

Stabilnost napitka od lista masline tijekom skladištenja pri povišenoj temperaturi

Hajdinjak, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:607374>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Ivana Hajdinjak

6753/N

**STABILNOST NAPITKA OD LISTA MASLINE TIJEKOM
SKLADIŠTENJA PRI POVIŠENOJ TEMPERATURI**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IT-PE-FF)

Mentor: Prof. dr. sc. Branka Levaj

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

STABILNOST NAPITKA OD LISTA MASLINE TIJEKOM SKLADIŠTENJA PRI POVIŠENOJ TEMPERATURI

Ivana Hajdinjak, 0058203646

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost napitka od lista masline tijekom 12 tjedana skladištenja u nepovoljnim uvjetima i to na temperaturi od 30 °C, a provedene su sljedeće analize: određivanje koncentracije ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom, određivanje boje CIELAB metodom, određivanje mikrobiološke ispravnosti i određivanje senzorskih svojstva kvalitativnom deskriptivnom analizom. Koncentracija ukupnih fenola skladištenjem se smanjuje, ali ne značajno. Antioksidacijski kapacitet ostao je približno jednak tijekom skladištenja. Mjerenje boje ukazalo je na smanjenje L i H vrijednosti, te porasta a, b, C i ΔE vrijednosti. Vezano za senzorska svojstva skladištenjem napitka dolazi do smanjenja žute boje, mirisa na list masline, okusa na list masline, trpkog okusa, gorkog okusa, arome svojstvene na list masline i arome na zeleno, te se povećava udio smeđe boje i harmoničnog okusa. Strani miris, okus i aroma su manje zastupljeni ili ih uopće nema. Mikrobiološka ispitivanja ukazuju na zadovoljavajuću stabilnost napitka tijekom skladištenja.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, fenoli, list masline, napitak, skladištenje

Rad sadrži: 35 stranica, 9 slika, 3 tablica, 81 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Branka Levaj

Pomoć pri izradi: dr. sc. Maja Repajić

Datum obrane: 07.07.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Nutrition

Department of Food Engineering

Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE STABILITY OF OLIVE LEAF DRINK DURING STORAGE AT HIGH TEMPERATURE

Ivana Hajdinjak, 0058203646

Abstract: The purpose of this study was to examine the stability of olive leaf drink during 12 weeks of storage under unfavorable conditions, at 30 ° C. The following analyzes were carried out: determination of total phenol concentration by Folin-Ciocalteu reagent, determination of antioxidant capacity using DPPH method, color determination using CIELAB method, determination of microbiological accuracy and determination of sensory properties by qualitative descriptive analysis. During storage, concentration of total phenol was not significantly reduced, while the antioxidant capacity remained approximately unchanged. Color measurement indicated a decrease in values L and H, while values a, b, C and ΔE were increased. Sensory tests showed reduction of yellow color, smell of olive leaf, olive leaf taste, sourness, bitterness, olive leaf aroma and green aroma, while estimated values of brown color and harmonious taste increased. Sensory tests report that strange smell, taste and aroma are less present or not present at all. Microbiological studies indicate satisfactory drink stability during the trial period.

Keywords: antioxidant capacity, phenol, olive leaf, drink, storage

Thesis contains: 35 pages, 9 figures, 3 tables, 81 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Full Professor PhD Branka Levaj

Technical support and assistance: Scientific Assistant PhD Maja Repajić

Defence date: July 7th 2017

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. List masline.....	2
2.2. Kemijski sastav lista masline.....	3
2.2.1. Fenolni sastav lista masline.....	3
2.2.2. Oleuropein.....	5
2.3. Zdravstveni učinci.....	6
2.4. Upotreba lista masline.....	7
2.4.1. Proizvodnja čaja od lista masline.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. Materijali.....	9
3.1.1. Čaj od lista masline.....	9
3.1.2. Otapala i reagensi.....	10
3.1.3. Aparatura i pribor.....	11
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola	12
3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	14
3.2.3. Određivanje boje CIELAB metodom.....	16
3.2.4. Određivanje senzorskih svojstva.....	17
3.2.5. Određivanje mikrobiološke aktivnosti.....	17
3.3. Rezultati i rasprava.....	18
4. ZAKLJUČAK.....	26
5. LITERATURA.....	27
6. PRILOZI	

1. UVOD

Uzgoj maslina poznat je od davnina, a najviše je rasprostranjen u mediteranskim zemljama gdje prevladava umjereno topla klima u kojoj ne dolazi do prevelikih promjena temperature. Niska učestalost kardiovaskularnih bolesti i karcinoma u mediteranskim zemljama privukla je pozornost znanstvenika, a mediteranska prehrana koja se između ostalog sastoji od maslina i proizvoda od maslina, smatra se jednim od razloga tome.

Maslinovo ulje je jedno od osnova mediteranske prehrane, široko proučeno zbog svojeg antioksidacijskog djelovanja, posebno zbog svog fenolnog sastava.

Pri uzgoju maslina i proizvodnje maslinovog ulja stvaraju se znatne količine otpada među koje pripada i lišće masline. Ono se gomila tijekom obrezivanja stabla i može se naći u velikim količinama pri proizvodnji maslinovog ulja, nakon što se odvoji od plodova, prije same obrade.

Znanstvenici su u mnogim istraživanjima pokazali kako lišće masline ima antioksidacijsku aktivnost, antihipertenzivno, hipoglikemijsko, hipokolesterolemijsko, kardioprotektivno, protuupalno djelovanje, sposobnost smanjenja koncentracije lipida itd.

Interes za upotrebom lišća masline u proizvodnji funkcionalne hrane i dodataka prehrani raste zbog navedenih pozitivnih učinaka na zdravlje. Upotreba takvog ekstrakta u prehrambenoj industriji može pridonijeti poboljšanju zdravlja potrošača i produljenju roka trajanja prehrambenim proizvodima. Lišće masline često se koristi kao tradicionalni lijek u europskim i mediteranskim zemljama, najčešće u obliku ekstrakta, biljnog čaja ili praha.

Cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost napitka od lista masline tijekom 12 tjedana skladištenja pri nepovoljnim uvjetima i to na temperaturi od 30°C pri čemu je praćena boja, senzorska svojstva, udio ukupnih fenola, antioksidacijski kapacitet i mikrobiološka ispravnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. List masline

Listovi masline su mali, duguljasti i kožasti. Lice lista je svijetlozelene boje, a naličje je bijelo. Lišće je po granama pravilno razdijeljeno tako da se po dva lista nalaze jedan nasuprot drugom, a grana završava s jednim listom. U pazušcima listova smješteni su pupovi, koji su šiljasti ili okrugli. Šiljasti su pupovi drveni, a okrugli su cvjetni (Kantonci, 2006.).



Slika 1. Lišće masline (Anonymous, 2016.)

