključivanjem relativnog udjela butirospermola model je ispravno klasificirao i sve ostale uzorke. Osim navedenih varijabli, u model su redom bili odabrani relativni udjeli δ-amirina i citrostadienola te koncentracija β-amirina.

Na temelju rezultata ovog rada i podataka iz do sada provedenih studija može se s vrlo velikom sigurnošću zaključiti da sorta ima presudan utjecaj na koncentracije i relativne udjele triterpenskih alkohola u djevičanskom maslinovom ulju. U ovom radu, najbolje razdvajanje PCA analizom postignuto je uključujući više varijabli, među kojima i glavne, odnosno najzastupljenije triterpenske alkohole, citrostadienol, cikloartenol i 24-metilen-cikloartenol,

(**Slika 50**), dok je LDA analiza izdvojila β-amirin kao varijablu s najvećim potencijalom za sortno razlikovanje (**Slika 51**). Navedeno upućuje na mogućnost da je upravo aktivnost enzima β-amirin sintaze (**Slika 2**) bila najznačajnije uvjetovana sortnim podrijetlom. Bianchi i suradnici (2001.) pokazali su da glavni triterpenski alkoholi, citrostadienol, cikloartenol i 24-metilen-cikloartenol, mogu poslužiti kao varijable s boljim potencijalom za razlikovanje ulja različitih sorti (više *F* vrijednosti) od sterola, triterpenskih diola i alifatskih alkohola na osnovi analize varijance. Međutim, uspješne multivarijatne modele izradili su tek kada su kombinirali sve navedene grupe spojeva zajedno s masnim kiselinama. U drugom istraživanju analizom varijance pronađene su razlike između koncentracija glavnih triterpenskih alkohola u maslinovim uljima tri sorte, ali se ti spojevi nisu pokazali korisnim u razdvajanju na osnovi sorte pomoću kanoničke diskriminantne analize (engl. *Canonical Discriminant Analysis*, *CDA*) kao, na primjer, osnovni parametri kvalitete, masne kiseline, steroli ili senzorna svojstva (Stefanoudaki i sur., 2000.). Ranalli i suradnici (2002.) uspjeli su postići razdvajanje maslinovih ulja sedam talijanskih sorti pomoću PCA analize i kanoničke diskriminantne analize na osnovi kombiniranog sastava triterpenskih i alifatskih alkohola. Giansante i suradnici (2003.) postigli su relativno dobro razdvajanje uzoraka ulja četiri sorte maslina pomoću PCA analize koristeći glavne triterpenske alkohole u kombinaciji s ostalim varijablama. Uspješnost klasifikacije od 96 % LDA analizom na osnovi sorte postignuta je s osam varijabli, među kojima je bio i 24-metilen-cikloartenol.

U literaturi nisu pronađeni primjeri multivarijatnih statističkih modela koji su uspjeli postići razlikovanje, odnosno razdvajanje maslinovih ulja na osnovi sorte samo s podacima o sastavu triterpenskih alkohola, što je postignuto u ovom radu. Važnost uspješnog razlikovanja maslinovih ulja na osnovi sorte multivarijatnim tehnikama u ovom istraživanju (**Slike 50 – 51**) je i u tome što je navedeno postignuto unatoč činjenici da su se uzorci razlikovali po stupnju zrelosti maslina od kojih su proizvedeni te unatoč značajnim interakcijama između sorte i stupnja zrelosti (**Slike 39 – 49**). Navedeno upućuje na zaključak da među triterpenskim alkoholima u maslinovom ulju postoje pokazatelji sorte dovoljno robusni da zadržavaju informaciju o sortnom podrijetlu kroz razdoblje dozrijevanja, što može biti iskorišteno za potvrdu njihove autentičnosti bez obzira na stupanj zrelosti.

O utjecaju stupnja zrelosti

Stiti i suradnici (2007.) utvrdili su konstantan porast koncentracije slobodnih i esterificiranih 4-metil-sterola i 4,4′-dimetil-sterola u plodu masline tijekom dozrijevanja. Isti autori uočili su izraženiji porast koncentracija 24-metilen-cikloartenola i cikloartenola u razdoblju promjene boje pokožice ploda iz zelene u prošaranu, što se podudaralo s početkom sinteze antocijana i gubitkom klorofila. Ovu pojavu Stiti i suradnici (2007.) objasnili su kao posljedicu preusmjeravanja biosinteze ka stvaranju sterola, pri čemu je cikloartenol prekursor 24-metilen-

cikloartenola i jedan od glavnih ranijih biosintetskih međuproizvoda u sintezi sterola. U ovome radu, najviša prosječna ukupna koncentracija sterola pronađena je u uljima proizvedenim od maslina ubranih u srednjem stupnju zrelosti (II) (**Slika 22**) koje su uglavnom bile prošarane (**Tablica 3**), što je išlo u prilog pretpostavci da u tom razdoblju dolazi do intenziviranja njihove sinteze. Pri kraju procesa dozrijevanja masline, Stiti i suradnici (2007.) zabilježili su pojačano nakupljanje 24-metilen-cikloartenola što je ukazalo na moguće usporavanje spomenutog biosintetskog puta. Rezultati ovog istraživanja, s izraženim povišenjem koncentracije 24-metilen-cikloartenola (**Slika 45**) zajedno sa sniženjem koncentracije ukupnih sterola u uljima proizvedenim od maslina ubranih u kasnijem stupnju zrelosti (III) (**Slika 22**), bili su u skladu s takvim rezultatima i u osnovi su potvrdili usporavanje dijela biosinteze sterola u koracima koji slijede nakon sinteze 24-metilen-cikloartenola kao prekursora. Sakouhi i suradnici (2009.b) primijetili su sasvim drugačiju dinamiku promjena koncentracija 4-metil-sterola i 4,4′-dimetil-sterola tijekom dozrijevanja maslina, s puno više fluktuacija i s obrnuto proporcionalnim koncentracijama cikloartenola i 24-metilen-cikloartenola tijekom cijelog praćenog razdoblja. Utvrđene razlike još su jednom potvrdile ključan utjecaj sorte i drugih faktora na dinamiku dozrijevanja i sinteze triterpenskih alkohola u maslini. Triterpenski alkoholi sastojci su površinskih voskova ploda masline (Stiti i sur., 2012.) pa je povišenje njihove koncentracije u uljima od zrelih maslina (III) (**Slike 47 – 49**) djelomično moglo biti i rezultat njihove bolje ekstrakcije tijekom mljevenja takve, krhkije pokožice (Sanchez Casas i sur., 2004.).

Multivarijatna analiza za razlikovanje na osnovi stupnja zrelosti

S ciljem utvrđivanja pokazatelja stupnja zrelosti među triterpenskim alkoholima koji su najmanje ovisni o sorti provedena je PCA analiza s uzorcima svježih ulja. U svojstvu varijabli iskorišteno je sedam triterpenskih alkohola koji su se u analizi varijance pokazali kao najuspješniji u razlikovanju stupnja zrelosti (najviše *F* vrijednosti). Prve dvije glavne sastavnice zajedno su obuhvaćale 92,24 % ukupne varijance. Iako je razdvajanje bilo relativno uspješno, utvrđen je određen rasap uzoraka kao posljedica sortnog podrijetla (**Slika 52**). Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti postignuto je uglavnom uzduž PC1, gdje su varijable s pozitivnim faktorskim opterećenjima, kao što su relativni udjeli obtusifoliola, δ-amirina, citrostadienola i β-amirina bili karakteristični za uzorke ranijeg stupnja zrelosti (I), dok su uzorci kasnijeg stupnja zrelosti (III) korelirali s varijablama s negativnim faktorskim opterećenjem na PC 1, kao što su relativni udio i koncentracija 24-metilen-cikloartenola i koncentracija cikloartenola. Uzorci srednjeg stupnja zrelosti (II) bili su smješteni između njih.

Primjenom LDA analize sa stupnjem zrelosti kao grupirajućim faktorom na set s 18 svježih ulja i 16 varijabli postignuta je 100 % ispravna klasifikacija. Razdvajanje uzoraka i projekcije uključenih varijabli prikazani su na **Slici 53**. Izrađeni model odabrao je pet varijabli. Prva varijabla uključena u model bio je relativni udio obtusifoliola čime je postignuta ispravna klasifikacija 100 % uzoraka srednjeg stupnja zrelosti (II) te 83,33 % ispravna klasifikacija svih uzoraka. Ispravna klasifikacija preostalih uzoraka postignuta je uključivanjem relativnih udjela δ-amirina i butirospermola, dok je uključenje koncentracije citrostadienola i relativnog udjela zbroja gramisterola i cikloeukalenola dodatno poboljšalo uspješnost modela. Prosječni relativni udjeli obtusifoliola, δ-amirina i butirospermola bili su najviši u uzorcima ranijeg (I), a najniži u uzorcima kasnijeg stupnja zrelosti (III).

U postizanju uspješnog razlikovanja maslinovih ulja različitih sorti na osnovi stupnja zrelosti kao važni su se ponovno, kao i u slučaju razlikovanja na osnovi sorte, pokazali glavni triterpenski alkoholi, ali ovaj put u kombinaciji s drugim spojevima iz ove skupine. Navedeno je posebno došlo do izražaja u LDA analizi gdje su primat kao najvažniji triterpenski alkoholi za razdvajanje preuzeli manje zastupljeni obtusifoliol, δ-amirin i butirospermol. Navedeno upućuje na zaključak da navedeni spojevi pokazuju sličnu dinamiku promjena prilikom dozrijevanja u maslinama različitih sorti, odnosno da su njihovi profili karakteristični za određeni stupanj zrelosti maslina te da bi mogli poslužiti kao dovoljno pouzdani pokazatelji stupnja zrelosti bez obzira na sortno podrijetlo. U do danas objavljenoj literaturi nisu pronađeni slični statistički modeli.

5.4. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA SASTAV STEROLA I TRITERPENSKIH DIOLA

Prosječne koncentracije (mg/100 g ulja) i relativni udjeli (%) sterola i triterpenskih diola u maslinovim uljima hrvatskih sorti Buža, Črna i Rosinjola proizvedenim od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I, II i III) i skladištenim na tri temperature (promjenjiva sobna temperatura, temperatura hlađenja od + 4 °C i temperatura zamrzavanja od - 20 °C) prikazani su u **Tablicama 5** i **6**. Jednosmjernom analizom varijance međusobno su za svaki tretman, odnosno ulje određene kombinacije sorte i stupnja zrelosti, uspoređene prosječne vrijednosti u svježem ulju i uljima skladištenim na tri temperature.

Iako su u brojnim slučajevima utvrđene statistički značajne razlike, one su po svojim apsolutnim vrijednostima uglavnom bile relativno male u odnosu na one uzrokovane sortom i/ili stupnjem zrelosti. Za većinu sterola i triterpenskih diola utvrđene su različite promjene ovisno o tretmanu, odnosno kombinaciji utjecaja određene sorte i stupnja zrelosti, pa u tim slučajevima nisu zabilježene pravilnosti vezane uz temperaturu skladištenja. U slučajevima kada su nakon razdoblja skladištenja od 12 mjeseci zabilježene značajne razlike, za koncentracije glavnih sterola kao što su β-sitosterol i Δ^5-avenasterol te ukupnog β-sitosterola i ukupnih sterola uglavnom je zabilježeno sniženje. Nije utvrđen izražen utjecaj temperature skladištenja koji se ponavlja. Navedeno je bilo u skladu s rezultatima Thanha i suradnika (2006.) koji su zabilježili sniženje razine β-sitosterola od 16,5 % nakon skladištenja maslinovog ulja na sobnoj temperaturi u razdoblju od šest mjeseci. Isti autori utvrdili su postojanost razina β-sitosterola, kampesterola i stigmasterola u maslinovom ulju nakon nekoliko tjedana na 55 °C te sniženje njihovih količina za oko 60 % nakon jednog sata na 200 °C. Promjene u relativnim udjelima β-sitosterola, Δ^5-avenasterol te ukupnog β-sitosterola bile su slabije izražene, bez uočenih pravilnosti. Za $\Delta^{5,24}$-stigmastadienol je u više slučajeva utvrđeno sniženje koncentracije i relativnog udjela u skladištenim u odnosu na svježa ulja, što je posebno bilo izraženo u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) sve tri sorte. Također, spomenuta promjena bila je izraženija u uljima skladištenim na + 4 °C i - 20 °C uz nekoliko iznimki. S druge strane, pojava $\Delta^{5,23}$-stigmastadienola, koji je u svježim uljima identificiran samo kod sorte Rosinjola srednjeg stupnja zrelosti (II), utvrđena je u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) sorti Buža i Rosinjola skladištenim na sobnoj temperaturi i uzorcima Rosinjole III skladištenim na temperaturi zamrzavanja, kao i u uljima Rosinjole ranijeg stupnja zrelosti (I) skladištenim na temperaturi hlađenja i temperaturi zamrzavanja. U brojnim uzorcima zabilježen je porast koncentracije i relativnog udjela Δ^7-stigmastenola nakon razdoblja skladištenja. Abu-Alruz i suradnici (2011.) također su zabilježili porast relativnog udjela Δ^7-stigmastenola nakon skladištenja maslinovog ulja u različitim spremnicima tijekom šest mjeseci. Kod sve tri sorte spomenuta promjena bila je najizraženija u uljima kasnijeg stupnja zrelosti (III) skladištenim na

sobnoj temperaturi (**Tablice 5** i **6**). Moguće je da su ulja kasnijeg stupnja zrelosti (III) sadržavala niže koncentracije ostalih zaštitnih antioksidansa, poput fenola koji nisu analizirani u okviru ovog rada, a za koje je poznato da pokazuju trend opadanja koncentracije tijekom dozrijevanja (Alagna i sur., 2012.). U takvim je uljima, posebno na sobnoj temperaturi, zaštita od oksidacije i ostalih promjena vjerojatno bila slabija što je moglo dovesti do zabilježenih promjena u sastavu sterola tijekom skladištenja.

