

VPLIV NAPADA OLJČNE MUHE (*Bactrocera oleae* [Rossi]) NA VSEBNOST IN SESTAVO BIOFENOLOV OLJČNEGA OLJA

Maja PODGORNİK¹, Erika BEŠTER², Bojan BUTINAR³, Milena BUČAR-
MIKLAVČIČ^{4,5}, Ana MIKLAVČIČ VIŠNJEVEC⁶, Vasilij VALENČIČ⁷

^{1,2,3,4,7}Znanstveno-raziskovalno središče Koper, Inštitut za oljkarstvo, Koper

⁵LABS d.o.o., Inštitut za ekologijo, oljčno olje in kontrolo, Izola

⁶Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske
tehnologije, Koper

IZVLEČEK

Samica oljčne muhe (*Bactrocera oleae*) odloži v plod oljke jajčece, iz katerega se izleže ličinka. Ličinka se hrani z vrtnjem mesnatega dela plodu, kar vodi v nastanek mehanskih poškodb rastlinskega tkiva. Samička z vbodom v plod oljke omogoči tudi nastanek sekundarne bakterijske in glivične okužbe, ki povzročajo gnitje plodov in občutno zmanjšanje količine in kakovosti pridelka. Izjemno vlažne in relativno hladne vremenske razmere v rasti dobi 2014 so močno vplivale na razvoj oljčne muhe, ki je povzročila veliko gospodarsko škodo v slovenskih oljčnikih. Z namenom, da bi ocenili vpliv poškodovanosti plodov zaradi oljčne muhe na vsebnost in sestavo biofenolov v predelanem oljčnem olju smo izvedli terensko in laboratorijsko raziskavo. Na terenu smo na različnih lokacijah Slovenske Istre opravili vzorčenje plodov sorte 'Istrska belica', pri katerih smo zabeležili različno stopnjo napadenosti plodov z oljčno muho. Vzorce plodov posamezne lokacije smo razdelili v dva podvzorca, in sicer na plodove z aktivno napadenostjo, ki smo jo definirali z vbodom samičke in na plodove s škodljivo napadenostjo, ki smo jo definirali z izhodno odprtino. Podvzorce smo predelali v olja in določili vsebnost in sestavo biofenolov. Ugotovili smo, da imajo olja, predelana iz plodov z aktivno napadenostjo največjo povprečno vsebnost biofenolov oleuropeinskega izvora (379 mg/kg), ligstrozidnega izvora (285 mg/kg) in skupnih biofenolov (770 mg/kg), medtem ko so vsebnosti obravnavanih spojin znatno manjše v vzorcih predelanih plodov s škodljivo napadenostjo (106 mg/kg biofenolov oleuropeinskega izvora, 215 mg/kg biofenolov ligstrozidnega izvora in 363 mg/kg skupnih biofenolov).

Ključne besede: biofenoli, 'Istrska belica', ligstrozid, oleuropein, oljčna muha

¹ dr., Garibaldijeva 1, SI-6000 Koper, e-pošta: Maja.Podgornik@zrs.upr.si

² dr., prav tam

³ dr., prav tam

⁴ univ. dipl. kem., prav tam

⁵ univ. dipl. kem., Zelena ulica 8 c, SI-6310 Izola

⁶ dr., Glagoljaška 8, SI-6000 Koper

⁷ dr., Garibaldijeva 1, SI-6000 Koper

ABSTRACT

EFFECT OF OLIVE FRUIT FLY (*Bactrocera oleae* [Rossi]) INFESTATION ON THE BIOPHENOL CONTENT AND COMPOSITION OF OLIVE OIL

The olive fruit fly *Bactrocera oleae*, damages olive by laying eggs under the skin of ripening fruits. After hatching, larvae feed on the fruit's mesocarp, causing mechanical destruction of plant tissues. Furthermore, oviposition provides entry of secondary infestation of bacteria and fungi that rot the fruit and seriously lower the quantity and quality of olive oil. In 2014, the extremely humid and relatively chill weather conditions during the growing season favoured the development of the olive fruit fly, which caused serious economic damage to Slovenian's olive orchards. In order to evaluate the effect of olive-fly-damaged fruit on the biophenol content and composition of olive oil, a field and laboratory study was carried out. Olive samples with various level of infestation of the variety 'Istrska belica' were collected from ten different locations in Slovene Istria. The fruit samples of each location were classified in two subsamples (the fruit with damage infestation determined by emergence holes and fruit with active infestation determined by olive fruit fly puncture) and olive oils were produced. In the subsamples of olive oils the biophenol content and composition were determined. Oils produced from fruits with active infestation showed the highest average amount of oleuropein derivatives, ligstroside derivatives and total biophenols (379 mg/kg, 285 mg/kg and 770 mg/kg, respectively), while the lowest average amounts (106 mg/kg, 215 mg/kg and 363 mg/kg, respectively) were determined in oils produced from fruits with damage infestation article.