Tijekom uzgoja i procesiranja masline nastaje velika količina otpada. Preostala biomasa zaostala nakon obrezivanja masline, smatrana se velikim, jeftinim i neiskorištenim izvorom energije i kemikalija (Nassima i sur., 2015.). Lišće masline obično se spaljuje ili baca s ostatkom otpada (Romero-García i sur., 2014.), što dovodi do zagađenja okoliša (Xie i sur., 2015.).

Kada se nije bacalo, lišće masline koristilo se kao narodni lijek za suzbijanje groznice i drugih bolesti poput malarije (Benavente-Garcia i sur. 2000.). Poljoprivrednici, koji su se osim maslinarstvom bavili i stočarstvom, su upotrebljavali lišće kao hranu za stoku (Rahmanian i sur., 2015.).

Termin "lišće masline" odnosi se na mješavinu lišća i grana nakon obrezivanja stabla masline, sakupljanja i čišćenja maslina (Molina-Alcaide i sur., 2008.).

List je primarno mjesto u kojem se odvija metabolizam pri čemu nastaju primarni i sekundarni biljni metaboliti (Antolovich i sur., 2000.), pa se smatra potencijalnim izvorom bioaktivnih spojeva. Lišće masline je važno zbog njegovih sekundarnih metabolita kao što su sekoiridoidni spojevi oleacin i oleuropein (Pereira i sur., 2007.).

Nedavne studije o maslinama su pokazale da je lišće masline najbogatije fenolnim spojevima kao što je oleuropein i hidroksitirozol (Benavente-Garcia i sur., 2000.). Struktura i visoki antioksidacijski kapacitet ovih fenola omogućuje njihovu upotrebu u medicini, kozmetici, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Erbay i Icier, 2010.).

2.2. Kemijski sastav lista masline

Kemijski sastav lista masline razlikuje se prema podrijetlu, udjelu prisutnih grančica, uvjetima skladištenja, sadržaju vlage i stupnju onečišćenja tla (Martin-Garcia i sur., 2008. i Delgado-Pertinez 2000.).

Sadržaj sirovih proteina varira između 9,5-12,9% (Delgado-Pertinez 2000.). Od aminokiselina najviše sadrži arginin, leucin, prolin, glicin, valin i alanin (Martin-Garcia i sur., 2003.). Najveći udio hemiceluloznih vlakna sadrži arabinozu, dok grane uglavnom sadrže manozu (Garcia-Maraver i sur. 2013.).

Međutim, najcjenjeniji sastojci lišća masline su fenolni spojevi od kojih su u najvišem udjelu prisutni oleuropein, hidroksitirozol, verbaskozid, apigenin-7-glukozid i luteolin-7-glukozid (Benavente-Garcia i sur., 2000.) .

2.2.1. Fenolni sastav lista masline

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni metaboliti koji nastaju u biljkama različitim metaboličkim putovima (pentoza fosfatni, put šikimeinske kiseline i fenilpropanoidni put) (Talhoui i sur., 2015.). Lišće masline sadrži fenolne spojeve kao i druge biljke, ali za masline su karakteristični sekoiridoidi (isključivo za obitelj Oleaceae) (Talhouia i sur., 2015.). Polifenoli masline nastaju kao posljedica reakcije na napad patogena i odgovor na ozljede od insekata (Japon-Lujan i sur., 2006.).

Poznato je kako maslinovo ulje povoljno utječe na zdravlje zbog velike količine polifenola koje sadrži. Međutim, istraživanja su pokazala kako lišće masline sadrži veću količinu npr. sadržaj oleuropeina u maslinovo ulju je između 0,005 i 0,12%, dok lišće masline sadrži od 1 do 14% (Japon-Lujan i sur., 2006.).

Popularnost fenolnih spojeva raste zbog njihove potencijalne uloge u poboljšanju ljudskog zdravlja. Eksperimentalna istraživanja koja su se provodila na ljudima i životinjama pokazala su kako su fenolni spojevi, iz lista *Olea europaea*, biološki aktivni što znači da mogu smanjiti rizik i ozbiljnost nekih kroničnih bolesti (Abaza i sur., 2015.).

Lišće masline sadrži veliki broj fenolnih spojeva, a oni se mogu podijeliti na jednostavne fenole, flavonoide (flavoni, flavanoli, flavonoli i 3-flavanoli) i sekoiridoidie Talhaouia 2015.).

Jednostavni fenoli su najčešći i najvažniji fenolni spojevi s niskom molekulskom masom. Hidroksitirozol se opisuje kao najvažniji spoj iz skupine jednostavnih fenola lista masline (Altiok i sur., 2008., Benavente-García i sur., 2000., Bouallagui i sur., 2011., Fu i sur., 2010., Goulas i sur., 2009., Taamalli i sur., 2012b).

Flavonoidi su najproučavaniji i najraznovrsnija skupina polifenola (Abaza i sur., 2011, Heimler i sur., 1992). Sadrže dva aromatska prstena povezana trima ugljikovim atomima koji čine oksigenirani heterocikl (Škerget i sur., 2005).

Mogu biti glikozilirani (quercetin-7-O-rutinoside, luteolin- 7-O-rutinoside, luteolin-7-O-glucoside, luteolin-5-O-glucoside) i neglikozilirani (kvercetin, apigenin, luteolin, diosmetin) (Briante i sur., 2002a, Laguerre i sur., 2009, Ryan i sur., 2002). Sekoiridoidi su podskupina iridoida koji nastaju cijepanjem ciklopentanskog prstena između 7 i 8 C atoma koji sadrži fenolni ostatak (Pérez-Trujillo i sur., 2010., Quirantes-Piné i sur., 2012; Ranalli et al., 2006., Ye i sur., 2014). Oleuropein je najvažniji spoj iz ove skupine (Benavente-García i sur., 2000., Fu i sur., 2010., Kiritsakis i sur., 2010).

Na kvalitativni i kvantitativni fenolni sastav lista masline može utjecati: vrijeme sakupljanja lišća (Brahmi i sur., 2012.), uvjeti sušenja (Silva i sur., 2006.), zona uzgoja (Bilgin i Sahin, 2013.), proces ekstrakcije (Bilgin i Sahin, 2013., Rafiee 2011.) i sorta (Rafiee 2011., Japon-Lujan 2006.).

Benavente-Garcia i sur. istraživali su kvalitativni i kvantitativni sastav fenola u ekstraktu lista masline i njihov antioksidacijski kapacitet (Benavente-Garcia i sur., 2000.). Prema rezultatima, glavni fenolni spoj u lišću masline je oleuropein. Antioksidacijski kapacitet čistog oleuropeina nije toliko visok, dok antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline je bio veći od vitamina C i E i čistog hidroksitirozola, koji se smatraju jakim antioksidansima. Ovi rezultati ukazuju na to da se oleuropein hidrolizira u hidroksitirozol i povećava antioksidacijski kapacitet ekstrakta ili dolazi do sinergističkog učinka fenola u ekstraktu lista masline.