S ciljem boljeg sagledavanja promjena u sastavu sterola i triterpenskih diola kao posljedice skladištenja, odnosno temperature na kojem je ono provedeno, provedena je PCA analiza s uzorcima svježih i skladištenih ulja. Nakon preliminarnih pokušaja, odabran je model za koji su kao varijable poslužili steroli i triterpenski dioli, njih 10, s najvišim *F*-vrijednostima u jednosmjernoj analizi varijance s temperaturom skladištenja kao faktorom (rezultati nisu prikazani). Na **Slici 54 a** prikazane su projekcije pojedinih uzoraka istraživanih ulja u dvodimenzionalnom prostoru uvjetovanom s PC 1 i PC 2, dok su na **Slici 54 b** prikazane projekcije varijabli, odnosno sterola i triterpenskih diola na osnovi kojih je razdvajanje postignuto. Prve dvije glavne sastavnice zajedno su obuhvaćale 71,61 % ukupne varijance. Skladišteni uzorci međusobno nisu bili dobro razdvojeni, iako je uočena tendencija grupiranja ulja skladištenih na sobnoj temperaturi u trećem, a ulja skladištenih na - 20 °C u prvom kvadrantu Kartezijevog sustava. Međutim, svježa ulja bila su relativno dobro razdvojena od brojnije grupe skladištenih ulja. Bila su locirana uglavnom u drugom kvadrantu s negativnim faktorskim opterećenjem uzduž PC 1 i pozitivnim faktorskim opterećenjem uzduž PC 2, što je značilo da je razdvajanje postignuto uzduž obje glavne sastavnice. Uzorci svježih ulja korelirali su s višim koncentracijama β-sitosterola i Δ^5-avenasterola, koncentracijom i relativnim udjelom $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola te koncentracijom i posebno relativnim udjelom ukupnog β-sitosterola. S druge strane, svježa ulja bila su karakterizirana nižim koncentracijama i relativnim udjelima Δ^7-stigmastenola koji je uglavnom korelirao sa skladištenim uzorcima, što je odgovaralo rezultatima jednosmjerne analize varijance (**Tablice 5** i **6**).

S ciljem lakšeg prepoznavanja možebitnih zajedničkih značajki i promjena u sastavu sterola i triterpenskih diola u uljima skladištenim na istoj temperaturi neovisno o sorti i stupnju zrelosti, podaci su obrađeni i LDA analizom s temperaturom skladištenja kao grupirajućim faktorom. LDA analiza primijenjena je na set koji je uključivao 18 uzoraka svježih i 54 uzorka skladištenih ulja te 34 varijable (koncentracije i relativni udjeli pojedinačnih sterola i triterpenskih diola te ukupnog β-sitosterola). Takav model izdvojio je šest varijabli i postigao ispravnu klasifikaciju 100 % svježih ulja i 100 % ulja skladištenih na - 20 °C, odnosno 86,11 % svih uzoraka ulja na osnovi temperature skladištenja. Prva odabrana varijabla bila je koncentracija $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola nakon čega je 56,94 % svih uzoraka bilo ispravno klasificirano. Ni jedan od pogrešno klasificiranih skladištenih uzoraka nije bilo uvršten u grupu svježih ulja. Razdvajanje uzoraka ulja LDA analizom u dvodimenzionalnom prostoru definiranom s prve dvije

diskriminantne funkcije na osnovi temperature skladištenja prikazano je **Slici 55 a**, dok je projekcija standardiziranih koeficijenata varijabli uključenih u model prikazana na **Slici 55 b**. Uočeno je relativno dobro međusobno razdvajanje svježih ulja, ulja skladištenih na promjenjivoj sobnoj temperaturi i ulja skladištenih na - 20 °C što je, unatoč rezultatima analize varijance i PCA analize koji nisu bili jednoznačni, potvrdilo da ne samo skladištenje, već i temperatura skladištenja ima određen utjecaj na koncentracije i relativne udjele pojedinih sterola i triterpenskih diola.

Postojanost sterola i triterpenskih diola kao pokazatelja sorte i stupnja zrelosti nakon razdoblja skladištenja – multivarijatna analiza

S ciljem utvrđivanja postojanosti sterola i triterpenskih diola kao pokazatelja sortnog podrijetla koji su najmanje ovisni o stupnju zrelosti, ali i o vremenu i uvjetima skladištenja maslinovog ulja, provedena je PCA analiza s uzorcima 18 svježih i 54 skladištena ulja. Nakon preliminarnih pokušaja, relativno uspješno razdvajanje uzoraka ulja na osnovi sorte postignuto je s 10 odabranih varijabli (**Slika 56**). Prve dvije glavne sastavnice zajedno su sadržavale 78,60 % ukupne varijance. Svih 10 upotrijebljenih varijabli prethodno se pokazalo korisnim za razdvajanje svježih ulja na osnovi sorte (**Slika 23**) te su ulja pojedinih sorti bila povezana s istim varijablama: ulja Buže korelirala su s višim relativnim udjelima kolesterola i eritrodiola. B-sitosterol, Δ^5-avenasterol (kao i ukupni β-sitosterol), klerosterol, $\Delta^{5,24}$-stigmastadienol i 24-metilen-kolesterol potvrdili su se kao karakteristični za ulja od Črne, dok su se ulja od Rosinjole razdvojila na osnovi faktorskih opterećenja relativnog udjela i koncentracije kampesterola (**Slika 23**). Navedeno upućuje na zaključak da promjene tijekom starenja ulja nisu značajnije utjecale na njihov potencijal kao pokazatelja sortnog podrijetla. S druge strane, relativni udio kampestanola i koncentracija uvaola koji su se pokazali korisnim u razdvajanju svježih ulja (**Slika 23**), nisu doprinijeli uspješnosti PCA analize kada su u model uključena i skladištena ulja.

Da bi se potvrdila mogućnost uspješne statističke klasifikacije i diferencijacije te učinkovitost pokazatelja sortnog podrijetla i u svježim i u skladištenim maslinovim uljima, LDA analiza primijenjena je na set podataka dobiven analizom 18 svježih i 54 skladištenih ulja te 34 varijable (koncentracije i relativni udjeli pojedinačnih sterola i triterpenskih diola i ukupnog β-sitosterola). Model u kojem je sorta odabrana kao grupirajući faktor postigao je 100 % točnu klasifikaciju maslinovih ulja na osnovi sorte neovisno o stupnju zrelosti i vremenu, odnosno temperaturi skladištenja. Razdvajanje uzoraka i projekcija standardiziranih koeficijenata uključenih varijabli prikazani su na **Slici 57**. Izdvojene su iste tri varijable koje su se prethodno pokazale učinkovitim u razdvajanju svježih ulja na osnovi sorte (**Slika 24**), uz razliku da je model sa skladištenim uljima umjesto relativnog udjela uključio koncentraciju Δ^5-avenasterola. Varijabla koja je prva uključena u model bila je koncentracija β-sitosterola, što je ispravno

klasificiralo sve uzorke sorte Črna i čak 90,28 % svih uzoraka iz seta. Uključivanje relativnog udjela kampesterola klasificiralo je ispravno i sve uzorke Buže, dok je uključivanjem posljednje varijable, koncentracije Δ^5-avenasterola, bilo moguće ispravno klasificirati sve uzorke na osnovi sortnog podrijetla. Kao i kod svježih ulja, najviše koncentracije β-sitosterola i Δ^5-avenasterola pronađene su u uljima od sorte Črna, a najniži u uljima Buže, dok je udio kampesterola bio najviši u uljima Rosinjole, a najniži u uljima od sorte Črna.

S ciljem utvrđivanja postojanosti sterola i triterpenskih diola kao pokazatelja stupnja zrelosti koji su najmanje ovisni o sorti, ali i o vremenu i uvjetima skladištenja ulja, provedena je PCA analiza s uzorcima 18 svježih i 54 skladištena ulja. Nakon preliminarnih pokušaja, razdvajanje uzoraka ulja na osnovi stupnja zrelosti postignuto je sa sedam odabranih varijabli (**Slika 58**). Iako su tendencije grupiranja uzoraka na osnovi stupnja zrelosti bile vrlo jasne, razdvajanje nije bilo potpuno te je utvrđeno manje preklapanje uzoraka različitih stupnjeva zrelosti. Prve dvije glavne sastavnice zajedno su sadržavale 86,77 % ukupne varijance. Neke od sedam odabranih varijabli, kao što su koncentracija ukupnog β-sitosterola te relativni udjeli Δ^5-avenasterola, 24-metilen-kolesterola i eritrodiola, prethodno su se pokazale korisnim za razdvajanje svježih ulja na osnovi stupnja zrelosti (**Slika 25**), dok su neke varijable izgubile svoj potencijal za razdvajanje te nisu uključene u model sa skladištenim uzorcima. Uvedene su određene nove varijable koje su poboljšale razdvajanje, kao što su omjeri 24-metilen-kolesterola i β-sitosterola, stigmasterola i Δ^7-kampesterola te kampestanola i stigmasterola.

Utvrđen je značajan rasap uzoraka sva tri stupnja zrelosti kao posljedica sortnog podrijetla. Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti postignuto je uglavnom uzduž PC1, gdje je jedino omjer kampestanola i stigmasterola uvjetovao razdvajanje uzoraka ranijeg stupnja zrelosti (I), dok su više vrijednosti varijabli s negativnim faktorskim opterećenjima, kao što su koncentracija 24-metilen-kolesterol, relativni udjeli Δ^5-avenasterola i eritrodiola te omjeri 24-metilen-kolesterola i β-sitosterola, odnosno stigmasterola i Δ^7-kampesterola, bili karakteristični za uzorke kasnijeg stupnja zrelosti (III). Kao i kod svježih ulja, uzorci iz srednjeg stupnja zrelosti (II) bili su smješteni između druga dva stupnja zrelosti, oko sjecišta osi PC 1 i PC2, uz nekoliko iznimki.

Linearna diskriminantna analiza sa stupnjem zrelosti kao grupirajućim faktorom primijenjena je na set podataka s 18 svježih i 54 skladištena ulja te 34 varijable. Postignuta je ispravna klasifikacija od 97,22 % (**Slika 59**). Dva uzorka srednjeg stupnja zrelosti (II) pogrešno su klasificirana kao po uzorak iz ranijeg (I), odnosno kasnijeg stupnja zrelosti (III). Dobiveni rezultat upućivao je na to da su promjene tijekom skladištenja ipak donekle utjecale na stabilnost, odnosno učinkovitost pokazatelja stupnja zrelosti među sterolima i triterpenskim diolima utvrđenim za svježa ulja. Navedeno je potvrdio i odabir varijabli koje su se samo djelomično podudarale s onima učinkovitim za klasifikaciju svježih ulja (**Slika 26**). Model je uključivao, redom: omjer 24-metilen-kolesterola i β-sitosterola, koncentracije eritrodiola i Δ^7-

avenasterola, relativni udio 24-metlien-kolesterola, stigmasterola i uvaola te, kao posljednju varijablu, koncentraciju Δ^7-stigmastenola.

5.5. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA SASTAV ALIFATSKIH ALKOHOLA

Prosječne koncentracije (mg/100 g ulja) i relativni udjeli (%) alifatskih alkohola u maslinovim uljima hrvatskih sorti Buža, Črna i Rosinjola proizvedenim od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I, II i III) i skladištenim na tri temperature (promjenjiva sobna temperatura, temperatura hlađenja od + 4 °C i temperatura zamrzavanja od - 20 °C) prikazani su u **Tablici 7**.

Promjene uzrokovane skladištenjem zabilježene su samo sporadično za pojedine alifatske alkohole. Nisu utvrđeni značajniji ponavljajući obrasci, iako se u većini slučajeva u kojima su zabilježene statistički značajne razlike radilo o sniženju koncentracija. Promjene relativnih udjela bile su slabije izražene (**Tablica 7**). Među mogućim uzrocima promjena vrijedi istaknuti degradaciju alifatskih alkohola zbog njihove oksidacije u odgovarajuće aldehide i masne kiseline i esterifikaciju s masnim kiselinama u voskove (Mariani i Venturini, 2006.). S druge strane, njihova koncentracija mogla je porasti kao posljedica razgradnje duljih masnih kiselina (Caradec i sur., 2004.) ili pak hidrolizom voskova (Mariani i sur., 2018.).

S ciljem boljeg sagledavanja promjena u sastavu alifatskih alkohola kao posljedice skladištenja, odnosno temperature na kojem je ono provedeno, provedena je PCA analiza s uzorcima svježih i skladištenih ulja. Međutim, nakon brojnih pokušaja nije postignuto vidljivo razdvajanje te rezultati PCA analize nisu prikazani.

S ciljem prepoznavanja možebitnih zajedničkih značajki i promjena u sastavu alifatskih alkohola u uljima skladištenim na istoj temperaturi neovisno o sorti i stupnju zrelosti, podaci su obrađeni i LDA analizom s temperaturom skladištenja kao grupirajućim faktorom. LDA analiza primijenjena je na set koji je uključivao 18 uzoraka svježih i 54 uzorka skladištenih ulja te 14 varijabli (koncentracije i relativni udjeli pojedinačnih alifatskih alkohola). Takav model izdvojio je 13 varijabli i postigao ispravnu klasifikaciju samo 78,33 % svih uzoraka ulja na osnovi temperature skladištenja. Nepotpuno razdvajanje uzoraka ulja LDA analizom na osnovi temperature skladištenja prikazano je **Slici 60 a**, dok su varijable uključene u model prikazane na **Slici 60 b**. Unatoč slabom međusobnom razdvajanju različitih grupa ulja, uočene su tendencije razdvajanja svježih ulja od ostalih, kao i uzoraka skladištenih na sobnoj temperaturi od onih skladištenih na - 20 °C.