Key words: biophenols, 'Istrska belica', ligstroside, oleuropein, olive fruit fly

1 UVOD

Oljna muha (*Bactrocera oleae*), znana kot najpomembnejši škodljivec oljk, je v letu 2014 povzročila veliko gospodarsko škodo. Po ocenah Jančarja in sod. (2015) je skupna škoda na območju Slovenske Istre v letu 2014 preseгла 75 % povprečne letne količine pridelanega oljčnega olja.

Podgornik in sod. (2011, 2013) in Civantos (1999) navajajo, da je dinamika leta in intenzivnost napada oljčne muhe v veliki meri odvisna od vremenskih in mikropodnebnih razmer. Dokazano je, da se pri visoki zračni vlagi in temperaturi med 20 in 30 °C število oljčnih muh znatno poveča. V kolikor se temperatura zviša nad 32 °C, relativna vlažnost pa zniža, se plodovi oljke posušijo in ličinke oljčne muhe ne preživijo.

Analiza meteoroloških parametrov je pokazala, da smo v zimskem obdobju 2013/2014 beležili izjemno visoke povprečne temperature, medtem ko so bile najvišje temperature zraka v rastni dobi 2014 znatno nižje v primerjavi z dolgoletnim povprečjem 1991-2010. V rastni dobi 2014 je bila zabeležena tudi izjemno visoka množina padavin (965 mm) in vrednosti relativne zračne vlage (75 %), saj so znatno presegle vrednosti dolgoletnega povprečja 1991-2010 (637 mm padavin in relativna zračna vlaga 69 %). Izredno mila zima v 2013/2014 ter ugodne vremenske razmere v

rastni dobi 2014 za razvoj oljčne muhe so vplivale na visok odstotek napadenosti plodov.

Malheiro in sod. (2015) poročajo, da napad oljčne muhe vpliva na kakovost oljčnega olja in posledično na razvrščanje olja v kategorije, na kemijske, senzorične ter prehranske značilnosti oljčnega olja. Biofenoli oljke (*Olea europaea* L.) so sekundarni metaboliti, ki varujejo plodove in oljčno olje pred oksidacijo ter prispevajo k senzoričnim značilnostim pridobljenega (ekstra) deviškega oljčnega olja. Biofenoli so lahko enostavne substituirane spojine z majhno molekulska masa, ki imajo na aromatskem obroču vezano eno ali več hidroksilnih skupin, lahko pa so tudi kompleksnejše strukture vezane na monoterpene. Oljka spada v družino Oleaceae, v kateri se pojavljajo spojine podobne kumarinom, to so sekoiridoidi (Jensen in sod., 2002). Za sekoiridoide je značilna eksociklična dvojna vez na položaju 8,9- oziroma oleozid, značilen za rastline iz družine Oleaceae (Ryan in sod., 2002). Značilna oleozida sta oleuropein, ki je ester elenolne kisline in 2-(3,4-dihidroksifenil)etanola (3,4-DHPEA) in ligstrozid, ki je ester elenolne kisline in 2-(4-hidroksifenil)etanola (p-HPEA). Derivati oleuropeina in ligstrozida predstavljajo glavne fenolne oleozide v oljki in dajejo ekstra deviškemu oljčnemu olju tudi specifično aromo. Oleacein je predstavnik sekoiridoidov oleuropeinskega izvora in je grenkega okusa, medtem ko je oleokantal predstavnik sekoiridoidov ligstrozidnega izvora in daje olju pikantnost. V raziskavi smo preučili vpliv napada oljčne muhe na vsebnost in sestavo biofenolov.