2.2.2. Oleuropein

Oleuropein je glavni sastojak lišća masline koji pripada u skupinu sekoiridoida (Erbay i Icier, 2010.). Oleuropein je heterozidni ester elenolne kiseline i dihidroksi fenil etanola (Pannizzi i sur., 1960.). Sadrži orto-difenolnu (katehol) strukturu koja djeluje kao antioksidans (Tuck i Hayball, 2002.) i glavni je razlog visokog antioksidacijskog kapaciteta oleuropeina (Benavente-Garcia i sur., 2000.).



Slika 2. Kemijska struktura oleuropeina (Erbay i Icier, 2010.)

Glavni produkt metaboličke razgradnje oleuropeina je hidroksitirozol (Benavente-Garcia i sur. 2000., Ranalli i sur. 2006.), tako da njegova koncentracija u lišću masline raste tijekom sazrijevanja. Njegovo glavno obilježje je to što ima veliki antioksidacijski kapacitet (Erbay i Icier 2010.).

Koncentracija oleuropeina u listu masline varira ovisno o genetskim faktorima, vremenu berbe i zrelosti lišća, a kao najvažniji čimbenik smatra se vrsta kultivara (Ranalli i sur., 2006.). Također se pokazalo da oleuropeina ima više u mladom lišću koje je zelenije i u ono koje se bere u proljeće (Ranalli i sur., 2006.). Oleuropein nije nađen u ljudskoj plazmi i fecesu zato što se metabolizira do hidroksitirsola i druge razgradne produkte, što dokazuje da se oleuropein ne može direktno apsorbirati u ljudskom probavnom sustavu (Soni i sur. 2006. i Silva i sur. 2006.).

2.3. Zdravstvani učinci lista masline

Visoka koncentracija fenolnih spojeva prisutnih u lišću masline izazvala je zanimanje kod velikog broja znanstvenika. Istraživanjima provedenim na životinjama i ljudima znanstvenici su došli do zaključka kako ovi spojevi imaju pozitivne zdravstvene učinke kao što su: antioksidacijski kapacitet (Benavente-Garcia i sur., 2000.), antihipertenzivno djelovanje (Susalit i sur., 2011.), hipoglikemijsko djelovanje (Kontogianni i sur., 2013.), hipokolesterolemijsko djelovanje (Jemai i sur., 2009.), kardioprotektivno djelovanje (Nekooeian i sur., 2014.), protuupalno djelovanje (Khalatbary i sur., 2012.) i kao pomoćno sredstvo kod liječenja pretilosti (Santiago-Mora i sur., 2011.).

Antihipertenzivno djelovanje

Istraživanja su pokazala da ekstrakt lista masline (dnevna doza 1000 mg) značajno smanjuje sistolički i dijastolički krvni tlak (Perrinjaquer-Mocchetti, 2008.).

Učinak polifenola iz lista masline na smanjenje razine kolesterola

Polifenoli lista masline povoljno djeluju na lipidni profil tako da smanjuju ukupni kolesterol, LDL kolesterol i trigliceride. U nekim istraživanjima se računao omjer LDL i HDL koji je bio značajno manji kod grupe koja je konzumirala ekstrakt lista masline (Vogel i sur., 2014.). Istraživanja na miševima kojima se davala hrana bogata kolesterolom, pokazalo je značajno smanjenje aktivnosti jetrenih enzima superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT). Međutim, te razine su se obnovile u prisutstvu fenolnih spojeva iz ekstrakta lista masline (Jamail i sur., 2008.). Također je pokazano kako ekstrakt lista masline može značajno popraviti hiperkolesterolemiju povezanu s hiperglikemijom (Jamail i sur., 2009.).

Kardioprotektivni učinci polifenola iz lista masline

Tretman oleuropeinom osigurava zaštitu od akutnog infarkta miokarda, sprečavajući razvoj sekundarne srčane insuficijencije. Provedena su istraživanja koja su proučavala zaštitni učinak oleuropeina kod primjene nekih lijekova poput doksorubicina. Doksorubicin se koristi protiv mnogih malignih bolesti (Singal i Iliskovicm, 1988., Booser i Hortobagyi, 1994.), no njegova upotreba je ograničena jer može uzrokovati ozbiljne kardiotoksične nuspojave, vjerojatno uzrokovane oksidacijskim stresom (Signal i sur., 1987.). Oleuropein je smanjio lipidnu peroksidaciju induciranu doksorubicinom (Andreadou i sur., 2007.), te je spriječio

kardiomiopatiju, nitro oksidativni stres, neravnotežu homeostaze NO i poremećaj metabolizma miokarda (Andreadou i sur., 2014.).

Učinak polifenola lista masline na šećernu bolest T2

Polifenoli lišća masline (posebno oleuropein) poznati su po hipoglikemijskom učinku. Predložena su dva obrazloženja navedenog učinka: potencijal da djeluje na otpuštanje inzulina izazvano glukozom i povećanje perifernog unosa glukoze (Al-Azzawie i Alhamdani, 2006.). Dodatno, dio hipoglikemijskog učinka pripisuje se antioksidacijskom kapacitetu oleuropeina (Sato i sur., 2007.).

Učinak polifenola lista masline na kronični kolitis

Istraživanja koja su ispitivala učinak dodataka prehrani s oleuropeinom na kronični kolitis, pokazala su da dolazi do smanjenja stanične infiltracije upalnih stanica na mjestu ozljede i smanjena oslobađanja upalnih citokina. Studija je pokazala da je korištenje oleuropeina učinkovito kod ublažavanja simptoma kroničnog kolitisa izazvanog natrijevim sulfatom (Giner i sur., 2013.).

2.4. Upotreba lista masline

Lišće masline se koristi za ekstrakciju oleuropeina iz kojeg se sintetizira hidroksitirozol. Može se sušiti i koristiti kao dodatak prehrani, te za ekstrakciju vrijednih spojeva. Ekstrakt lišća masline može se kapsulirati zbog stabilizacije samog ekstrakta i fenola. Također se može koristiti za obogaćivanje ulja antioksidansima koje sadrži. Lišće masline koje se miješa sa prezrelim maslinama prije samog procesa proizvodnje maslinovog ulja utječe na izraženiji okus i veću otpornost prema oksidaciji (Ranalli i sur., 2006.). U posljednje vrijeme, sve veća pozornost daje se čaju od lista masline.