Postojanost alifatskih alkohola kao pokazatelja sorte i stupnja zrelosti nakon 12 mjeseci skladištenja – multivarijatna analiza

S ciljem utvrđivanja postojanosti alifatskih alkohola kao pokazatelja sortnog podrijetla koji su najmanje ovisni o stupnju zrelosti, ali i o vremenu i uvjetima skladištenja ulja, provedena je PCA analiza s uzorcima 18 svježih i 54 skladištena ulja. Nakon preliminarnih pokušaja, relativno uspješno, ali ipak nepotpuno razdvajanje uzoraka ulja na osnovi sorte postignuto je

s pet odabranih varijabli (**Slika 61 a**). Prve dvije glavne sastavnice zajedno su sadržavale 95,44 % ukupne varijance. Tri od pet upotrijebljenih varijabli prethodno su se pokazale korisnim za razdvajanje svježih ulja na osnovi sorte i to koncentracija i relativni udio pentakozanola te koncentracija heptakozanola (**Slika 61 b**). Navedeno upućuje na zaključak da promjene tijekom starenja ulja nisu značajnije utjecale na njihov potencijal kao pokazatelja sortnog podrijetla. Svježi i skladišteni uzorci ulja od sorte Buža bili su smješteni u prvom i četvrtom kvadrantu Kartezijevog koordinatnog sustava s pozitivnim PC 1 vrijednostima te su negativno korelirali sa svim odabranim varijablama. Za razdvajanje uzoraka Črne od ostalih najzaslužnija varijabla bio je relativni udio pentakozanola, dok je odvajanje uzoraka Rosinjole bilo snažno uvjetovano položajem heksakozanola, heptakozanola i oktakozanola s negativnim faktorskim opterećenjima na PC1.

Da bi se potvrdila mogućnost uspješne statističke klasifikacije i diferencijacije te učinkovitost pokazatelja sortnog podrijetla u svježim i u skladištenim maslinovim uljima, LDA analiza primijenjena je na set podataka s 18 svježih i 54 skladištena ulja te 14 varijabli (koncentracije i relativni udjeli pojedinačnih alifatskih alkohola). Takav model postigao je 100 % ispravnu klasifikaciju maslinovih ulja na osnovi sorte neovisno o stupnju zrelosti i vremenu, odnosno temperaturi skladištenja. Razdvajanje uzoraka i projekcija standardiziranih koeficijenata uključenih varijabli prikazani su na **Slici 62 a**. Izdvojene su tri od četiri varijable koje su se prethodno pokazale učinkovitim u razdvajanju svježih ulja na osnovi sorte (**Slika 62 b**), uz razliku da je umjesto koncentracije tetrakozanola model sa skladištenim uljima uključio relativni udio heksakozanola. Prve dvije varijable uključene u model bile su koncentracija i relativni udio pentakozanola, što je ispravno klasificiralo 90,28 % svih uzoraka iz seta, dok je uključivanje preostale dvije varijable rezultiralo ispravnom klasifikacijom i preostalih uzoraka.

Kao i kod svježih ulja, najniža koncentracija pentakozanola pronađena je u uljima sorte Buža, dok je najviši relativni udio istog alifatskog alkohola bio karakterističan za ulja sorte Črna. Dokozanol je pokazivao tendenciju ka najnižoj koncentraciji u uzorcima od sorte Črna.

S ciljem utvrđivanja postojanosti alifatskih alkohola kao pokazatelja stupnja zrelosti koji su najmanje ovisni o sorti, ali i o vremenu i uvjetima skladištenja ulja, provedena je PCA analiza s uzorcima 18 svježih i 54 skladištena ulja. Nakon preliminarnih pokušaja, slabo razdvajanje uzoraka ulja na osnovi stupnja zrelosti postignuto je sa šest odabranih varijabli (**63 a**). Prve dvije glavne sastavnice zajedno su sadržavale 87,65 % ukupne varijance. Varijable su uglavnom odabrane na osnovi njihove uspješnosti u razdvajanju na osnovi stupnja zrelosti analizom varijance (na osnovi visokih *F* vrijednosti), ali u kombinaciji s drugim odabranim varijablama s ciljem postizanja vizualno što uočljivijeg razdvajanja uzoraka na osnovi tog faktora. Četiri od osam odabranih varijabli, kao što su koncentracija i relativni udio pentakozanola, koncentracija dokozanola te relativni udio oktakozanola, prethodno su se

pokazale korisnim za razdvajanje svježih ulja na osnovi stupnja zrelosti (**Slika 63 b**). Ostale varijable su uvedene kako bi donekle poboljšale razdvajanje.

Tendencije grupiranja uzoraka na osnovi stupnja zrelosti mogle su se nazrijeti, pa se, na primjer, položaji uzoraka ranijeg (I) i kasnijeg (III) stupnja zrelosti uglavnom nisu preklapali. S druge strane, položaji uzoraka srednjeg stupnja zrelosti (II) preklapali su se s uzorcima iz ostalih grupa. Uočen je i nastanak međusobno razdvojenih manjih klastera unutar svake pojedine grupe, najvjerojatnije pod utjecajem sortnog podrijetla. Na osnovi prethodne analize i dobivenih podataka pretpostavljen je snažan utjecaj sorte, ali i određen utjecaj vremena i uvjeta skladištenja, što je rezultiralo gubitkom dijela informacije o stupnju zrelosti sadržane u sastavu alifatskih alkohola. Ipak, uzorci ranijeg stupnja zrelosti (I) težili su razdvajanju prema negativnim vrijednostima PC 1, pri čemu su donekle korelirali s koncentracijom i relativnim udjelom pentakozanola i relativnim udjelom oktakozanola. S druge strane, uzorci kasnijeg stupnja zrelosti (III) grupirali su se uglavnom prema pozitivnim vrijednostima PC 1 te su bili karakterizirani varijablama s visokim pozitivnim faktorskim opterećenjem na PC 1, koncentracijom dokozanola i relativnim udjelima trikozanola i tetrakozanola.

Kada je LDA analiza primijenjena na set podataka s 18 svježih i 54 skladištena ulja i 14 varijabli sa stupnjem zrelosti kao grupirajućim faktorom, postignuta je ispravna klasifikacija većine ulja uključenih u istraživanje, njih 83,33 %. Ispravno je klasificirano 91,67 % uzoraka stupnja zrelosti I, 83,33 % uzoraka stupnja zrelosti II te samo 75,00 % uzoraka stupnja zrelosti III. Svi pojedinačni slučajevi pogrešne klasifikacije odnosili su se na susjedne grupe (npr. uzorak stupnja zrelosti I pogrešno klasificiran kao uzorak stupnja zrelosti II). Razdvajanje uzoraka i projekcija standardiziranih koeficijenata uključenih varijabli prikazani su na **Slici 64 a**. Model je odabrao šest varijabli, od kojih su se tri prethodno pokazale učinkovitim u razdvajanju svježih ulja na osnovi stupnja zrelosti (**Slika 64 b**) i to koncentracija pentakozanola te relativni udjeli trikozanola i oktakozanola. Umjesto relativnog udjela, za razdvajanje svježih i skladištenih ulja model je uključio koncentraciju dokozanola, dok su preostale dvije uključene varijable bili relativni udjeli tetrakozanola i pentakozanola.

Tendencije grupiranja uzoraka na osnovi stupnja zrelosti mogle su se nazrijeti, pa se tako položaji uzoraka ranijeg (I) i kasnijeg (III) stupnja zrelosti nisu preklapali. S druge strane, uzorci srednjeg stupnja zrelosti (II) preklapali su se s uzorcima iz ostalih grupa. Potvrđen je snažan utjecaj sorte, ali i određen utjecaj vremena i uvjeta skladištenja, što je rezultiralo gubitkom dijela informacije o stupnju zrelosti sadržane u sastavu alifatskih alkohola.

Unatoč interakciji s faktorom sortnog podrijetla, na osnovi prethodne analize i podataka moglo se uočiti da su prosječna koncentracija dokozanola i relativnih udjeli trikozanola i tetrakozanola uglavnom bili u porastu, dok su relativni udjeli pentakozanola i oktakozanola pokazivali tendenciju snižavanja vrijednosti promjenama stupnja zrelosti od I do III.

5.6. UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA SASTAV TRITERPENSKIH ALKOHOLA

Prosječne koncentracije (mg/100 g ulja) i relativni udjeli (%) triterpenskih alkohola u maslinovim uljima hrvatskih sorti Buža, Črna i Rosinjola proizvedenim od maslina ubranih u tri različita stupnja zrelosti (I, II i III) i skladištenim na tri temperature (promjenjiva sobna temperatura, temperatura hlađenja od + 4 °C i temperatura zamrzavanja od - 20 °C) prikazani su u **Tablicama 8** i **9**.

Promjene uzrokovanje skladištenjem zabilježene su sporadično i za većinu triterpenskih alkohola nisu utvrđeni ponavljajući obrasci. U nekoliko ulja zabilježen je porast koncentracije δ-amirina nakon skladištenja na promjenjivoj sobnoj temperaturi. Najizraženije promjene utvrđene su za obtusifoliol. Koncentracija i relativni udio tog spoja porasli su u više uzoraka ulja sorti Buže i Črne, iako u pojedinim slučajevima bez statističke značajnosti. Navedeni porast bio je izraženiji u uljima skladištenim pri - 20 °C, osim kod pojedinih ulja sorte Rosinjola. Zbroj relativnih udjela gramisterola i i cikloeukalenola u više je slučajeva bio viši u svježim uljima i uljima skladištenim na sobnoj temperaturi u odnosu na ulja skladištena na temperaturama + 4 °C i - 20 °C. U više uzoraka skladištenih na - 20 °C zabilježeno je sniženje relativnog udjela citrostadienola. U uljima Rosinjole zabilježene su izraženije promjene koncentracija ukupnih 4-metil-sterola, 4,4'-dimetil-sterola, kao i ukupnih triterpenskih alkohola. Dok je u više slučajeva nakon skladištenja na sobnoj temperaturi zabilježeno povišenje ukupnih koncentracija tih grupa spojeva, u uljima skladištenim na - 20 °C više je puta zabilježen njihov pad. Promjene relativnih udjela ukupnih 4-metil-sterola i 4,4'-dimetil-sterola bile su obrnuto proporcionalne. Zabilježena je pravilnost porasta udjela prve i sniženja relativnog udjela druge skupine u uljima skladištenim na sobnoj temperaturi, dok je obrnuto utvrđeno u više ulja skladištenih na - 20 °C. Bilo je i iznimki (**Tablice 8** i **9**). U postojećoj literaturi nisu pronađeni podaci o promjenama triterpenskih alkohola tijekom skladištenja maslinovog ulja i sličnih matrica. Pretpostavljeni mogući uzroci zapaženih promjena bile su različite kemijske, ali i mikrobiološki potaknute transformacije, uključujući oksidaciju, međusobne konverzije različitih triterpenskih alkohola i sterola uslijed zaostale enzimatske aktivnosti, cijepanje glikozidnih i esterskih veza i oslobađanje slobodnih triterpenskih alkohola, ali i njihove reakcije i vezanje s drugim spojevima iz maslinovog ulja (Muffler i sur., 2011.).

S ciljem boljeg sagledavanja promjena u sastavu triterpenskih alkohola kao posljedice skladištenja, odnosno temperature na kojem je ono provedeno, provedena je PCA analiza s uzorcima svježih i skladištenih ulja. Za varijable su odabrani triterpenski alkoholi s najvišim *F*-vrijednostima u jednosmjernoj analizi varijance s temperaturom skladištenja kao faktorom (rezultati nisu prikazani). Na **Slici 65 a** prikazane su projekcije pojedinih uzoraka istraživanih ulja uzduž PC 1 i PC 2, dok su na **Slici 65 b** prikazane projekcije varijabli, odnosno triterpenskih

alkohola na osnovi kojih je razdvajanje postignuto. Prve dvije glavne sastavnice zajedno su obuhvaćale 77,85 % ukupne varijance. Za razliku od sterola i triterpenskih diola, zapažene su relativno jasne tendencije međusobnog razdvajanja grupa skladištenih uzoraka, dok se položaj grupe svježih ulja preklapao s uljima skladištenim na promjenjivoj sobnoj temperaturi. Posljednje dvije spomenute grupe korelirale su sa zbrojem koncentracija, a posebno sa zbrojem relativnih udjela gramisterola i cikloeukalenola. Uzorci skladišteni na + 4 °C bili su povezani s cikloartenolom i citrostadienolom, dok su uzorci ulja skladištenih na - 20 °C bili jasno određeni povišenim relativnim udjelom obtusifoliola (**Tablice 8** i **9**).

S ciljem lakšeg prepoznavanja možebitnih zajedničkih značajki i promjena u sastavu triterpenskih alkohola u uljima skladištenim na istoj temperaturi neovisno o sorti i stupnju zrelosti, podaci su obrađeni i LDA analizom s temperaturom skladištenja kao grupirajućim faktorom. LDA analiza primijenjena je na set koji je uključivao 18 uzoraka svježih i 54 uzorka skladištenih ulja te 16 varijabli (koncentracije i relativni udjeli pojedinačnih triterpenskih alkohola). Takav model izdvojio je 13 varijabli i postigao ispravnu klasifikaciju 100 % ulja skladištenih na + 4 °C i 100 % ulja skladištenih na - 20 °C, odnosno 94,44 % svih uzoraka ulja na osnovi temperature skladištenja. Klasifikacija sa spomenutim stupnjem ispravnosti postignuta je već nakon uvrštenja prvih osam varijabli i to redom: relativnog udjela obtusifoliola, zbroja relativnih udjela gramisterola i cikloeukalenola, koncentracije butirospermola, relativnog udjela δ-amirina te koncentracija cikloartenola, δ-amirina, gramisterola + cikloeukalenola i obtusifoliola. Relativni udio obtusifoliola se potvrdio kao varijabla na koju temperatura skladištenja može značajno utjecati, jer je nakon njegovog uvrštenja u model kao prve varijable ispravno klasificirano 77,78 % uzoraka svježih ulja i 83,33 % uzoraka skladištenih na temperaturi od - 20 °C. Razdvajanje uzoraka ulja LDA analizom na osnovi temperature skladištenja prikazano je **Slici 66 a**, dok su varijable uključene u model prikazane na **Slici 66 b**. Uočeno je relativno dobro međusobno razdvajanje sve četiri grupe ulja, uz određeni stupanj preklapanja svježih ulja s uljima skladištenim na + 4 °C. Multivarijatna analiza potvrdila je da ne samo skladištenje, već i temperatura skladištenja ima jasan utjecaj na koncentracije i relativne udjele pojedinih triterpenskih alkohola.