142

2 MATERIALI IN METODE

Plodove oljk sorte 'Istrska belica' smo vzorčili na 10 lokacijah v Slovenski Istri. Vzorce plodov posamezne lokacije smo razdelili v dva podvzorca, in sicer na plodove z aktivno napadenostjo, ki smo jo definirali z vbovom samičke in na plodove s škodljivo napadenostjo, ki smo jo definirali z izhodno odprtino. Plodove smo predelali v olja v laboratorijski oljarni Abencor system MC2 (MC2 Ingenieria y Sistemas, S. L., Španija) in določili vsebnost in sestavo biofenolov. V 50 mL-centrifugirko smo odtehtali 5,0 g oljčnega olja s točnostjo 0,1 mg, dodali 2,5 mL raztopine internega standarda (siringična kislina, $c=0,015$ mg/mL) in postavili na stresalnik za 30 sekund. Dodali smo 25 mL heksana, raztopino prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 10 mL 60-odstotnega (m/m) metanola. Ekstrahirali smo trikrat z dvo minutnim stresanjem in pustili, da se fazi ločita. Združenemu ekstraktu smo odstranili topilo z rotavaporjem pri 40 °C. Posušen ekstrakt smo raztopili v 1 mL metanola in ga filtrirali skozi 0,45 µm-filter v 2 mL-vialo. Vsebnost in sestavo biofenolov smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) po modificirani metodi Mednarodnega sveta za oljke COI/T.20/Doc. no. 29, 2009. Uporabili smo tekočinski kromatograf Agilent 1100 Series (Agilent technologies, USA), opremljen z binarno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom in DAD detektorjem (detekcija pri 280 nm). Biofenole smo ločili na reverzni fazi na koloni Phenomenex synergi hydro, 250 x 4,60 mm (Phenomenex, ZDA). Separacija biofenolov je potekala z gradientno elucijo, pretok 1 mL/min. Mobilna faza A je bila 0,2 % vodna raztopina metanojske kisline (V/V), mobilna faza B mešanica metanola in acetonitrila (1:1, V/V). Gradient na začetku analize je bil 96 % mobilne faze A in 4 % mobilne faze B, ki se je nato v 40 min spremenil na 50 % B, v naslednjih 5 min na 60 % B in v zadnjih 15 min na 100 % B. Po 72 min od začetka analize se je koncentracija

mobilne faze B zmanjšala na začetno vrednost 4 % za 10 min. Sestavo biofenolov smo določili v 10 μL alikvotu metanolnega ekstrakta biofenolov. Biofenole smo kvantitativno določili na osnovi internega in zunanega standarda oziroma kalibracijske mešanice tirosola (0,030 mg/mL) in siringične kisline (0,015 mg/mL). Na osnovi zunanega standarda smo izračunali faktor odziva za tirosol in siringično kislino ter relativni faktor odziva med siringično kislino in tirosolom, ki nam pozneje omogoča, da ob uporabi internega standarda preračunamo vsebnost biofenolov na tirosol.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V raziskavi smo ugotavljali vpliv napada oljčne muhe na vsebnost in sestavo biofenolov v predelanem oljčnem olju. Osredotočili smo se na vsebnost biofenolov oleuropeinskega in ligstrozidnega izvora ter na vsebnost skupnih biofenolov. Omenjene spojine smo določili v vzorcih obranih na 10 lokacijah Slovenske Istre, in sicer v vzorcih olja, ki smo jih predelali iz plodov sorte 'Istrska belica' z aktivno in škodljivo napadenostjo oljčne muhe. Rezultati povprečne, najmanjše, največje in standardne deviacije vsebnosti obravnavanih spojin so podani v preglednici 1.

Preglednica 1: Povprečna (povp), najmanjša (min), največja (max) in standardna deviacija (std) vsebnosti biofenolov oleuropeinskega (oleuropeinski BF) in ligstrozidnega (ligstrozidni BF) izvora ter skupnih biofenolov (skupni BF) v vzorcih olja, predelanih iz plodov z aktivno in škodljivo napadenostjo oljčne muhe.