2.4.1. Proizvodnja čaja od lista masline

Proizvodnja čaja od lista masline započinje branjem same sirovine. Preporuča se branje u rano proljeće jer je lišće tada najbogatije ljekovitim tvarima. Lišće se skida sa grana pomoću stroja za odvajanje lista masline. Grančice sa kojih je skinuto lišće usitni se i koristi za izradu komposta. Nakon toga je potrebno oprati i sortirati lišće pomoću uređaja za pranje i probiranje/sortiranje lišća. Oprano i sortirano lišće stavlja se na police regalne sušare gdje se suši na niskim temperaturama zraka (35-38 °C) 25-30 sati. Osušeni listovi dopremaju se do rezačice koja ima mogućnost podešavanja veličina reza (2-10 mm), te se na kraju nalazi vreća za prihvat izrezanog bilja (Sito i sur., 2015.)



Slika 3. Shematski prikaz proizvodnje čaja od lista masline (Sito i sur., 2015.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Napitak od lista masline

Lišće masline, korišteno u ovom istraživanju, prikupljeno je u masliniku u Republici Hrvatskoj (Ravni kotari) i predstavlja mješavinu sorata Orkula (90%), Leccina (5%), Marokanka i Garbunčela.

Za pripremu napitka korišten je omjer 4 g lišća masline i 100 mL destilirane vode. Prethodno je lišće oprano, prosušeno i usitnjeno na otprilike 1 cm. Lišće masline kuhano je 3 minute na temperaturi vrelišta, a zatim je odstajalo još 10 minuta u vodi. Napitak je procijeđen da se odvoje listovi te je u svrhu pasterizacije ponovno zagrijan na temperaturu 85°C i ta temperatura je održavana 10 sekundi. Nakon toga je prebačen u prethodno oprane i sterilizirane staklenke, te hermetički zatvoren. Napitak je skladišten 12 tjedana (84 dana) pri temperaturi od 30°C. Analize su provedene u svježe kuhanom napitku (0. dan) te onom skladištenom 1, 21, 42, 63 i 84 dana.

Ukupni fenoli i antioksidacijski kapacitet određivali su se nakon što su skupljeni svi uzorci, pa su se za 0., 1., 21., 42. i 63. dana skladištenja, napitci smrzavali i čuvali na -80 °C do analize.



Slika 4. Osušeno lišće masline
(vlastita fotografija)



Slika 5. Čaj od lista masline u staklenci
(vlastita fotografija)

3.1.2. Otapala i reagensi

- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka)
- Natrijev karbonat bezvodni (Grammol, Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna otopina)

Priprema:

U 800 mL vruće destilirane vode otopi se 200 g anhidrida natrijeva karbonata. Nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Metanol 100%-tni (Avantor Performance Materials, Poljska)
- DPPH (2,2- difenil- 1- pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Otopina 0,2mM DPPH (2,2- difenil- 1- pikrilhidrazil radikal)

Priprema:

0,0079 g DPPH radikala izvaže se u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml, otopi i nadopuni do oznake 100% metanolom. Pripremljenu otopinu DPPH radikala potrebno je čuvati u zatvorenoj tikvici na tamnome.

- Destilirana voda

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Spektrofotometar UV-1600PC (VWR, SAD)
- Tehnička vaga K7 (Mettler, Zurich)
- Analitička vaga AX224 (Ohaus Corporation, SAD)
- Vortex MS2 (IKA, SAD)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta, Japan)
- Vodena kupelj od rotavapora B-490 (Buchi Labortechnik AG, Švicarska)

Pribor:

- Staklena kiveta
- Mikropipeta
- Menzura
- Odmjerna tikvica
- Staklena epruveta
- Stalak za epruvete
- Plastična ladica za vaganje

3.2. Metode rada

3.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Princip metode

Određivanje ukupne koncentracije fenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji između Folin-Ciocalteu reagensa i reducirajućeg reagensa (polifenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline koje se reduciraju u wolframov oksid i molibden oksid uz prisutnost fenolnih tvari koje pri tome oksidiraju. Nastali plavo obojeni kompleks je intenzivniji što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja

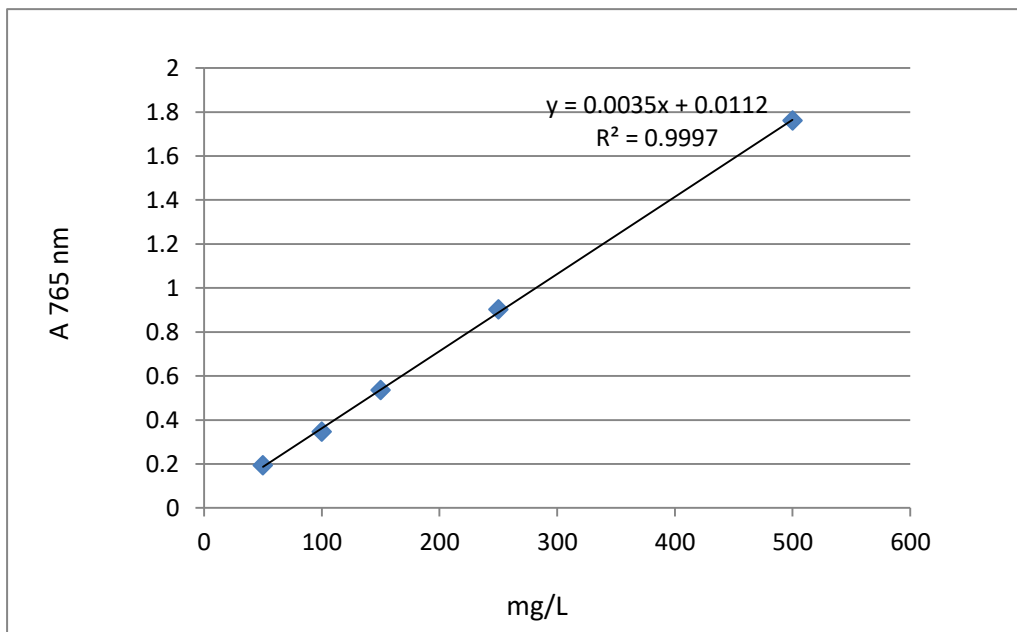
U staklenu epruvetu otpipetira se 100 μ L uzorka, 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sadržaj epruvete se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 765 nm pomoću spektrofotometra. Potrebno je pripremiti slijepu probu na isti način samo što se umjesto ekstrakta dodaje otapalo.

Baždarni dijagram

Za pripremu baždarnog pravca potrebno je izvagati 0,5 g galne kiseline i otopiti u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL te se nadopuni do oznake destiliranom vodom. Pripremljena otopina galne kiseline koristi se za izradu razrjeđenja u odmjerne tikvici od 100 mL. Za razrjeđenja je potrebno otpipetirati redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunit do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se po 100 μ L otopine standarda u epruvete, a zatim se dodaje redom 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa i termostatira 25 minuta na 50 °C u vodenoj kupelji od rotavapora. Potrebno je pripremiti slijepu probu na isti način samo

što se umjesto otopine standarda dodaje 100 μ L destilirane vode. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 765 nm.