Postojanost triterpenskih alkohola kao pokazatelja sorte i stupnja zrelosti nakon razdoblja skladištenja – multivarijatna analiza

S ciljem utvrđivanja postojanosti triterpenskih alkohola kao pokazatelja sortnog podrijetla koji su najmanje ovisni o stupnju zrelosti, ali i o vremenu i uvjetima skladištenja ulja, provedena je PCA analiza s uzorcima 18 svježih i 54 skladištena ulja. Postignuto je relativno uspješno razdvajanje uzoraka ulja na osnovi sorte (**Slika 67 a**). Prve dvije glavne sastavnice zajedno su sadržavale 76,09 % ukupne varijance. Korišteno je šest varijabli, odnosno koncentracija i relativnih udjela triterpenskih alkohola koji su se pokazali značajnim u razlikovanju na osnovi

sorte u analizi varijance (s visokim *F* vrijednostima). Pet od šest upotrijebljenih varijabli prethodno se pokazalo korisnim za razdvajanje svježih ulja na osnovi sorte (**Slika 67 b**). Isto tako, ulja pojedinih sorti bila su povezana s gotovo istim varijablama kao u slučaju PCA analize samo sa svježim uljima: uzorci Buže pozitivno su korelirali s relativnim udjelom 24-metilen-cikloartenola, a negativno s ostalim varijablama. Položaj uzoraka Rosinjole bio je ponajviše određen s faktorskim opterećenjima relativnih udjela cikloartenola i β-amirina te koncentracije β-amirina, ali i koncentracije citrostadienola koja ih je posebno razdvajala od uzoraka Buže. Za razdvajanje uzoraka Črne od uzoraka ostalih sorti, poglavito Buže, uglavnom je bila zaslužna koncentracija butirospermola.

Kada je LDA analiza sa sortom kao grupirajućim faktorom primijenjena na set podataka s 18 svježih i 54 skladištena ulja te 16 varijabli postignuta je 100 % ispravna klasifikacija neovisno o stupnju zrelosti i vremenu, odnosno temperaturi skladištenja. Razdvajanje uzoraka i projekcija standardiziranih koeficijenata uključenih varijabli prikazani su na **Slici 68 a**. Izdvojeno je šest varijabli koje su bile slične onima koje su se prethodno pokazale učinkovitim u razdvajanju svježih ulja na osnovi sorte (**Slika 68 b**), uz razliku da je umjesto relativnih udjela pojedinih varijabli LDA model sa skladištenim uzorcima uključio njihove koncentracije ili obrnuto.

Kao i u slučaju svježih ulja, postotni udio β-amirina pokazao je najsnažniji potencijal za razdvajanje ulja na osnovi sorte jer je nakon uključenja te varijable 100 % uzoraka Rosinjole te 87,50 % svih uzoraka bilo ispravno klasificirano. Dodatkom koncentracije butirospermola u model ispravno su klasificirani i svi uzorci sorte Črna, a postotak ukupno točno klasificiranih uzoraka porastao je na 98,60 %. Ispravna klasifikacija svih uzoraka postignuta je uključivanjem koncentracije cikloaertenola u model, dok je uključivanje koncentracije δ-amirina i relativnih udjela zbroja gramisterola i cikloeukalenola te cikloartenola dodatno poboljšalo razdvajanje.

Najviši prosječni relativni udio β-amirina bio je karakterističan za ulja sorte Rosinjola, dok su najniže vrijednosti pronađene u uljima sorte Črna. Rosinjola je bila karakterizirana i najvišim prosječnim vrijednostima koncentracije i relativnog udjela cikloartenola, dok je najviša prosječna koncentracija butirospermola pronađena u uljima sorte Črna.

S ciljem utvrđivanja postojanosti triterpenskih alkohola kao pokazatelja stupnja zrelosti koji su najmanje ovisni o sortnom podrijetlu, ali i o vremenu i uvjetima skladištenja ulja, provedena je PCA analiza s uzorcima 18 svježih i 54 skladištena ulja. Relativno uspješno razdvajanje uzoraka na osnovi stupnja zrelosti postignuto je pomoću 10 varijabli (**Slika 69 a**). Prve dvije glavne sastavnice zajedno su sadržavale 69,17 % ukupne varijance. Pojedine varijable, kao što su koncentracije 24-metilen-cikloartenola i cikloartenola te relativni udjeli β-amirina, δ-amirina, obtusifoliola i citrostadienola, prethodno su se pokazale korisnim za razdvajanje svježih ulja na osnovi stupnja zrelosti (**Slika 69 b**). Novouvedene varijable, poput

koncentracije i relativnog udjela zbroja gramisterola i cikloeukalenola, relativnog udjela butirospermola te koncentracije obtusifoliola, poboljšale su razdvajanje.

Razdvajanje na osnovi stupnja zrelosti, uz manja preklapanja susjednih grupa, postignuto je uglavnom uzduž sastavnice PC1. Relativni udjeli δ-amirina, butirospermola, obtusifoliola i citrostadienola korelirali su s uzorcima ranijeg stupnja zrelosti (I), dok su koncentracije 24-metilen-cikloartenola i cikloartenola uvjetovale položaj ulja kasnijeg stupnja zrelosti (III). Uzorci srednjeg stupnja zrelosti (II) bili su smješteni između dvije spomenute skupine te su zajedno s dijelom uzoraka kasnijeg stupnja (III) bili donekle povezani s varijablama s negativnim faktorskim opterećenjima na PC 2, odnosno zbrojem koncentracija i relativnih udjela gramisterola i cikloeukalenola te koncentracijom obtusifoliola. Rasap uzoraka iz istih grupa te preklapanja uzoraka iz različitih grupa vjerojatno su barem djelomično bili posljedica utjecaja sorte, a moguće i vremena i uvjeta skladištenja.

Linearna diskriminantna analiza sa stupnjem zrelosti kao grupirajućim faktorom primijenjena je na set podataka koji je uključivao 18 svježih i 54 skladištenih ulja te 16 varijabli. Postignuta je ispravna klasifikacija 91,67 % uzoraka. Po dva uzorka svakog od tri stupnja zrelosti pogrešno su klasificirana kao uzorci iz susjedne skupine. Dobiveni rezultat upućivao je na to da su promjene tijekom skladištenja ipak donekle utjecale na stabilnost, odnosno učinkovitost pokazatelja stupnja zrelosti među triterpenskim alkoholima utvrđenim za svježa ulja. Navedeno je potvrdio i odabir varijabli koje su se djelomično podudarale s onima učinkovitim za klasifikaciju svježih ulja (**Slika 53**). Razdvajanje uzoraka ulja LDA analizom na osnovi stupnja zrelosti prikazano je **Slici 70 a**, dok je projekcija standardiziranih koeficijenata varijabli uključenih u model prikazana na **Slici 70 b**.

Prva varijabla uključena u model bila je koncentracija 24-metilen-cikloartenola što je omogućilo ispravnu klasifikaciju 87,50 % svih uzoraka ulja. Model je dalje uključivao, redom, relativni udio cikloartenola, koncentraciju β-amirina, relativne udjele δ-amirina, obtusifoliola i citrostadienola te koncentracije citrostadienola i cikloartenola.

Prosječne koncentracije 24-metilen-cikloartenola i cikloartenola bile su u porastu s promjenama stupnja zrelosti od I do III, dok su se prosječni relativni udjeli δ-amirina, obtusifoliola i citrostadienola istovremeno snižavali. Najniža prosječna koncentracija β-amirina zabilježena je u uzorcima ranijeg stupnja zrelosti (I).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata dobivenih u ovom istraživanju, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Rezultati ovog rada pokazali su da sorta i stupanj zrelosti imaju značajan utjecaj na koncentracije i relativne udjele pojedinačnih i ukupnih sterola, triterpenskih diola te alifatskih i triterpenskih alkohola u maslinovim uljima hrvatskih sorti Buža, Črna i Rosinjola.
2. Utvrđeno je da spomenuta dva faktora značajno interagiraju, odnosno da se utjecaj sorte mijenja sa stupnjem zrelosti, kao i da utjecaj stupnja zrelosti nije jednak za sve izučavane sorte.
3. Iako su pojedini steroli, triterpenski dioli te alifatski i triterpenski alkoholi poslužili kao pojedinačne varijable za razlikovanje izučavanih ulja na osnovi sorte i/ili stupnja zrelosti, uspješno razlikovanje i klasifikacija ulja na osnovi sorte ili stupnja zrelosti postignuti su pomoću multivarijatnih metoda statističke analize, uzimajući više varijabli odjednom u obzir. Pojedini steroli, triterpenski dioli te alifatski i triterpenski alkoholi, odnosno njihove kombinacije, pokazali su se kao pouzdani pokazatelji sortnog podrijetla ili stupnja zrelosti unatoč interferirajućem utjecaju drugog faktora.
4. Za maslinova ulja sorte **Buža**, neovisno o stupnju zrelosti, u odnosu na druge dvije izučavane sorte mogu se istaknuti sljedeće karakteristike:
   a. najviši relativni udio kolesterola, dokozanola, 24-metilen-kolesterola i ukupnih 4,4-dimetil-sterola;
   b. najniža koncentracija kampesterola, klerosterola, β-sitosterola, Δ^5-avenasterola, $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola, Δ^7-stigmastenola, ukupnog β-sitosterola, ukupnih sterola i obtusifoliola;
   c. najniži relativni udio pentakozanola i citrostadienola te
   d. vrlo niske do niske koncentracije ukupnih sterola (117,8 – 145,0 mg/100 g), ovisno o stupnju zrelosti.
5. Za maslinova ulja sorte **Črna**, neovisno o stupnju zrelosti, u odnosu na druge dvije izučavane sorte mogu se istaknuti sljedeće karakteristike:
   a. najviša koncentracija 24-metilen-kolesterola, klerosterola, β-sitosterola, Δ^5-avenasterola, $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola, ukupnog β -sitosterola i ukupnih sterola;
   b. najviši relativni udio β-sitosterola i pentakozanola;
   c. najniži relativni udio kampesterola i β-amirina te
   d. visoka do vrlo visoka koncentraciju ukupnih sterola (207,8 – 227,7 mg/100 g), ovisno o stupnju zrelosti.
6. Za maslinova ulja sorte **Rosinjola**, neovisno o stupnju zrelosti, u odnosu na druge dvije izučavane sorte mogu se istaknuti sljedeće karakteristike:
   a. najviša koncentracija β-amirina, cikloartenola, heptakozanola i ukupnih alifatskih alkohola;
   b. najviši relativni udio kampesterola, stigmasterola, β-amirina i cikloartenola;

c. najniži relativni udio ukupnog β-sitosterola i 24-metilen-kolesterola te
d. niska do srednja koncentracija ukupnih sterola (148,3 – 181,3 mg/100 g), ovisno o stupnju zrelosti.

7. **Relativni udio ukupnog β-sitosterola** u uljima Rosinjola srednjeg i kasnijeg stupnja zrelosti bio je **niži od regulativom propisanog minimuma od 93 %** za djevičanska maslinova ulja, dok je relativni udio **Δ^7-stigmastenola** u uzorku Rosinjole srednjeg stupnja zrelosti bio **viši od najviše dopuštene vrijednosti od 0,5 %.** Ovakva odstupanja mogla bi izazvati probleme kod provjere autentičnosti maslinovog ulja ove sorte te je svakako potrebno provesti dodatna istraživanja i utvrditi je li u pitanju bila slučajna devijacija ili sortna karakteristika.
8. Za multivarijatnu klasifikaciju i međusobno razlikovanje maslinovih ulja triju sorti bez obzira na stupanj zrelosti bile su najkorisnije koncentracije β-sitosterola i Δ^5-avenasterola te relativni udio kampesterola među sterolima, relativni udio β-amirina među triterpenskim alkoholima te koncentracija i relativni udio pentakozanola među alifatskim alkoholima.
9. Za maslinova ulja proizvedena od maslina ubranih u **ranijem stupnju zrelosti**, neovisno o sorti, mogu se istaknuti sljedeće karakteristike:
   a. najniža koncentracija 24-metilen-kolesterola, stigmasterola, Δ^5-avenasterola, dokozanola, 24-metilencikloartenola, ukupnih 4,4-dimetil-sterola i ukupnih triterpenskih alkohola;
   b. najviši relativni udio δ-amirina, obtusifoliola, butirospermola, citrostadienola i ukupnih 4-monometil-sterola;
   c. najniži relativni udio 24-metilen-kolesterola, stigmasterola, Δ^5-avenasterola, dokozanola, 24-metilencikloartenola i ukupnih 4,4-dimetil-sterola.
10. Za maslinova ulja proizvedena od maslina ubranih u **srednjem stupnju zrelosti**, neovisno o sorti, bila je karakteristična:
    a. najviša koncentracija β-sitosterola, ukupnog β-sitosterola i ukupnih sterola.
11. Za maslinova ulja proizvedena od maslina ubranih u **kasnijem stupnju zrelosti**, neovisno o sorti, mogu se istaknuti sljedeće karakteristike:
    a. najviša koncentracija eritrodiola, 24-metilencikloartenola, ukupnih 4,4-dimetil-sterola i ukupnih triterpenskih alkohola;
    b. najviši relativni udio eritrodiola, tetrakozanola, cikloartenola i ukupnih 4,4-dimetil-sterola;
    c. niži relativni udio β-sitosterola, pentakozanola, heksakozanola i oktakozanola nego u uljima od maslina ubranih u ranijem stupnju zrelosti;
    d. najniži relativni udio δ-amirina, obtusifoliola, butirospermola, citrostadienola i ukupnih 4-monometil-sterola.