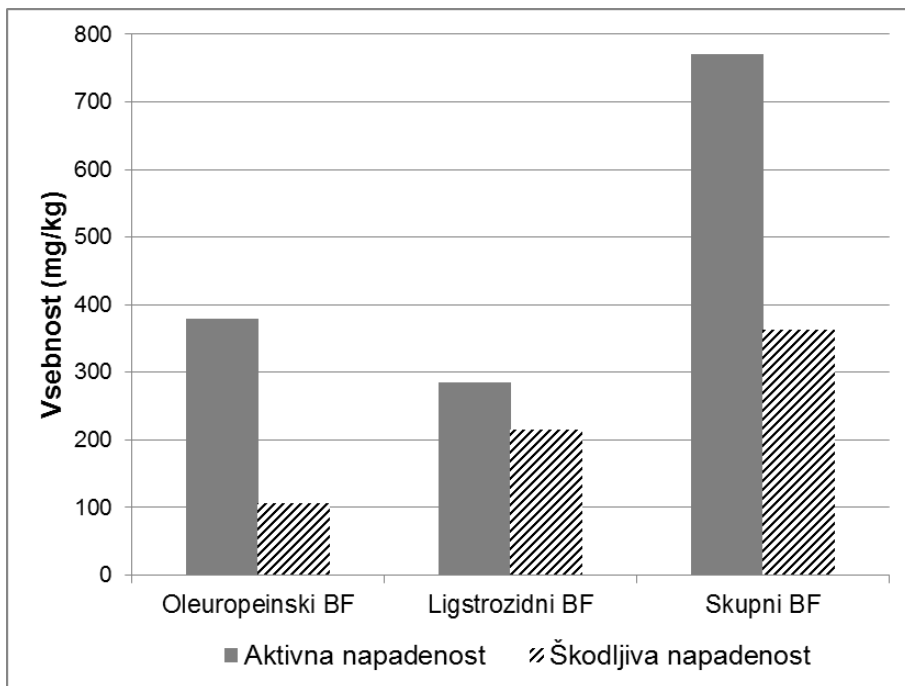
	Aktivna napadenost				Škodljiva napadenost			
	povp	min	max	std	povp	min	max	std
Oleuropeinski BF	379	229	554	103	106	5	237	76
Ligstrozidni BF	285	163	358	59	215	86	420	96
Skupni BF	770	472	1035	167	363	104	556	163

Ugotovili smo, da imajo olja, predelana iz plodov z aktivno napadenostjo, največjo povprečno vsebnost biofenolov oleuropeinskega izvora (379 mg/kg), ligstrozidnega izvora (285 mg/kg) in skupnih biofenolov (770 mg/kg), medtem ko so vsebnosti obravnavanih spojin znatno manjše v vzorcih, predelanih iz plodov s škodljivo napadenostjo (106 mg/kg biofenolov oleuropeinskega izvora, 215 mg/kg biofenolov ligstrozidnega izvora in 363 mg/kg skupnih biofenolov). Rezultati povprečne vsebnosti obravnavanih spojin so prikazani na sliki 1.

Na vseh desetih lokacijah je bila vsebnost biofenolov oleuropeinskega izvora manjša v vzorcih, predelanih iz plodov s škodljivo napadenostjo, in sicer od 45 % do 99 % glede na vzorce z aktivno napadenostjo iz posamezne lokacije. V povprečju smo v vzorcih s škodljivo napadenostjo določili 72 % manjšo vsebnost biofenolov oleuropeinskega izvora v primerjavi z vzorci z aktivno napadenostjo.

Preučili smo tudi razlike v vsebnosti biofenolov ligstrozidnega izvora. V devetih primerih je bila vsebnost biofenolov ligstrozidnega izvora manjša v vzorcih, predelanih iz plodov s škodljivo napadenostjo, in sicer od 3 % do 74 % glede na vzorce z aktivno napadenostjo iz posamezne lokacije; le v enem primeru pa smo

ugotovili, da je bila vsebnost biofenolov ligstrozidnega izvora večja za 17 % v vzorcu s škodljivo napadenostjo glede na vsebnost v vzorcu z aktivno napadenostjo. V povprečju smo v vzorcih s škodljivo napadenostjo določili 25 % manjšo vsebnost biofenolov ligstrozidnega izvora v primerjavi z vzorci z aktivno napadenostjo.



Slika 1: Povprečna vsebnost biofenolov oleuropeinskega (oleuropeinski BF) in ligstrozidnega (ligstrozidni BF) izvora ter skupnih biofenolov (skupni BF) v olju iz plodov z aktivno in škodljivo napadenostjo.

Razlike med škodljivo in aktivno napadenostjo se odražajo tudi v vsebnosti skupnih biofenolov. Na vseh desetih lokacijah je bila vsebnost skupnih biofenolov manjša v vzorcih, predelanih iz plodov s škodljivo napadenostjo, in sicer od 29 % do 87 % glede na vzorce z aktivno napadenostjo iz posamezne lokacije. V povprečju smo v vzorcih s škodljivo napadenostjo določili 53 % manjšo vsebnost skupnih biofenolov v primerjavi z vzorci z aktivno napadenostjo. O podobnih rezultatih poročajo tudi literarni viri, saj navajajo, da vsebnost skupnih biofenolov negativno korelira s stopnjo napadenosti plodov (Tamendjari in sod., 2009; Gucci in sod., 2012). Zmanjšanje vsebnosti skupnih biofenolov ob napadu oljčne muhe je odvisno tudi od občutljivosti sorte oljk na napad oljčne muhe (Koprivnjak in sod., 2010; Mraicha in sod., 2010), specifična sestava biofenolov pa je odvisna od sorte oljk (Vinha in sod., 2005). Gucci in sod. (2012) so preučili vpliv oljčne muhe na sestavo biofenolov pri

sorti 'Frantoio' in ugotovili, da napad oljčne muhe najbolj vpliva na biofenole sekoiridoidnega izvora, torej na biofenole oleuropeinskega in ligstrozidnega izvora.