Baždarni pravac se nacrtava pomoću programa Microsoft Excel tako da se izmjerene vrijednosti apsorbancije nanese na ordinatu, a koncentracije galne kiseline (mg/L) na apscisu. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 6. Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline (mg/L)

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0035 * x \quad [1]$$

pri čemu je:

y= apsorbancija pri 765 nm

x= koncentracija galne kiseline mg/L

Za svaki uzorak izmjerene su dvije apsorbancije koje su se uvrstile u formulu [1]. Od izračunatih koncentracija ukupnih fenola određena je srednja vrijednost i standardna devijacija.

3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH radikala (2,2 – difenil – 1 – pikrilhidrazil) temelji se na sposobnosti antioksidansa da reducira slobodan radikal tj. da dođe do sparivanja nesparenog elektrona. DPPH radikal je stabilan dušikov radikal ljubičaste boje. Kod reakcije DPPH radikala sa fenolima (u ovom slučaju fenola iz čaja od lista masline) dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu, a to se na spektrofotometru prati kao pad apsorbancije pri 517 nm (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

Postupak određivanja

U epruvetu je potrebno otpipetirati 0,75 ml uzorka i 1,5 mL 0,2 mM prethodno svježe pripremljene otopine DPPH radikala (priprema opisana u popisu kemikalija). Slijepa proba se pripremi tako da se u epruvetu otpipetira 2,25 mL 100% metanola. Epruvete s navedenim sadržajem stoje 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 517 nm.

Baždarni dijagram

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti 1 mM otopinu Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina). Odvaži se 0,025 g Troloxa, otopi se u metanolu i njime nadopuni do oznake u odmjerne tikvici od 100 mL. Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama od 10, 25, 50, 100, 125 i 150 μ M.

U epruvetu se otpipetira redom 0,75 ml odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Kod pripreme slijepa probe u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 % metanola. Nakon 20 minutnog stajanja sadržaja u mraku pri sobnoj temperaturi, mjeri se apsorbancija pri 517 nm.



Slika 7. Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji Troloxa (μM)

Jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,008x + 1,347$$

[2]

pri čemu je:

Y= apsorbancija uzorka pri 517 nm

X=ekvivalent troloxa TAE μM

Za svaki uzorak napitka od lista masline izmjerene su dvije apsorbancije koje su se uvrstile u formulu [2]. Od izračunatih koncentracija određena je srednja vrijednost i standardna devijacija.

3.2.3. Određivanje boje CIELAB metodom

Boja je jedna od najvažnijih organoleptičkih svojstva čaja (Liang i sur. 2016). Skladištenom napitku od lista masline određivale su se L^* , a^* , b^* , H° i C vrijednosti CIELAB metodom (CIE, 1976.).

L^* , a^* i b^* vrijednosti su parametri trodimenzionalnog spektra boje. Koriste se za objektivno mjerenje boje. Princip rada je mjerenje stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine.

Vrijednost L^* je mjera svjetline iskazana vrijednostima od 0 (crno) do 100 (bijelo).

Vrijednost a^* je parametar koji iskazuje spektar od crvene (pozitivne vrijednosti) do zelene (negativne vrijednosti). Vrijednosti se iskazuju od -60 do 60.

Vrijednost b^* je parametar koji ukazuje na spektar nijansi između žute i plave boje (McGuire, 1992).

Pomoću a^* i b^* mogu se izračunati vrijednosti za ton boje odnosno vizualni doživljaj boje (H°) i zasićenost boje (C).

$$H^\circ = \arctan(b/a) \quad [3]$$

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad [4]$$

ΔE ili ukupna razlika obojenosti prikazuje razliku boje u odnosu na neku ishodnu točku (boju). Kao referentna vrijednost koristila se početna boja čaja (0. dan skladištenja).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad [5]$$

3.2.4. Određivanje senzorskih svojstva napitka

Senzorsko ocjenjivanje provedeno je pomoću kvantitativne deskriptivne analize (QDA). Pri senzorskom ispitivanju sudjelovao je panel od 10 ocjenivača. Korišten je upitnik koji je sadržavao opis pojedinih senzorskih svojstva: intenzitet boje (žuta i smeđa boja) , miris (miris na list masline i strani miris), okus (trpki, gorki, okus na list masline, strani okus i harmonični okus) i aromu (svojstveno za list masline, na zeleno i strana aroma) (Cerretani i sur., 2008. i Stone i sur., 2012.). Uzorci su prethodno temperirani na sobnu temperaturu i servirani u plastičnim čašicama. Ocjenjivači su upitnik ispunjavali s vrijednostima od 1 do 10, pri čemu je 1 označavalo neizraženo svojstvo, a 10 maksimalno izraženo svojstvo. Ocjenjivački listić se nalazi u Prilogu.

3.2.5. Određivanje mikrobiološke aktivnosti

Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti provedeno je prema standardnim metodama u akreditiranom laboratoriju PBF-a, Centar za kontrolu namirnica, Jagićeva 31.

Određivala se prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca i plijesni te bakterije *Salmonellae* i *Enterobacteriaceae*. Metode koje su se koristile su HRN EN ISO 6579:2003 za bakteriju *Salmonellae*, HRN ISO 21528-1:2008 za *Enterobacteriaceae*, HRN EN ISO 4833-1:2013 za aerobne mezofilne bakterije te ISO 21527-1:2008 za kvasce i plijesni.

Tablica 1. Kriteriji za ispitivanje mikrobiološke aktivnosti

Mikrobiološka ispitivanja	Kriteriji *
<i>Salmonella</i>	Nije izolirana
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1
Aerobne mezofilne bakterije	<10
Kvasci	<1
Plijesni	<1

* Ministarstvo poljoprivrede, Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje, ožujak, 2011.)

3.3. Rezultati i rasprava

Ukupni fenoli i antioksidacijski kapacitet

Sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet određeni su spektrofotometrijski te su rezultati prikazani na slici 8. Na slici su prikazane srednje vrijednosti dva mjerenja i standardna devijacija.



Slika 8. Koncentracije ukupnih fenola (mg/mL) i antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol/mL}$) u napitku od lista masline skladištenog na 30 °C

Ukupni fenoli

Koncentracije ukupnih fenola, određene u ovom istraživanju (Slika 8.) kretale su se u rasponu od 0,213 mg/mL do 0,276 mg/mL. Vrijednosti su padale do 63. dana skladištenja, dok je vrijednost za 84. dan porasla i bila približno jednaka koncentraciji za 0. dan skladištenja.