12. Za multivarijatnu klasifikaciju i međusobno razlikovanje maslinovih ulja proizvedenih od maslina tri različita stupnja zrelosti, bez obzira na sortu, bile su najkorisnije koncentracije 24-metilen-kolesterola i eritrodiola, relativni udio uvaola te omjer udjela sitostanola i uvaola među sterolima i triterpenskim diolima, relativni udjeli oktakozanola, trikozanola i dokozanola među alifatskim alkoholima te relativni udjeli obtusifoliola, δ-amirina i butirospermola među triterpenskim alkoholima.
13. Utvrđeno je da vrijeme i temperatura skladištenja također imaju određeni utjecaj na koncentracije i relativne udjele pojedinačnih i ukupnih sterola, triterpenskih diola te alifatskih i triterpenskih alkohola u izučavanim maslinovim uljima. Promjene nakon razdoblja skladištenja od 12 mjeseci bile su znatno slabijeg intenziteta u usporedbi s onima izazvanim utjecajem sorte i/ili stupnja zrelosti.
14. Iako za većinu izučavanih spojeva nisu utvrđene pravilnosti i ponavljajući obrasci promjena kao posljedice skladištenja, utvrđena je tendencija sniženja koncentracija β-sitosterola i Δ^5-avenasterola te ukupnog β-sitosterola i ukupnih sterola, kao i koncentracije i relativnog udjela $\Delta^{5,24}$-stigmastadienola, te povišenje koncentracija i relativnih udjela $\Delta^{5,23}$-stigmastadienola, Δ^7-stigmastenola i obtusifoliola u skladištenim uljima. Utvrđene su i određene razlike u tendencijama spomenutih promjena ovisno o temperaturi skladištenja.
15. Pojedini steroli, triterpenski dioli te alifatski i triterpenski alkoholi, kao i njihove kombinacije, pokazali su se kao postojani pouzdani pokazatelji sortnog podrijetla ili stupnja zrelosti i nakon razdoblja skladištenja na različitim temperaturama, što je potvrdilo tezu da bi ti spojevi mogli biti korisni za provjeru autentičnosti svježih i skladištenih maslinovih ulja, za razliku od mnogih drugih spojeva za koje su u prethodnim istraživanjima dokazane značajne promjene tijekom i nakon skladištenja.
16. Za donošenje još općenitijih zaključaka, u budućim istraživanjima bilo bi poželjno obuhvatiti više godina berbe s različitim vremenskim uvjetima, kao i druge čimbenike koji mogu utjecati na koncentracije i udjele sterola, triterpenskih diola te alifatskih i triterpenskih alkohola u maslinovom ulju, kao što su zemljopisna mikro lokacija te parametri uzgoja i proizvodnje. Isto tako, mogle bi se uključiti i druge hrvatske sorte, posebno one od gospodarskog značaja. Navedeno bi omogućilo precizniju identifikaciju sorti i stupnjeva zrelosti koji mogu proizvesti maslinova ulja s visokim koncentracijama spomenutih spojeva kao dodatne nutritivne vrijednosti. S druge strane, takva produbljena saznanja omogućila bi bolje gospodarenje sortama koje su u određenim uvjetima sklone dobivanju ulja u kojima prirodni sastav sterola i triterpenskih diola te alifatskih i triterpenskih alkohola ne zadovoljava zakonom propisane granice. Na taj bi se način mogli predvidjeti i izbjeći potencijalni problemi u trženju vezani uz dokazivanje njihove autentičnosti.

7. LITERATURA

Abdallah M, Vergara-Barberán M, Lerma-García MJ, Herrero-Martínez JM, Zarrouk M, Guerfel M, Simó-Alfonso EF: Sterol profiles of Tunisian virgin olive oils: classification among different cultivars and maturity indexes. *European Food Research and Technology* 244:675–684, 2018.

Abu-Alruz K, Afaneh IA, Quasem JM, Hmidat MA, Abbady J, Mazahreh AS: Factors Affecting D-7-Stigmastenol in Palestinian Olive Oil. *Journal of Applied Sciences* 11:797–805, 2011.

Ajana H, El Antari A: Fatty acids and sterols evolution during the ripening of olives from the Moroccan Picholine cultivar. *Grasas y Aceites* 49:405–410, 1998.

Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura T: Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* 43:1255–1260, 1996.

Alagna F, Mariotti R, Panara F, Caporali S, Urbani S, Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Rosati A, Rao R, Perrotta G, Servili M, Baldoni L: Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology* 12:162, 2012.

Alberghina G, Caruso L, Fisichella S, Musumarra G: Geographical classification of sicilian olive oils in terms of sterols and fatty acids content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 56:445–455, 1991.

Al-Ismail KM, Alsaed AK, Ahmad R, Al-Dabbas M: Detection of olive oil adulteration with some plant oils by GLC analysis of sterols using polar column. *Food Chemistry* 121:1255–1259, 2010.

Allouche Y, Jiménez A, Uceda M, Aguilera MP, Gaforio JJ, Beltrán G: Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:3604–3610, 2009.

Almeida CAS, Baggio SR, Mariutti LRB, Bragagnolo N: One-step rapid extraction of phytosterols from vegetable oils. *Food research international* 130:108891, 2020.

Aloisi I, Zoccali M, Dugo P, Tranchida PQ, Mondello L: Fingerprinting of the Unsaponifiable Fraction of Vegetable Oils by Using Cryogenically-Modulated Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* 13:1523–1529, 2020.

Alonso L, Fontecha J, Lozada L, Juárez M: Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74:131–135, 1997.

Alves MR, Cunha SC, Amaral JS, Pereira JA, Oliveira MB: Classification of PDO olive oils on the basis of their sterol composition by multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta* 549:166–178, 2005.

American Oil Chemists' Society: Determination of the composition of the sterol fraction of animal and vegetable oils and fats by TLC and capillary GLC (AOCS Official Method Ch 6–91). In Methods and Recommended Practices of the AOCS, 6th edition. AOCS Press, Champaign, IL, USA, 1–5, 1997.

Anastasi U, Santonoceto C, Giuffrè AM, Sortino O, Gresta F, Abbate V: Yield performance and grain lipid composition of standard and oleic sunflower as affected by water supply. *Field Crops Research* 119:145–153, 2010.

Anastasopoulos E, Kalogeropoulos N, Kaliora AC, Kountouri A, Andrikopoulos NK: The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method. International *Journal of Food Science and Technology* 46:170–178, 2011.

Aparicio R, Luna G: Characterisation of monovarietal virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104:614–627, 2002.

Aparicio R, Morales MT, Aparicio-Ruiz R, Tena N, García-González DL: Authenticity of olive oil: Mapping and comparing official methods and promising alternatives. *Food Research International* 54:2025–2038, 2013.

Arruzazabala ML, Molina V, Mas R, Fernández L, Carbajal D, Valdés S, Castaño G: Antiplatelet effects of policosanol (20 and 40 mg/day) in healthy volunteers and dyslipidaemic patients. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29:891–897, 2002.

Avidan, B.; Meni, Y.; Tsur, N. Composition and morphology changes in olive fruit as indication of maturation. Advances in Horticultural Science 21:3–8, 2007.

Azadmard-Damirchi S, Dutta PC: Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, and 4,4'-dimethylsterols in vegetable oils. *Journal of Chromatography. A* 1108:183–187, 2006.

Bajoub A, Hurtado-Fernández E, Ajal EA, Fernández-Gutiérrez A, Carrasco-Pancorbo A, Ouazzani N: Quality and chemical profiles of monovarietal north Moroccan olive oils from "Picholine Marocaine" cultivar: registration database development and geographical discrimination. *Food Chemistry* 179:127–136, 2015.

Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P: *Food Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 2004.

Beltrán G, Del Río C, Sánchez S, Martínez L: Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:1783–1790, 2004.

Berger A, Jones PJH, Abumweis SS: Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease* 3:5, 2004.

Bianchi G, Giansante L, Shaw A, Kell DB: Chemometric criteria for the characterisation of Italian Protected Denomination of Origin (DOP) olive oils from their metabolic profiles. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103:141-150, 2001.

Bin Sayeed MS, Karim SMR, Sharmin T, Morshed MM: Critical Analysis on Characterization, Systemic Effect, and Therapeutic Potential of Beta-Sitosterol: A Plant-Derived Orphan Phytosterol. *Medicines* 3(4):29, 2016.

Bonel-Pérez GC, Pérez-Jiménez A, Gris-Cárdenas I, Parra-Pérez AM, Lupiáñez JA, Reyes-Zurita FJ, Siles E, Csuk R, Peragón J, Rufino-Palomares EE: Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effect of Uvaol in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells by Affecting G0/G1 Cell Cycle Arrest, ROS Production and AKT/PI3K Signaling Pathway. *Molecules* 25:4254, 2020.

Boulkroune H, Lazzez A, Guissous M, Bellik Y, Smaoui S, Kamoun NG, Madani T: Characterization of sterolic and alcoholic fractions of some Algerian olive oils according to the variety and ripening stage. *OCL* 24:A502, 2017.

Bozdogan Konuskan D, Mungan B: Effects of Variety, Maturation and Growing Region on Chemical Properties, Fatty Acid and Sterol Compositions of Virgin Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93:1499–1508, 2016.

Brkić Bubola K, Koprivnjak O, Sladonja B, Lukic I: Volatile compounds and sensory profiles of monovarietal virgin olive oil from Buža, Črna and Rosinjola cultivars in Istria (Croatia). *Croatian Journal of Food Science and Technology* 50(2):192–198, 2012.

Brkić Bubola K, Valenčić V, Bučar-Miklavčič M, Krapac M, Lukić M, Šetić E, Sladonja B: Sterol, triterpen dialcohol and fatty acid profile of less- and well-known Istrian monovarietal olive oil. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 10:118–122, 2018.

Brkić Bubola K: Karakterizacija djevičanskih maslinovih ulja istarskih autohtonih sorti na temelju hlapivih tvari i senzornih svojstava. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2011.

Brkić K, Radulović M, Sladonja B, Lukić I, Šetić E: Application of Soxtec apparatus for oil content determination in olive fruit. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 83:115-119, 2006.

Cabral CE, Klein MRST: Phytosterols in the Treatment of Hypercholesterolemia and Prevention of Cardiovascular Diseases. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 109:475–482, 2017.

Camera L, Angerosa F, Cucurachi A: L'evoluzione della frazione sterolica dell'olio con il procedere della maturazione delle olive. *Estratto Dagli Annali Dell'Instituto Sperimentale per la Elaiotecnia Pescara* 5:3–36, 1975.

Camera L: The determination of addition of husk oil to olive oil by GLC of unsaponifiable alcoholic fraction. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Elaiotecnica* 9:78–87, 1981.

Cañabate Díaz B, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A, Belmonte Vega A, Garrido Frenich A, Martínez Vidal J, Duran Martos J: Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry* 102:593–598, 2007.

Caradec S, Grossi V, Gilbert F, Guigue C, Goutx M: Influence of various redox conditions on the degradation of microalgal triacylglycerols and fatty acids in marine sediments. *Organic Geochemistry* 35:277–287, 2004.

Carbajal D, Arruzazabala ML, Valdés S, Más R: Effect of policosanol on platelet aggregation and serum levels of arachidonic acid metabolites in healthy volunteers. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 58:61–64, 1998.

Carmo J, Cavalcante-Araújo P, Silva J, Ferro J, Correia AC, Lagente V, Barreto E: Uvaol Improves the Functioning of Fibroblasts and Endothelial Cells and Accelerates the Healing of Cutaneous Wounds in Mice. *Molecules* 25:4982, 2020.

Ceci LN, Carelli AA: Characterization of Monovarietal Argentinian Olive Oils from New Productive Zones. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84*:*1125–1136, 2007.

Centar za znanstvene informacije: K*arakterizacija autohtonih sorti maslina u Istri (MB: MZOS-147-0000000-3605)* u CROSBI, Institut Ruđer Bošković, 2022. https://www.bib.irb.hr/pregled/projekti/id/5524 [13.03.2022.]

Cercaci L, Passalacqua G, Poerio A, Rodriguez-Estrada MT, Lercker G: Composition of total sterols (4-desmethyl-sterols) in extravirgin olive oils obtained with different extraction technologies and their influence on the oil oxidative stability. *Food Chemistry* 102:66–76, 2007.

Cherif AO, Ben Messaouda M, Kaabi B, Boukhchina S, Pepe C, Kallel H: Comparison of the concentrations of long-chain alcohols (policosanol) in three Tunisian peanut varieties (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:12143–12148, 2010.

Cherif, A. O., Ben Messaouda, M., Kaabi, B., Pellerin, I., Boukhchina, S., Kallel, H., Pepe, C. (2011). Characteristics and pathways of bioactive 4-desmethylsterols, triterpene alcohols and 4α-monomethylsterols, from developing Tunisian cultivars and wild peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(7), 774–781.

Chtourou F, Jabeur H, Lazzez A, Bouaziz M: Characterization and Discrimination of Oueslati Virgin Olive Oils from Adult and Young Trees in Different Ripening Stages Using Sterols, Pigments, and Alcohols in Tandem with Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:3512–3522, 2017.

Codex Alimentarius Commission: Codex Standard for Named Vegetable Oils (Codex Stan 210-1999, Adopted in 1999. Revised in 2001, 2003, 2009, 2017, 2019. Amended in 2005, 2011, 2013, 2015, 2019, 2021.). 2021.a http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B210-1999%252FCXS_210e.pdf [07.10.2021.]

Codex Alimentarius Commission: Codex standard for olive oils and olive pomace oils (CXS 33:1981, Adopted in 1981. Revised in 1989, 2003, 2015, 2017. Amended in 2009, 2013, 2021.). CAC, 2021.b http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B33-1981%252FCXS_033e.pdf [07.10.2021.]

Conte L, Bendini A, Valli E, Lucci P, Moret S, Maquet A, Lacoste F, Brereton P, García-González DL, Moreda W, Gallina Toschi T: Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks and recommendations for the future. *Trends in Food Science & Technology* 105:483–493, 2020.

Cunha SS, Fernandes JO, Oliveira MBPP: Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1128:220–227, 2006.

Damirchi SA, Savage GP, Dutta PC: Sterol fractions in hazelnut and virgin olive oils and 4,4′-dimethylsterols as possible markers for detection of adulteration of virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemists' Society* 82:717−725, 2005.

Deiana P, Santona M, Dettori S, Molinu MG, Dore A, Culeddu N, Azara E, Naziri E, Tsimidou MZ: Can All the Sardinian Varieties Support the PDO “Sardegna” Virgin Olive Oil? *European Journal of Lipid Science and Technology* 121:1800135, 2019.

Demirag O, Konuskan DB: Quality Properties, Fatty Acid and Sterol Compositions of East Mediterranean Region Olive Oils. *Journal of Oleo Science* 70:51–58, 2021.

Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske: *Priopćenje*. DZS, Zagreb, 2018.a

Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske: *Statistički ljetopis Republike Hrvatske*. DZS, Zagreb, 2018.b

Du S-Y, Huang H-F, Li X-Q, Zhai L-X, Zhu Q-C, Zheng K, Song X, Xu C-S, Li C-Y, Li Y, He Z-D, Xiao H-T: Anti-inflammatory properties of uvaol on DSS-induced colitis and LPS-stimulated macrophages. *Chinese Medicine* 15:43, 2020.

Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L, Urban M, Sarek J: Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* 23:394–411, 2006.

Europska Komisija: Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91 od 11. srpnja 1991.o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize. Službeni list Europske unije L248, 1991. (pročišćeni tekst), Ured za publikacije EU, 2019. http://data.europa.eu/eli/reg/1991/2568/2019-10-20 [13.11.2021.]

Europska Komisija: Uredba Komisije (EU) br. 432/2012 od 16. svibnja 2012. o utvrđivanju popisa dopuštenih zdravstvenih tvrdnji koje se navode na hrani, osim onih koje se odnose na smanjenje rizika od bolesti te na razvoj i zdravlje djece. Službeni list Europske unije L 136:1-55. (pročišćeni tekst). Ured za publikacije EU, 2021. http://data.europa.eu/eli/reg/2012/432/2021-05-17 [13.11.2021.]

Europski parlament i Vijeće: Uredba (EU) br. 1151/2012 Europskogi parlamenta i Vijeća od 21. studenoga 2012. o sustavima kvalitete za poljoprivredne i prehrambene proizvode, Službeni list Europske unije L 343:1–29. (pročišćeni tekst), Ured za publikacije EU, 2021. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02012R1151-20211207 [6.3.2022.]

Europski parlament i Vijeće: Uredba (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani, izmjeni uredbi (EZ) br. 1924/2006 i (EZ) br. 1925/2006 Europskog parlamenta i Vijeća te o stavljanju izvan snage Direktive Komisije 87/250/EEZ, Direktive Vijeća 90/496/EEZ, Direktive Komisije 1999/10/EZ, Direktive 2000/13/EZ Europskog parlamenta i Vijeća, direktiva Komisije 2002/67/EZ i 2008/5/EZ i Uredbe Komisije (EZ) br. 608/2004, Službeni list Europske unije L 304/18 (pročišćeni tekst). Ured za publikacije EU, 2018. http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/2018-01-01 [13.11.2021.]

Europski parlament i Vijeće: Uredba (EZ) br. 1924/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 20. prosinca 2006. o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani. Službeni list Europske unije L 404:1-24. (pročišćeni tekst). Ured za publikacije EU, 2014. http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1924/2014-12-13 [13.11.2021.]

Feng S, Belwal T, Li L, Limwachiranon J, Liu X, Luo Z: Phytosterols and their derivatives: Potential health-promoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19:1243–1267, 2020.

Fernández-Arche A, Marquez-Martín A, de la Puerta Vazquez R, Perona JP, Terencio C, Perez-Camino C, Ruiz-Gutierrez V: Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil

modulate the release of proinflammatory mediators. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20(3):155-162, 2009.

Fernández-Cuesta A, León L, Velasco L, De la Rosa R: Changes in squalene and sterols associated with olive maturation. *Food Research International* 54(2):1885-1889, 2013.

Ferreiro L, Aparicio R: Influencia de la altitud en la composición química de los aceites de oliva vírgenes de Andalucía. Ecuaciones matemáticas de clasificación. *Grasas y Aceites* 43:149–156, 1992.

Francini-Pesenti F, Brocadello F, Beltramolli D, Nardi M, Caregaro L: Sugar cane policosanol failed to lower plasma cholesterol in primitive, diet-resistant hypercholesterolaemia: a double blind, controlled study. *Complementary Therapies in Medicine* 16:61–65, 2008.

Fuentes de Mendoza M, de Miguel Gordillo C, Marín Expóxito J, Sánchez Casas J, Martínez Cano M, Martín Vertedor D, Franco Baltasar MN: Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food Chemistry* 141:2575–2581, 2013.

Fuentes M, de Miguel C, Ranalli A, Franco MN, Martínez M, Martín-Vertedor D: Chemical composition and sensory evaluation of virgin olive oils from “Morisca” and “Carrasqueña” olive varieties. *Grasas y Aceites* 66:e061, 2015.

Galeano Diaz T, Durán Merás I, Sánchez Casas J, Alexandre Franco MF: Characterization of virgin olive oils according to its triglycerides and sterols composition by chemometric methods. *Food Control* 16:339–347, 2005.

Ghanbari Shendi E, Sivri Ozay D, Ozkaya MT, Ustunel NF: Changes occurring in chemical composition and oxidative stability of virgin olive oil during storage. *OCL* 25(6):A602, 2018.

Ghisoni S, Lucini L, Angilletta F, Rocchetti G, Farinelli D, Tombesi S, Trevisan M: Discrimination of extra-virgin-olive oils from different cultivars and geographical origins by untargeted metabolomics. *Food Research International* 121:746–753, 2019.

Giacalone R, Giuliano S, Gulotta E, Monfreda M, Presti G: Origin assessment of EV olive oils by esterified sterols analysis. *Food Chemistry* 188:279–285, 2015.

Giansante L, Di Vincenzo D, Bianchi G: Classification of monovarietal Italian olive oils by unsupervised (PCA) and supervised (LDA) chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:905–911, 2003.

Giuffrè AM, Capocasale M: Sterol composition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed oil: the effect of cultivar. *International Food Research Journal* 23(1):116-122, 2016.

Giuffrè AM, Louadj L, Poiana M, Macario A: Sterol composition of oils extracted from olives cultivars of the province of Reggio Calabria (South of Italy). *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 89:177–183, 2012.

Giuffrè AM, Louadj L: Influence of crop season and cultivar on sterol composition of monovarietal olive oils in Reggio Calabria (Italy). *Czech Journal of Food Sciences* 31:256–263, 2013.

Giuffrè AM: Biometric evaluation of twelve olive cultivars under rainfed conditions in the region of Calabria, South Italy. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29(9):696-709, 2017.

Giuffrè AM: Evolution of fatty alcohols in olive oils produced in Calabria (Southern Italy) during fruit ripening. *Journal of Oleo Science* 63:485–496, 2014.a

Giuffrè AM: The effects of cultivar and harvest year on the fatty alcohol composition of olive oils from Southwest Calabria (Italy). *Grasas y Aceites* 65:e011, 2014.b

Gómez-Coca RB, Del Pérez-Camino MC, Moreda W: On the glucoside analysis: simultaneous determination of free and esterified steryl glucosides in olive oil. Detailed analysis of standards as compulsory first step. *Food Chemistry* 141:1273–1280, 2013.

Gómez-Coca RB, Fernandes GD, Del Aguila-Sánchez C, Del Pérez-Camino MC, Moreda W: Comparative study of phytosterol derivatives in monovarietal olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:5669–5674, 2014.

Goodwin TW: Biosynthesis of plant sterols. U *Sterols and Bile Acids*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 175–198, 1985.

Goudjil H, Torrado S, Fontecha J, Martínez-Castro I, Fraga MJ, Juárez M: Composition of cholesterol and its precursors in ovine milk. *Le Lait* 83:153–160, 2003.

Grob K, Giuffré AM, Leuzzi U, Mincione B: Recognition of Adulterated Oils by Direct Analysis of the Minor Components. *Lipid / Fett* 96:286–290, 1994.

Grob K, Lanfranchi M, Mariani F: Determination of free and esterified sterols and of wax esters in oils and fats by coupled liquid chromatography-gas chromatography. *Journal of chromatography A* 471:397–405, 1989.

Guillaume C, Ravetti L, Ray DL, Johnson J: Technological Factors Affecting Sterols in Australian Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89:29–39, 2012.

Gupta R, Sharma AK, Dobhal MP, Sharma MC, Gupta RS: Antidiabetic and antioxidant potential of β-sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *Journal of Diabetes* 3:29–37, 2011.

Gutiérrez F, Jímenez B, Ruíz A, Albi MA: Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:121–127, 1999.

Gutiérrez F, Varona I, Albi MA: Relation of acidity and sensory quality with sterol content of olive oil from stored fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1106–1110, 2000.

Haddada FM, Manaï H, Oueslati I, Daoud D, Sánchez J, Osorio E, Zarrouk M: Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six Tunisian olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10941–10946, 2007.

Harrabi S, Boukhchina S, Mayer PM, Kallel H: Policosanol distribution and accumulation in developing corn kernels. *Food Chemistry* 115:918–923, 2009.

Hartmann M: Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science* 3:170–175, 1998.

Hatzakis E, Dagounakis G, Agiomyrgianaki A, Dais P: A facile NMR method for the quantification of total, free and esterified sterols in virgin olive oil. *Food Chemistry* 122:346–352, 2010.

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu: *Hrvatska baza podataka biljnih genetskih izvora*. HAPIH, 2022. https://cpgrd.hapih.hr/gb/fruit/main/accessions_list?has_document=OLEA [13.03.2022.]

Hrvatska agencija za poljoprivredu, hranu i selo: *Popis sorti voćnih vrsta*. HAPIH, 2021. https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2021/07/2.1.-Popis-sorti-vocnih-vrsta.pdf [05.03.2022.]

Hugues C: Maslinarstvo Istre – Elaiografia Istriana. Ceres, Zagreb, 1999.

Ilyasoglu H, Ozcelik B, van Hoed V, Verhe R: Characterization of Aegean Olive Oils by Their Minor Compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87:627–636, 2010.

Inglese P, Barone E, Gullo G: The effect of complementary irrigation on fruit growth, ripening pattern and oil characteristics of olive (*Olea europaea* L.) cv. Carolea. *Journal of Horticultural Science* 71:257–263, 1996.

International Olive Council: Determination of the Sterol Composition and Content and Alcoholic Compounds by Capillary Gas Chromatography (COI/T.20/ Doc. No 26/Rev., 5); IOC, 2020.a https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/07/COI-T20-Doc-26-Rev5-EN-.pdf [13.11.2021.]

International Olive Council: *Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils*. IOC, 2021. https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/07/COI-T15-NC3-REV-16-2021-_ENG.pdf [13.11.2021.]

International Olive Council: *World Olive Oil Figures. Olive Oil Production*, IOC, 2020.b https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/12/HO-W901-23-11-2020-P.pdf [10.09.2021.]

International Organization for Standardization. Determination of Individual and Total Sterols Contents, Gas Chromatographic Method, Part 2: Olive Oils and Olive Pomace Oils. ISO 12228-2:2014.

International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry Joint Commission on Biochemical Nomenclature: Nomenclature of steroids (recommendations 1989). *Pure and Applied Chemistry* 61(10):1783–1822, 1989.

Irmak S, Dunford NT, Milligan J: Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. *Food Chemistry* 95:312–318, 2006.

Issaoui M, Mechri B, Echbili A, Dabbou S, Yangui A, Belguith H, Trigui A, Hammami M: Chemometric characterization of five tunisian varietals of Olea europaea L. olive fruit according to different maturation indices. *Journal of Food Lipids* 15:277–296, 2008.

Itoh T, Yoshida K, Yatsu T, Tamuta T, Matsumoto T: Triterpene alcohols and sterols of Spanish olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58:545−550, 1981.

Jang M S, Han KS, Kim, S. K. Identification of brassinosteroids and their biosynthetic precursors from seeds of pumpkin. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 21:161–164, 2000.

Juan ME, Wenzel U, Daniel H, Planas JM: Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 52:595–599, 2008.

Jung DM, Lee MJ, Yoon SH, Jung MY: A gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometric analysis of policosanols in commercial vegetable oils. *Journal of Food Science* 76:C891-9, 2011.

Kaliora AC, Artemiou A, Giogios I, Kalogeropoulos N: The impact of fruit maturation on bioactive microconstituents, inhibition of serum oxidation and inflammatory markers in stimulated PBMCs and sensory characteristics of Koroneiki virgin olive oils from Messenia, Greece. *Food & Function* 4:1185–1194, 2013.

Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R: Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proceedings* 78:965–978, 2003.

Kołton A, Długosz-Grochowska O, Wojciechowska R, Czaja M: Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. *Scientia Horticulturae* 291:110561, 2022.

Koprivnjak O, .Moret S, Populin T, Lagazio C, Conte LS: Variety differentiation of virgin olive oil based on n-alkane profile. *Food Chemistry* 90:603–608, 2005.

Koprivnjak O: Analitycal characterisation of olive oil from three autochthonous and one introduced cultivar from Pula area (Croatia). *Doktorska disertacija*. Faculty of Agriculture, Department of Food Sciences, Udine, Italy, 1996.

Koprivnjak O: Maslinovo ulje od masline do stola. MIH, Poreč, 2006.

Koutsaftakis A, Kotsifaki F, Stefanoudaki E: Effect of extraction system, stage of ripeness, and kneading temperature on the sterol composition of virgin olive oils. *Journal of American Oil Chemists' Society* 76:1477-1481, 1999.

Kowalski BR, Bender CF: Pattern recognition. Powerful approach to interpreting chemical data. *Journal of the American Chemical Society* 94(16):5632–5639, 1972.

Krichène D, Allalout A, Salvador MD, Fregapane G, Zarrouk M: Fatty acids, volatiles, sterols and triterpenic alcohols of six monovarietal Tunisian virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112:400–409, 2010.

Kyçyk O, Aguilera MP, Gaforio JJ, Jiménez A, Beltrán G: Sterol composition of virgin olive oil of forty-three olive cultivars from the World Collection Olive Germplasm Bank of Cordoba. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96:4143–4150, 2016.

Lazzez A, Perri E, Caravita MA, Khlif M, Cossentini M: Influence of olive maturity stage and geographical origin on some minor components in virgin olive oil of the chemlali variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:982–988, 2008.

Lazzez A, Vichi S, Kammoun NG, Arous MN, Khlif M, Romero A, Cossentini M: A four year study to determine the optimal harvesting period for Tunisian Chemlali olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113:796–807, 2011.

Leguizamón C, Weller CL, Schlegel VL, Carr TP: Plant sterol and policosanol characterization of hexane extracts from grain sorghum, corn, and their DDGS. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86:707–716, 2009.

Lerma-García MJ, Concha-Herrera V, Herrero-Martínez JM, Simó-Alfonso EF: Classification of extra virgin olive oils produced at La Comunitat Valenciana according to their genetic variety using sterol profiles established by high-performance liquid chromatography

with mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:10512–10517, 2009.