4 SKLEPI

V raziskavi smo preučili vpliv napada oljčne muhe na vsebnost in sestavo biofenolov, zanimalo so nas razlike med aktivno in škodljivo okuženostjo plodov. Iz rezultatov je razvidno, da je vsebnost biofenolov oleuropeinskega in ligstrozidnega izvora ter skupnih biofenolov večja v vzorcih olja, predelanih iz plodov z aktivno napadenostjo, medtem ko so vsebnosti obravnavanih spojin znatno manjše v vzorcih olja, predelanih iz plodov s škodljivo napadenostjo. Spremljanje napada oljčne muhe, okuženosti plodov oljke in pravočasno ukrepanje s fitosanitarnimi sredstvi zelo pomembno vpliva na kakovost pridobljenega olja, saj le iz optimalno zrelih in nepoškodovanih plodov lahko predelamo ekstra deviško oljčno olje primerne (vrhunske) kakovosti. Pravočasno ukrepanje proti oljčni muhi lahko bistveno prispeva k zmanjšanju poškodovanosti plodov, kar posledično vpliva na ohranjanje biofenolov, ki s svojim antioksidativnim delovanjem zagotavljajo stabilnost pridobljenega ekstra deviškega oljčnega olja in vplivajo na njegove specifične senzorične značilnosti.

5 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujejo vsem pridelovalcem, ki so omogočili vzorčenje plodov, mag. Viljanki Vesel iz Poskusnega centra za oljkarstvo KGZS KGZ Nova Gorica za predelavo plodov, Saši Volk, Katji Fičur in Tinetu Matošu za pripravo metanolnih ekstraktov biofenolov.

6 LITERATURA

- Civantos, M.L.V. 1999: Olive pest and disease Management. Collection: Practical handbooks. International olive council, Madrid.
- COI/T.20/Doc. no. 29. 2009. Determination of biophenols in olive oils by HPLC. Madrid, International Olive Council, 2009: 8 str. (<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testing-methods>, 27.02.2017).
- Gucci, R., Caruso, G., Canale, A., Loni, A., Raspi, A., Urbani, S., Taticchi, A., Esposito, S., Servili, M. 2012. Qualitative changes of olive oils obtained from fruits damaged by *Bactrocera oleae* (Rossi). HortScience, 47, 2: 301-306.
- Jančar, M., Vesel V., Vrhovnik I. Pregled stanja in vzrokov za množičen pojav oljčne muhe (*Bactrocera oleae* rossi) v slovenski Istri v letu 2014. V: Trdan, S (ur.). Zbornik predavanj in referatov 12. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Ptuj, 3.-4. marec 2015. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 41-58.
- Jensen, S. R., Franzky, H., Wallander, E. 2002. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. Phytochemistry, 60: 213-231.
- Koprivnjak, O., Dmunič, I., Kosić, U., Majetić, V., Godena, S., Valenčič, V. 2010. Dynamics of oil quality parameters changes related to olive fruit fly attack. European Journal of Lipid Science and Technology, 112: 1033-1040.
- Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., Pereira, J. A., 2015. A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: From the tree to the table. Trends in Food Science & Technology, 44: 226-242.
- Mraicha, F., Ksantini, M., Zouch, O., Ayadi, M., Sayadi, S. 2010. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. Food and Chemical Toxicology, 48: 3235-3241.

- Tamendjari, A., Angerosa, F., Mettouchi, S., Bellal, M. M. 2009. The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of Chemlal olive oil. *Grasas y aceites*, 60, 5: 507-513.
- Podgornik, M., Jančar, M., Tomažič, I., Arbeiter, A., Bandelj, D. 2011. Vpliv vremenskih razmer na dinamiko populacije oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) V: Maček, J. (ur.), Trdan, S. (ur.). Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Podčetrtek, 1.-2. marec 2011. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 53-56.
- Podgornik, M., Tomažič, I., Arbeiter, A., Hladnik, M., Bandelj, D. 2013. Population fluctuation of adult males of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi) analysis in olive orchards in relation to abiotic factors. *Entomological news*, 123, 1:15-25.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176.
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, M. S., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., Oliveira, M. B., Seabra, R. M., Andrade, P. B. 2005. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89: 561-568.