Sadržaj ukupnih fenola u pripremljenom dekaktu od lista masline, kojeg su određivali Buyukbalcy i sur., iznosio je 70 mg CE/L (Buyukbalcy i sur., 2008.). To je gotovo tri puta manja vrijednost od onih određenih u ovom istraživanju. Za pripremu dekakta koristili su 5 g

lišća masline i 100 mL vode. Lišće je kuhano 15 minuta, te je nakon toga odstajalo u vodi 10 minuta.

Kopjar i sur. ispitivali su sadržaj polifenola kod maceriranih voćnih čajeva, te su maceraciju naknadno ponovili pomoću prethodno korištenog materijala (Kopjar i sur., 2013.). Najveća koncentracija polifenola bila je u čaju od brusnice i iznosila je 0,428 mg/mL, dok je najmanja vrijednost određena za čaj od šumskog voća od 0,323 mg/mL. Uspoređujući rezultate Kopjar i sur. sa rezultatima iz ovog istraživanja, može se zaključiti kako macerirani voćni čajevi sadrže veću koncentraciju polifenola. Kod ponovljenih maceracija, najveću koncentraciju polifenola, od 0,109 mg/mL, imao je čaj od brusnice, a najmanju čaja od šumskog voća koja je iznosila 0,061 mg/mL.

Kozak i sur. određivali su koncentraciju ukupnih polifenola kod biljnih čajeva matičnjaka, kamilice i kadulje u obliku granuliranog praha, te su ih uspoređivali sa instant biljnim čajevima. Koncentracija polifenola bila je manja kod onih čajeva koji su se kuhali dulje (10 minuta, naspram 3 minute). To može biti zbog osjetljive strukture bilja, što dovodi do bržeg prijenosa polifenola u infuziju i do razgradnje zbog duljeg vremena kuhanja. Također, uočili su da su više koncentracija ukupnih polifenola kod usitnjenijih sirovina, što znači da se iz njih polifenoli lakše ekstrahiraju (Kozak i sur., 2017.).

Jiménez-Zamora i sur. (2016.) određivali su koncentraciju ukupnih fenola u čaju pripremljenom od lista masline koji se skladištio 3 i 6 mjeseci, na 50 °C. Koristili su 2 g lišća masline kojeg su prelili sa 150 mL kipuće vode i ostavili na sobnoj temperaturi 7 minuta. Koncentracija ukupnih fenola, na dan pripreme čaja, bila je 94 mg GAE/L, što je gotovo tri puta manja vrijednost od one određene u ovom istraživanju, što se može objasniti i različitom pripremom čaja/napitka. Nadalje, skladištenjem 3 mjeseci vrijednost je pala na 67 mg GAE/L, dok je nakon 6 mjeseci vrijednost bila 75 mg GAE/L. Sličan trend smanjenja, pa povećanja koncentracije fenola tijekom skladištenja uočen je i u ovom istraživanju, iako je u ovom istraživanju praćeno skladištenje napitka, a Jiménez-Zamora i sur. (2016.) su pratili skladištenje lišća masline.

Antioksidacijski kapacitet

Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, određene u ovom istraživanju, kretale su se u rasponu od 0,146 $\mu\text{mol/mL}$ do 0,149 $\mu\text{mol/mL}$. Vrijednosti su bile približno podjednake u svim uzorcima tijekom skladištenja tj. nije došlo do značajnih promjena (Slika 8.).

Belščak-Cvitanović i sur. (2014) kod infuzije i dekokta lista masline određivali su antioksidacijski kapacitet pomoću drugih metoda te se ti rezultati ne mogu direktno uspoređivati s našim rezultatima. Metodom redukcije Fe (III) antioksidacijski kapacitet je iznosio $0,81 \pm 0,07$ mM Fe (II), a pomoću ABTS metode $0,30 \pm 0,02$ mM Troloxa. Antioksidacijski kapacitet dekokta lista masline određen pomoću redukcije Fe (III) iznosio je $2,14 \pm 0,13$ mM Fe (II), a pomoću ABTS metode $1,68 \pm 0,04$ mM Troloxa .

Kopjar i sur. ispitivali su antioksidacijski kapacitet maceriranih voćnih čajeva ABTS i DPPH metodom. Materijal upotrebljen za prvu maceraciju, korišten je kod ponovljene maceracije. Najmanja vrijednost , određena ABTS metodom, bila je kod čaja od brusnice i iznosila je $0,67$ $\mu\text{mol TE}/100$ mL ($0,0067$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$). Kod ponovljene maceracije, najmanja vrijednost je također bila kod čaja od brusnice i iznosila je $0,10$ $\mu\text{mol TE}/100$ mL ($0,0010$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$). Najveća vrijednost zabilježena je za čaja od šumskog voća, te je iznosila $0,84$ $\mu\text{mol TE}/100$ mL ($0,0084$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$). Kod ponovljene maceracije, najveća vrijednost bila je za čaj od borovnice, te je iznosila, $0,29$ $\mu\text{mol TE}/100$ mL ($0,029$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$).

Najmanja vrijednost, određena DPPH metodom, bila je za čaj od brusnice i iznosila je $0,26$ $\mu\text{mol TE}/100$ mL. Za isti čaj zabilježena je najmanja vrijednost kod ponovljene maceracije, te je iznosila $0,05$ $\mu\text{mol TE}/100$ mL . Najveća vrijednost zabilježena je za čaj od šumskog voća, te je iznosila $0,53$ $\mu\text{mol TE}/100$ mL. Kod ponovljene maceracije, najveća vrijednost bila je za čaj od borovnice, te je iznosila $0,20$ $\mu\text{mol TE}/100$ mL (Kopjar i sur., 2013.).

Jiménez-Zamora i sur. određivali su antioksidacijski kapacitet DPPH metodom čaju od lista masline koji se skladištio 3 i 6 mjeseci, na 50 °C. Koristili su 2 g lišća masline kojeg su prelili sa 150 mL kipuće vode i ostavili na sobnoj temperaturi 7 minuta. Antioksidacijski kapacitet, na dan pripreme čaja bio je $1,29$ mmol TE/L, što je puno veća vrijednost od one određene u ovom istraživanju. Antioksidacijski kapacitet, izmjeren nakon 3 mjeseci skladištenja na 50 °C, bio je $0,48$ mmol TE/L, dok je nakon 6 mjeseci vrijednost porasla na $0,63$ mmol TE/ L (Jiménez-Zamora i sur., 2016.).

Boja

Vrijednosti L^* , a^* i b^* , određeni su se kolorimetrijski, a vrijednosti C , H° i ΔE su izračunate prema prethodno navedenim formulama [3,4, 5]. U tablici su prikazane srednje vrijednosti tri mjerenja i standardna devijacija.