Lerma-García MJ, Simó-Alfonso EF, Méndez A, Lliberia JL, Herrero-Martínez JM: Classification of extra virgin olive oils according to their genetic variety using linear discriminant analysis of sterol profiles established by ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Food Research International* 44:103–108, 2011.

Longobardi F, Ventrella A, Casiello G, Sacco D, Catucci L, Agostiano A, Kontominas MG: Instrumental and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Apulian virgin olive oils. *Food Chemistry* 133:579–584, 2012.a

Longobardi F, Ventrella A, Casiello G, Sacco D, Tasioula-Margari M, Kiritsakis AK, Kontominas MG: Characterisation of the geographical origin of Western Greek virgin olive oils based on instrumental and multivariate statistical analysis. *Food Chemistry* 133:169–175, 2012.b

López-Cortés I, Salazar-García DC, Velázquez-Martí B, Salazar DM: Chemical characterization of traditional varietal olive oils in East of Spain. *Food Research International* 54:1934–1940, 2013.

Lukić I, Horvat I, Godena S, Krapac M, Lukić M, Vrhovsek U, Brkić Bubola K: Towards understanding the varietal typicity of virgin olive oil by correlating sensory and compositional analysis data: a case study. *Food research international* 112:78–89, 2018.

Mailer RJ, Ayton J, Graham K: The Influence of Growing Region, Cultivar and Harvest Timing on the Diversity of Australian Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87:877-884, 2010.

Manai-Djebali H, Krichène D, Ouni Y, Gallardo L, Sánchez J, Osorio E, Daoud D, Guido F, Zarrouk M: Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis* 27:109–119, 2012.

Manai-Djebali H, Oueslati I, Martínez-Cañas MA, Zarrouk M, Sánchez-Casas J: Improvement of the Sterol and Triacylglycerol Compositions of Chemlali Virgin Olive Oils through Controlled Crossing with Mediterranean Cultivars. *Journal of Oleo Science* 67:379–388, 2018.

Manai-Djebali H, Oueslati I: Olive oil phytosterols and human health. U *Olive oil: Sensory characteristics, composition and importance in human health*. Nova Science Publishers, Inc., New York, SAD, 39-7 4, 2017.

Mariani C, Bellan G, Lestini E, Aparicio R: The detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by free and esterified sterols. *European Food Research and Technology* 223:655–661, 2006.

Mariani C, Bellan G, Morchio G, Pellegrino A: Free and esterified minor components of olive and hazelnut oils. Their possible use in detecting blends. Note III. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 76:297–305, 1999.

Mariani C, Lucci P, Conte L: Identification of Phytyl Vaccinate as a Major Component of Wax Ester Fraction of Extra Virgin Olive Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 120(8): 1800154, 2018.

Mariani C, Venturini S. Increase of waxes in olive oils during storage. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 83:105-114, 2006.

Marini F, Balestrieri F, Bucci R, Magrì AD, Magrì AL, Marini D: Supervised pattern recognition to authenticate Italian extra virgin olive oil varieties. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 73:85–93, 2004.

Matos LC, Cunha, SC, Amaral JS, Pereira JA, Andrade PB, Seabra RM, Oliveira BPP: Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry* 102:406-414, 2007.

McCaskill D, Croteau R: Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends in Biotechnology* 16:349–355, 1998.

Mena C, González AZ, Olivero-David R, Pérez-Jiménez MÁ: Characterization of 'Castellana' Virgin Olive Oils with Regard to Olive Ripening. *HortTechnology* 28:48–57, 2018.

Milotić A, Šetić E, Peršurić Đ, Poljuha D, Sladonja B, Brščić K: Identification and characterisation of autochthonous olive varieties in Istria (Croatia). *Annales, Series Historia Naturalis* 15:251–256, 2005.

Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, Gomez Gomez HA, Chen C-YO, Pereira Lima GP: Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. In *Phenolic Compounds - Biological Activity*. InTech, 2017.

Ministarstvo poljoprivrede RH: *Maslinarstvo*, 2021. https://poljoprivreda.gov.hr/print.aspx?id=194&url=print [13.11.2021.]

Mo S, Dong L, Hurst WJ, van Breemen RB: Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Lipids* 48:949–956, 2013.

Mohamed MB, Rocchetti G, Montesano D, Ali SB, Guasmi F, Grati-Kamoun N, Lucini L: Discrimination of Tunisian and Italian extra-virgin olive oils according to their phenolic and sterolic fingerprints. *Food Research International* 106:920–927, 2018.

Mongrand S, Stanislas T, Bayer EMF, Lherminier J, Simon-Plas F: Membrane rafts in plant cells. *Trends in Plant Science* 15:656–663, 2010.

Mozzon M, Pacetti D, Frega NG, Lucci P: Crude Palm Oil from Interspecific Hybrid Elaeis oleifera × E. guineensis: Alcoholic Constituents of Unsaponifiable Matter. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 92:717–724, 2015.

Muffler K, Leipold D, Scheller M-C, Haas C, Steingroewer J, Bley T, Neuhaus HE, Mirata MA, Schrader J, Ulber R: Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* 46:1–15, 2011.

Nashed B, Yeganeh B, HayGlass KT, Moghadasian MH: Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. *The Journal of Nutrition* 135:2438–2444, 2005.

Navas-López JF, Cano J, La Rosa R de, Velasco L, León L: Genotype by environment interaction for oil quality components in olive tree. *European Journal of Agronomy* 119:126115, 2020.

NCEP Adult treatment Panel III: Executive Summary of the Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Journal of the American Medical Association* 285:2486–2497, 2001.

Nes WD, Venkatramesh M: Enzymology of phytosterol transformations. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 34:81–93, 1999.

Nestola M, Schmidt TC: Fully automated determination of the sterol composition and total content in edible oils and fats by online liquid chromatography-gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of chromatography A* 1463:136–143, 2016.

Noorali M, Barzegar M, Sahari MA: Sterol and Fatty Acid Compositions of Olive Oil as an Indicator of Cultivar and Growing Area. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91:1571–1581, 2014.

Oklestkova J, Rárová L, Kvasnica M, Strnad M: Brassinosteroids: synthesis and biological activities. *Phytochemistry Reviews* 14:1053–1072, 2015.

Olmo-García L, Polari JJ, Li X, Bajoub A, Fernández-Gutiérrez A, Wang SC, Carrasco-Pancorbo A: Study of the minor fraction of virgin olive oil by a multi-class GC-MS approach: Comprehensive quantitative characterization and varietal discrimination potential. *Food Research International* 125:108649, 2019.

Orozco-Solano M, Ruiz-Jimenez J, Luque De Castro MD: Characterization of fatty alcohol and sterol fractions in olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:7539–7546, 2010.

Ostlund RE: Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition* 22:533–549, 2002.

Othman RA, Moghadasian MH: Beyond cholesterol-lowering effects of plant sterols: clinical and experimental evidence of anti-inflammatory properties. *Nutrition reviews* 69:371–382, 2011.

Oueslati I, Manai H, Haddada FM, Daoud D, Sánchez J, Osorio E, Zarrouk M: Sterol, Triterpenic Dialcohol, and Triacylglycerol Compounds of Extra Virgin Olive Oils from Some Tunisian Varieties Grown in the Region of Tataouine. *Food Science and Technology International* 15:5–13, 2009.

Özdemir İS, Dağ Ç, Özinanç G, Suçsoran Ö, Ertaş E, Bekiroğlu S: Quantification of sterols and fatty acids of extra virgin olive oils by FT-NIR spectroscopy and multivariate statistical analyses. *LWT* 91:125–132, 2018.

Panagiotopoulou PM, Tsimidou M: Solid phase extraction: Applications to the chromatographic analysis of vegetable oils and fats. *Grasas y Aceites* 53:2002.

Papanikolaou C, Melliou E, Magiatis P: Olive Oil Phenols. In *Functional Foods*. IntechOpen, 2019.

Pardo JE, Sena E, Cuesta MA, Granell JD, Valiente J, Alvarez-Ortí M: Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from “Campos de Hellín” (Albacete, Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 90:851–862, 2013.

Pardo JE, Tello J, Suárez M, Rabadán A, Miguel C de, Álvarez-Orti M: Variety Characterization and Influence of Olive Maturity in Virgin Olive Oils from the Area Assigned to the Protected Designation of Origin “Aceite de la Alcarria” (Spain). *Agronomy* 10:38, 2020.

Peterson DW: Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. In *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 78:143–147, Society for Experimental Biology and Medicine, New York, 1951.

Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM: Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:939-966, 2000.

Piscopo A, De Bruno A, Zappia A, Gioffre G, Grillone N, Mafrica R, Poiana M: Effect of olive storage temperature on the quality of Carolea and Ottobratica oils. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 30(7):563-72, 2018.

Poljuha D, Sladonja B, Brkić Bubola K, Radulović M, Brščić K, Šetić E, Krapac M, Milotić A: A multidisciplinary approach to the characterisation of autochthonous Istrian olive (*Olea europaea* L.) varieties. *Food Technology and Biotechnology* 46(4):347–354, 2008.a

Poljuha D, Sladonja B, Šetić E, Milotić A, Bandelj D, Jakše J, Javornik B: DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. *Scientia Horticulturae* 115:223–230, 2008.b

Purcaro G, Barp L, Beccaria M, Conte LS: Fingerprinting of vegetable oil minor components by multidimensional comprehensive gas chromatography with dual detection. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407:309–319, 2015.

Radika MK, Viswanathan P, Anuradha CV: Nitric oxide mediates the insulin sensitizing effects of β-sitosterol in high fat diet-fed rats. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 32:43–53, 2013.

Rallo L, Díez CM, Morales-Sillero A, Miho H, Priego-Capote F, Rallo P: Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae* 233:491–509, 2018.

Ramprasath VR, Awad AB: Role of Phytosterols in Cancer Prevention and Treatment. *Journal of AOAC International* 98:735–738, 2015.

Ranalli A, Angerosa F: Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73:417–422, 1996.

Ranalli A, de Mattia G, Patumi M, Proietti P: Quality of virgin olive oil as influenced by origin area. *Grasas y Aceites* 50:249–259, 1999.a

Ranalli A, de Mattia G: Characterization of olive oil produced with a new enzyme processing aid. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74:1105–1113, 1997.

Ranalli A, Ferrante ML, de Mattia G, Costantini N: Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:417–424, 1999.b

Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Di Loreto G, Iannucci E, Lucera L, Russi F: Sterol and alcohol components of seed, pulp and whole olive fruit oils. Their use to characterise olive fruit variety by multivariates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:854–859, 2002.

Ranalli, Tombesi, Ferrante, De Mattia: Respiratory rate of olive drupes during their ripening cycle and quality of oil extracted. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 359–367, 1998.

Rastrelli L, Passi S, Ippolito F, Vacca G, De Simone F: Rate of degradation of α-tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:5566-5570, 2002.

Reina-Pinto JJ, Yephremov A: Surface lipids and plant defenses. *Plant physiology and biochemistry* 47:540–549, 2009.

Rivera del Álamo RM, Fregapane G, Aranda F, Gómez-Alonso S, Salvador MD: Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: the campesterol content exceeds the upper limit of 4 % established by EU regulations. *Food Chemistry* 84:533–537, 2004.

Rocha VZ, Ras RT, Gagliardi AC, Mangili LC, Trautwein EA, Santos RD: Effects of phytosterols on markers of inflammation: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 248:76–83, 2016.

Rufino-Palomares EE, Perez-Jimenez A, J. Reyes-Zurita F, Garcia-Salguero L, Mokhtari K, Herrera-Merchan A, P. Medina P, Peragon J, A. Lupianez J: Anti-cancer and Anti-angiogenic Properties of Various Natural Pentacyclic Tri-terpenoids and Some of their Chemical Derivatives. *Current Organic Chemistry* 19:919–947, 2015.

Ruiz-Aracama A, Goicoechea E, Guillén MD: Direct study of minor extra-virgin olive oil components without any sample modification. 1H NMR multisupression experiment: A powerful tool. *Food Chemistry* 228:301–314, 2017.

Rysz J, Franczyk B, Olszewski R, Banach M, Gluba-Brzozka A: The Use of Plant Sterols and Stanols as Lipid-Lowering Agents in Cardiovascular Disease. *Current Pharmaceutical Design* 23:2488–2495, 2017.

Saeidnia S: The Story of Beta-sitosterol- A Review. *European Journal of Medicinal Plants* 4:590–609, 2014.

Sakouhi F, Absalon C, Flamini G, Cioni PL, Kallel H, Boukhchina S: Lipid components of olive oil from Tunisian Cv. Sayali: characterization and authenticity. *Comptes rendus biologies* 333:642–648, 2010.a.

Sakouhi F, Absalon C, Harrabi S, Vitry C, Sebei K, Boukhchina S, Fouquet E, Kallel H: Dynamic accumulation of 4-desmethylsterols and phytostanols during ripening of Tunisian Meski olives (Olea europea L.). *Food Chemistry 112:*897–902, 2009.a.

Sakouhi F, Absalon C, Sebei K, Fouquet E, Boukhchina S, Kallel H: Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of triterpene alcohols and monomethylsterols in developing Olea europaea L. fruits. *Food Chemistry* 116:345-350, 2009.b.

Sakouhi F, Boukhchina S, Absalon C, Fouquet E, Kallel H: Policosanol characterization and accumulation during ripening of Tunisian Olea europaea L. fruits. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112:373–379, 2010.b.

Sakouhi F, Herchi W, Sbei K, Absalon C, Boukhchina S: Characterisation and accumulation of squalene and n-alkanes in developing Tunisian *Olea europaea* L. fruits. *International Journal of Food Science and Technology* 46:2281–2286, 2011.

Salas JJ, Williams M, Harwood JL, Sánchez J: Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76:1163–1168, 1999.

Salazar-García DC, Malheiro R, Pereira JA, Lopéz-Cortés I: Unexplored olive cultivars from the Valencian Community (Spain): some chemical characteristics as a valorization strategy. *European Food Research and Technology* 245:325–334, 2019.

Salvador MD, Aranda F, Fregapane G: Chemical composition of commercial Cornicabra virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75:1305–1311, 1998.