Tablica 2. Parametri boje određeni za napitak od lista masline skladištenog na 30 °C

<i>Dan skladištenja t=30°C</i>	L^*	a^*	b^*	C	H°	ΔE
0. dan	91,14±0,49	-1,98±0,12	19,18±0,14	19,29±0,15	95,89±0,30	-
1. dan	92,71± 0,04	-1,07±0,01	20,48±0,08	20,51±0,08	93,00±0,02	2,23
21. dan	90,58± 0,02	0,56± 0,01	27,16±0,07	27,16±0,06	88,81±0,03	8,39
42. dan	88,79± 0,21	1,01± 0,09	29,47±0,54	29,49±0,55	88,05±0,13	10,97
63. dan	87,49± 0,08	1,41± 0,03	31,54±0,19	31,57±0,19	87,43±0,04	13,33
84. dan	87,11± 0,27	1,32± 0,08	30,60±0,40	30,62±0,41	87,52±0,12	12,55

Vrijednosti za L^* kretale su se u rasponu od 87,11 do 92,71. Najveća vrijednost zabilježena je kod 1. dana skladištenja, a kod svakog sljedećeg mjerenja došlo je do pada vrijednosti (Tablica 2.). Pri 63. i 84. danu skladištenja taj pad je bio manje izražen. Smanjenje L^* vrijednosti ukazuje na tamnjenje napitka tijekom skladištenja.

Vrijednosti za a^* kretale su se u rasponu od -1,98 do 1,41. Sa svakim mjerenjem došlo je do porasta vrijednosti. Najveća vrijednost zabilježena je kod 63. dana skladištenja dok je kod 84. dana došlo do blagog pada (Tablica 2.). Promjene a^* vrijednosti u skladu su s promjenom svjetline jer iz blago zelenih nijansi (- a^* predstavlja udio zelene boje) prelazi u crvenkaste (+ a^* predstavlja udio crvene boje) što, također, ukazuje na potamnjenje.

Vrijednosti za b^* (udio žute boje) kretale su se u rasponu od 19,18 do 31,54. Sa svakim mjerenjem, vrijednosti su se povećavale što znači da se povećavao udio žute boje, što isto u određenom smislu može ukazivati na tamnjanje napitka. Može se uočiti nagli porast vrijednosti između 1. i 21. dana skladištenja, dok je kod 84. dana došlo do blagog pada (Tablica 2.).

Kozak i sur. određivali su parametre boje L, a i b prema CIE Lab ljestvici za biljne čajevе matičnjaka, kamilice i kadulje u obliku granuliranog praha, te su ih uspoređivali sa instant čajevima. L vrijednosti bile su najveće kod čajeva kuhanih 3 minute (47,76 za matičnjak, 56,10 za kamilicu i 51,28 za kadulju) što znači da su oni bili najsvjetliji, dok su čajevi kuhani 10 minuta bili tamniji (40,20 za matičnjak, 49,84 za kamilicu i 49,28 za kadulju). Sve vrijednosti parametra a bile su negativne (zelená boja), a parametra b pozitivne (žuta boja) (Kozak i sur., 2017.).

Jiménez-Zamora i sur. određivali su parametre boje (L, a i b) različitim biljnim čajevima koji su se skladištili na 50 °C 3 i 6 mjeseci. Došlo je do smanjenja L vrijednosti kod 47% uzoraka, vjerojatno zbog visoke temperature skladištenja. Kod 80% uzoraka, došlo je do povećanja vrijednosti parametra a, vjerojatno zbog Maillardove reakcije. Vrijednost parametra b smanjio se skladištenjem, te je došlo do povećanja parametra E (Jiménez-Zamora i sur., 2016.).

Vrijednosti za C (zasićenost boje) kretale su se u rasponu od 19,29 do 31,57. Sa svakim mjerenjem došlo je do povećanja vrijednosti, gdje je najveća vrijednost postignuta kod 63. dana skladištenja, a kod 84. dana došlo je do blagog pada (Tablica 2.).

Vrijednosti za H (vizualni doživljaj boje) kretale su se u rasponu od 87,43 do 95,89. Sa svakim mjerenja došlo je do pada vrijednosti gdje je za 63. dan zabilježena najmanja vrijednost. Kod mjerenja za 84. dana skladištenja došlo je do blagog porast (Tablica 2.).

Ukupna razlika obojenosti ili ΔE kretala se u rasponu od 2,23 do 13,33. Vrijednosti za ΔE rasle su do 63. dana skladištenja gdje je zabilježena najveća vrijednost. Kod 84. dana skladištenja izračunata je vrijednot 12,55 (Tablica 2.).

Svi ti podaci ukazuju na određenu promjenu boje napitka tijekom skladištenja, međutim te promjene nisu bitno negativne.

Senzorska svojstva

Rezultati senzorskih svojstva prikazani su grafički pomoću tkz. paukove mreže na slici 9.



Slika 9. Rezultati senzorskog ocjenjivanja napitka od lista masline skladištenog na 30°C

Žuta boja napitka od lista masline najizraženija je kod 0. dana skladištenja. Kako su se povećavali dani skladištenja došlo je do pada vrijednosti, te do ponovnog rasta za 63. i 84. dan skladištenja.

Za razliku od žute, smeđa boja je bila najmanje izražena kod 0. dana skladištenja. S povećanjem dana skladištenja došlo je do porasta smeđe boje, te su najveće vrijednosti bile zabilježene kod 21., 42., 63. dana. Kod 84. dana skladištenja došlo je do blagog pada smeđe boje. Senzorski zamijećene promjene boje u skladu su s izmjerenim vrijednostima za boju. Porast smeđe boje uočen senzorski tj. posmeđivanje/potamnjenje napitka u skladu je s nižim L^* i H^* vrijednostima, a većim a^* i b^* te u određenom smislu i ΔE vrijednostima.

Miris na list masline najizraženiji je u napitku 0. i 1. dana skladištenja, dok se najmanje osjetio 63. dana skladištenja. Vrijednosti za 21., 42. i 84. dan rastu prema navedenom slijedu.

Strani miris najmanje se osjetio u napitku 0. i 1. dana skladištenja. Vrijednosti za 21., 42. i 84. dan približno su jednake i nešto su veće od onih za 0. i 1. dan. Najveće odstupanje pokazalo se za 63. dana skladištenja kada je vrijednost bila najveća, tj. najviše se osjetio strani miris.

Trpki okus najizraženiji je u napitku 0. dana skladištenja, te se postepeno smanjuje kako se povećava vrijeme skladištenja. Najmanje je izražen 84. dana skladištenja. Iznimka je 63. dan skladištenja koji odskaka od slijeda postepenog pada vrijednosti.

Gorki okus najizraženiji je 0. dan skladištenja, nešto je manji za 1. dan, dok je gorki okus za 21., 42., 63. i 84. najmanje izražen i približno jednak.

Okus na list masline najviše se osjeti u napitku 0. dana senzorskog ispitivanja, za 1. dan skladištenja je nešto manji, dok su vrijednosti za 21., 42., 63. i 84. dan skladištenja najmanje (najmanje izražen okus na list masline).