Salvador MD, Aranda F, Fregapane G: Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry* 73*:*45–53, 2001.

Samuels L, Kunst L, Jetter R: Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology* 59:683–707, 2008.

Sánchez Casas J, Osorio Bueno E, Montano Garcia AM, Martinez Cano M: Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extramandura (Spain). *Food Chemistry* 87:225-230, 2004.

Schaller H: The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research 42:*163–175, 2003.

Sena-Moreno E, Alvarez-Ortí M, Zied DC, Pardo-Giménez A, Pardo JE: Olive oils from Campos de Hellin (Spain) exhibit significant varietal differences in fatty acid composition, sterol fraction, and oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117:967–975, 2015.

Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G: Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A* 1054:113–127, 2004.

Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Selvaggini R, Taticchi A: Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants 3:*1–23, 2013.

Sivakumar G, Bati C, Perri E, Uccella N: Gas chromatography screening of bioactive phytosterols from mono-cultivar olive oils. *Food Chemistry 95:*525–528, 2006.

Skiada V, Agriopoulou S, Tsarouhas P, Katsaris P, Stamatelopoulou E, Varzakas T: Evaluation and Origin Discrimination of Two Monocultivar Extra Virgin Olive Oils, Cultivated in the Coastline Part of North-Western Greece. *Applied Sciences* 10:6733, 2020.a

Skiada V, Tsarouhas P, Varzakas T: Comparison and discrimination of two major monocultivar extra virgin olive oils in the southern region of Peloponnese, according to specific compositional/traceability markers. *Foods* 9(2):155, 2020.b

Skiada V, Tsarouhas P, Varzakas T: Preliminary Study and Observation of "Kalamata PDO" Extra Virgin Olive Oil, in the Messinia Region, Southwest of Peloponnese (Greece). *Foods* 8(12):610, 2019.

Sladonja B, Brkić K, Radulović M, Lukić I, Šetić E, Krapac M: Sadržaj ulja u plodu vodećih autohtonih sorta masline u Istri. *Pomologia Croatica* 12(2):153-158, 2006.

Sönmez A, Özdikicierler O, Gümüşkesen SA: Evaluation of olive oil quality during the ripening of the organic cultivated olives and multivariate discrimination of the variety with a chemometric approach. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 95:173–181, 2018.

Srigley CT, Oles CJ, Kia ARF, Mossoba MM: Authenticity Assessment of Extra Virgin Olive Oil: Evaluation of Desmethylsterols and Triterpene Dialcohols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93:171–181, 2016.

Stefanoudaki E, Chartzoulakis K, Koutsaftakis A, Kotsifaki F: Effect of drought stress on qualitative characteristics of olive oil of cv Koroneiki. *Grasas y Aceites* 52:202-206, 2001.

Stefanoudaki E, Kotsifaki F, Koutsaftakis A: Sensory and chemical profiles of three European olive varieties (*Olea europaea* L); an approach for the characterisation and authentication of the extracted oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:381–389, 2000.

Stefanoudaki E, Williams M, Chartzoulakis K, Harwood J: Effect of irrigation on quality attributes of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:7048–7055, 2009.

Stiti N, Hartmann MA: Nonsterol triterpenoids as major constituents of Olea europaea. *Journal of Lipids* 2012(7):476595, 2012.

Stiti N, Triki S, Hartmann MA: Formation of triterpenoids throughout Olea europaea fruit ontogeny. *Lipids* 42:55-67, 2007.

Škevin D, Rade D, Štrucelj D, Mokrovšak Ž, Neđeral S, Benčić Đ: The influence of variety and harvest time on the bitterness and phenolic compounds of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105:536–541, 2003.

Taticchi A, Selvaggini R, Esposto S, Sordini B, Veneziani G, Servili M: Physicochemical characterization of virgin olive oil obtained using an ultrasound-assisted extraction at an industrial scale: Influence of olive maturity index and malaxation time. *Food Chemistry* 289:7–15, 2019.

Taylor JC, Rapport L, Lockwood G: Octacosanol in human health. *Nutrition* 19:192–195, 2003.

Temime SB, Manai H, Methenni K, Baccouri B, Abaza L, Daoud D, Casas JS, Bueno EO, Zarrouk M: Sterolic composition of Chétoui virgin olive oil: Influence of geographical origin. *Food Chemistry* 110:368–374, 2008.

Thanh TT, Vergnes M-F, Kaloustian J, El-Moselhy TF, Amiot-Carlin M-J, Portugal H: Effect of storage and heating on phytosterol concentrations in vegetable oils determined by GC/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:220–225, 2006.

Tinto WF, Elufioye TO, Roach J: Waxes. In *Pharmacognosy - Fundamentals, Applications and Strategies.* Elsevier, 443–455, 2017.

Tombesi A: Olive fruit growth and metabolism. *Acta Horticulturae* 356: 225-232, 1994.

Uceda M, Frias L: Harvest dates: Evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality. In Proceedings of the 2nd Seminario Oleícola Internacional, Cordoba, Spain, 6 October 1975, pp. 125–128.

Valitova JN, Sulkarnayeva AG, Minibayeva FV: Plant Sterols: Diversity, Biosynthesis, and Physiological Functions. *Biochemistry. Biokhimiia 81:*819–834, 2016.

Valli E, Milani A, Srbinovska A, Moret E, Moret S, Bendini A, Moreda W, Toschi TG, Lucci P: In-House Validation of an SPE-GC-FID Method for the Detection of Free and Esterified Hydroxylated Minor Compounds in Virgin Olive Oils. *Foods* 10:1260, 2021.

Vekiari SA, Oreopoulou V, Kourkoutas Y, Kamoun N, Msallem M, Psimouli V, Arapoglou D: Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the Throumbolia and Koroneiki varieties from southern Greece. *Grasas y Aceites* 61:221–231, 2010.

Verleyen T, Forcades M, Verhe R, Dewettinck K, Huyghebaert A, Greyt W de: Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79:117–122, 2002.

Wang L, Wesemann S, Krenn L, Ladurner A, Heiss EH, Dirsch VM, Atanasov AG: Erythrodiol, an Olive Oil Constituent, Increases the Half-Life of ABCA1 and Enhances Cholesterol Efflux from THP-1-Derived Macrophages. *Frontiers in Pharmacology* 8:375, 2017.

Wang Y, Le Yu, Zhao A, Karrar E, Zhang H, Jin Q, Wu G, Yang X, Chen L, Wang X: Quality Characteristics and Antioxidant Activity during Fruit Ripening of Three Monovarietal Olive Oils Cultivated in China. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 98:229–240, 2021.

Weerawatanakorn M, Meerod K, Wongwaiwech D: Policosanols: Chemistry, Occurrence, and Health Effects. *Current Pharmacology Reports* 5:131–149, 2019.

Wojciechowski ZA: Biochemistry of phytosterol conjugates. In *Physiology and Biochemistry of Sterols*. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, 361–395, 1991.

Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJH: Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition* 63:813–820, 2009.

Yorulmaz A, Erinc H, Tekin A: Changes in Olive and Olive Oil Characteristics During Maturation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 90:647–658, 2013.

Yorulmaz A, Yavuz H, Tekin A: Characterization of Turkish Olive Oils by Triacylglycerol Structures and Sterol Profiles. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91:2077–2090, 2014.

Yorulmaz HO, Konuskan DB: Antioxidant activity, sterol and fatty acid compositions of Turkish olive oils as an indicator of variety and ripening degree. *Journal of Food Science and Technology* 54:4067–4077, 2017.

8. PRILOZI

Prilog 1 Proizvodnja maslinovog ulja u Svijetu i u EU (sezone 2018/2019. – 2020./2021.) (IOC, 2020.b)

	Proizvodnja u tonama x 1000				Udio u svjetskoj proizvodnji, %	Udio u proizvodnji EU, %
	2018/2019	2019/2020 (predviđanje)	2020/2021 (predviđanje)	prosjek		
IOC - EU						
Španjolska	1789,9	1125,3	1596,1	1503,8	47	70,3
Italija	173,6	366	255	264,9	8	12,4
Grčka	185	275	265	241,7	8	11,3
Portugal	100,3	140,5	100	113,6	4	5,3
Cipar	4,7	7	6,1	5,9	0,2	0,3
Francuska	5,8	5,9	5,2	5,6	0,2	0,3
Hrvatska	3,4	4,1	4,6	4,0	0,1	0,2
Slovenija	0,9	0,3	0,8	0,7	0,0	0,0
Malta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
EU	2263,7	1924,1	2232,8	2140,2	66	100,0
IOC-neEU						
Turska	193,5	225,0	210,0	209,5	7	
Tunis	140,0	350,0	120,0	203,3	6	
Moroko	200,0	145,0	160,0	168,3	5	
Alžir	97,0	125,5	98,5	107,0	3	
Egipat	41,0	42,0	40,0	41,0	1	
Zemlje Mediterana ukupno:					93	
Argentina	28,0	30,0	27,0	28,3	1	
Jordan	21,0	34,5	25,0	26,8	1	
Libanon	25,5	27,0	26,0	26,2	1	
Palestina	15,0	39,5	12,0	22,2	1	
Iran	11,5	14,0	17,5	14,3	0,4	
Izrael	14,0	19,0	11,0	14,7	0,5	
Ostale IOC-neEU						
Ne IOC						
Sirija	104,0	120,0	115,0	113,0	4	
Čile	20,0	17,0	20,0	19,0	1	
Australija	18,5	20,0	20,5	19,7	1	
SAD	16,0	16,0	16,0	16,0	0,5	
Kina	5,5	7,0	7,5	6,7	0,2	
Ostale ne IOC						
Ukupna svjetska proizvodnja	3262	3207	3197	3222,0	100	

Prilog 2 Mikrosatelitni profili sorti maslina s kojima je utvrđena morfološki identifikacija sorti maslina iz ovog istraživanje

Sorta:	Buža[1]	Črna (sin. Porečka rosulja)[2]	Rosinjola[3]
Broj primke	FRU00260	FRU00262	FRU00265
Marker	Veličina alela (bp)		
EMO-090	186, 188	186, 188	186, 194
ssrOeUA-DCA03	239, 253	239, 249	231, 243
ssrOeUA-DCA05	206, 208	206, 208	198, 208
ssrOeUA-DCA04	132, 132	134, 164	134, 166
ssrOeUA-DCA08	127, 139	127, 139	127, 137
ssrOeUA-DCA09	194, 204	194, 206	172, 204
ssrOeUA-DCA13	122, 140	120, 120	120, 120
ssrOeUA-DCA14	181, 191	191, 191	191, 191
ssrOeUA-DCA15	246, 246	246, 246	246, 246
ssrOeUA-DCA16	150, 174	150, 174	144, 154
ssrOeUA-DCA18	173, 177	173, 177	158, 177
GAPU71B	121, 130	124, 144	124, 130
GAPU103A	136, 159	136, 159	159, 174
UDO99-043	176, 212	174, 176	176, 218

[1] Cultivar: Buža (hapih.hr); https://cpgrd.hapih.hr/gb/fruit/main/accession/391?document_code=PASSPORT
[2] Cultivar: Črna (syn. Porečka rosulja) (hapih.hr); FRU00262 - Olea europaea L. (hapih.hr)
[3] Cultivar: Rosinjola (hapih.hr); https://cpgrd.hapih.hr/gb/fruit/main/accession/396?document_code=PASSPORT

Prilog 3 Zdravstvene tvrdnje koje se potencijalno mogu primijeniti na maslinovo ulje (EK, 2021.)

Hranjiva tvar, hrana ili kategorija hrane	Tvrdnja	Uvjeti korištenja tvrdnje	Referenca mišljenja EFSA-e	Datum ažuriranja
Jednostruko nezasićene i/ili višestruko nezasićene masne kiseline	(1a) Zamjena zasićenih masti u prehrani nezasićenim mastima doprinosi održavanju normalne razine kolesterola u krvi (jednostruko nezasićene i višestruko nezasićene masne kiseline su nezasićena mast)	Tvrdnja se smije koristiti samo za hranu koja je bogata nezasićenim masnim kiselinama, kako je navedeno u tvrdnji BOGATO NEZASIĆENIM MASNIM KISELINAMA iz Priloga Uredbe (EZ) br. 1924/2006. (EPiV, 2014.)	2011;9(4):2069, 2011;9(6):2203	12.12.2012.
Oleinska kiselina	(1b) Zamjena zasićenih masti u prehrani nezasićenim mastima doprinosi održavanju normalne razine kolesterola u krvi. Oleinska kiselina je nezasićena mast.		2011;9(4):2043	12.12.2012.
Vitamin E	(2) Vitamin E doprinosi zaštiti stanica od oksidativnog stresa	Tvrdnja se smije koristiti samo za hranu koja je izvor najmanje one količine vitamina E koja je navedena u tvrdnji IZVOR [NAZIV VITAMINA] I/ILI [NAZIV MINERALA] iz Priloga Uredbe (EZ) br. 1924/2006. (EPiV, 2014.)	2010;8(10):1816	12.12.2012.
Polifenoli maslinovog ulja	(3) Polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidativnog stresa	Tvrdnja se smije koristiti samo za maslinovo ulje koje sadrži najmanje 5 mg hidroksitirozola i njegovih derivata (npr. oleoeuropein kompleks i tirozol) u 20 g maslinovog ulja. Za korištenje tvrdnje potrošaču treba dati informaciju da se blagotvorni učinak postiže dnevnim unosom 20 g maslinovog ulja.	2011;9(4):2033	12.12.2012.

Uvjet za tvrdnju (1 a i b): tvrdnja da je neka hrana bogata nezasićenim masnim kiselinama i svaka tvrdnja za koju je vjerojatno da ima isto značenje za potrošača, može se navoditi ako najmanje 70 % od ukupnih masnih kiselina prisutnih u proizvodu potječe od nezasićenih masnih kiselina, pod uvjetom da nezasićene masne kiseline osiguravaju više od 20 % energetske vrijednosti proizvoda. **Uvijet za tvrdnju (2):** > 5 mg / 20g ulja (> 250 mg/kg) (EPiV, 2014., 2018.). **Uvijet za tvrdnju (3)**: donja granica od 5 mg / 20g ulja odgovara koncentraciji 250 mg/kg proizvoda.