Strani okus je relativno nisko ocijenjen. Najmanje vrijednosti su zabilježene za 0. i 1. dan skladištenja, dok su vrijednosti za ostale dane skladištenja minimalno porasle.

Harmonični okus bio je najmanje izražen kod 0. i 1. dana skladištenja, te je bio u porastu prema sljedećem redoslijedu : 84. < 21. < 63. < 42. dan skladištenja.

Aroma svojstvena za list masline najmanje se osjetila 63. dan skladištenja, dok su vrijednosti za ostale dane rasle sljedećim redoslijedom 21. < 84. < 1. < 42. < 0. dan skladištenja.

Aroma na zeleno najmanje se osjetila 21. dan skladištenja, te je postepeno rasla prema sljedećem redoslijedu: 63. < 84. < 42. < 0. < 1. dan skladištenja.

Strana aroma je relativno nisko ocijenjena i sve su vrijednosti približno jednake.

Mikrobiološka ispitivanja

Tablica 3. Rezultati mikrobiološke analize napitka od lista masline skladištenog na 30 °C

Mikrobiološka ispitivanja	0. dan	1. dan	21. dan	42. dan	63. dan	84. dan
<i>Salmonella</i>	-	-	Nije izolirana	Nije izolirana	Nije izolirana	Nije izolirana
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	<1	<1	<1	<1
Aerobne mezofilne bakterije	30	10	10 ²	50	7	7
Kvasci	<10	<10	<1	<1	<1	<1
Plijesni	<10	<10	<1	<1	<1	<1

Većina rezultata mikrobioloških ispitivanja ispunjava navedene kriterije (Tablica 1.) o prisutnosti određenih mikroorganizama. Kriterij za aerobne mezofilne bakterije je <10, međutim u svim uzorcima je određena nešto veća vrijednost koja tijekom skladištenja varira bez jasne pravilnosti što upućuje na određenu neispravnost prilikom punjenja i zatvaranja napitka u staklenke, a ne na negativan utjecaj skladištenja. Slično se može zaključiti i za rezultate kvasaca i plijesni.

4. ZAKLJUČAK

Ukupni fenoli

Prilikom skladištenja napitka od lista masline određeni su ukupni fenoli od 0,276 mg/mL na početku skladištenja do 0,213 mg/mL 63. dana te 0,272 mg/mL 84. dana skladištenja što upućuje da skladištenje na +30 °C nema posebno negativan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola.

Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski kapacitet bio je približno jednak kod svakog određivanja i kretao se od 0,146 do 0,149 $\mu\text{mol/mL}$, što upućuje da skladištenje pri +30 °C ne utječe na promjenu antioksidacijskog kapaciteta.

Boja

Skladištenjem napitka dolazi do tamnjenja boje, na što upućuju promjene svih parametara boje i to porast L^* i b^* vrijednosti te prelazak a^* iz negativne u pozitivne vrijednosti, povećanje ukupne razlike obojenosti, pad vrijednosti za ton boje (H°) (što ukazuje na veći udio crvenih nijansi) te porast zasićenosti boje (C).

Senzorska svojstva

Skladištenje čaja smeđa boja dolazi više do izražaja. Prisutan je miris na list masline koji se smanjuje skladištenjem. Okus na list masline, trpki i gorki okus najizraženiji su na početku, dok se skladištenjem smanjuju. Harmonični okus najmanje je izražen na početku, a najviše na kraju skladištenja. Aroma svojstvena na list masline i na zeleno najviše su prisutne na početku skladištenja. Strani miris, okus i aroma su manje zastupljeni ili ih uopće nema.

Mikrobiološka ispitivanja

Skladištenje nije negativno utjecalo na mikrobiološku sliku napitka.

Svi rezultati analiza provedenih tijekom 84 dana skladištenja i to koncentracije fenolnih spojeva, antioksidacijski kapacitet, boja, senzorska svojstva i mikrobiološka slika upućuju na zadovoljavajuću stabilnost napitka od lista masline unatoč primjenjenoj temperaturi 30°C.

5. LITERATURA

- Abaza L., Ben Youssef N., Manai H., Mahjoub Haddada F., Methenni K., Zarrouk M. (2011) 'Chétoui' olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y Aceites* **62**: 96 - 104.
- Abaza L., Taamalli A., Nsir H., Zarrouk M. (2015) Olive Tree (*Olea europaea*) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants(Basel)* **4**: 682 - 698.
- Al-Azzawie H.F., Alhamdani M.S. (2006) Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences* **78(12)**: 1371 - 1377.
- Altıok E., Bayçın D., Bayraktar O., & Ülkü S. (2008) Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology* **62**: 342 - 348.
- Andreadou I., Sigala F., Iliodromitis E.K., Papaefthimiou M., Sigalas C., Aligiannis N., Savvari P., Gorgoulis V., Papalabros E., Kremastinos D.T. (2007) Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular Cell Cardiology* **42**: 549 - 58.
- Andreadou I, Mikros E, Ioannidis K, Sigala F, Naka K, Kostidis S, Farmakis D., Tenta R., Kavantzias N., Bibli S.I., Gikas E., Skaltsounis L., Kremastinos D.T., Iliodromitis E.K. (2014) Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. *Journal of Molecular Cell Cardiology* **69**: 4 - 16.
- Anonymous 2016. < <http://lifex.hr/list-maseline-pravi-zimski-eliksir/> > Pristupljeno 23. Lipnja 2017.
- Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D. (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* **125**: 989 - 1009.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191 - 203.

Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Arijana Bušić A., Franekić J., Draženka Komes D. (2014) Phytochemical Attributes of Four Conventionally Extracted Medicinal Plants and Cytotoxic Evaluation of Their Extracts on Human Laryngeal Carcinoma (HEp2) Cells **17**: 206 - 217.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chemistry* **68**: 457 - 462.

Bilgin M., Şahin S. (2013) Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **44**: 8 - 12.

Booser D.J., Hortobagyi G.N. (1994) Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* **47**: 223 - 58.

Bouallagui Z., Han J., Isoda H., Sayadi S. (2011) Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* **49**: 179 - 184.

Braca A., De Tommasi N., Di Bari L., Pizza C., Politi M., Morelli I. (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products* **64(7)**: 892 - 895.

Briante R., La Cara F., Febbraio F., Patumi M., Nucci R. (2002a) Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology* **93**: 109 - 119.

Brahmi F., Mechri B., Dabbou S., Dhibi M., Hammami M. (2012) The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops Products* **38**: 146 - 152.

Büyükbalci A., Nehir El S. (2008) Determination of In Vitro Antidiabetic Effects, Antioxidant Activities and Phenol Contents of Some Herbal Teas. *Plant Foods for Human Nutrition* **63**: 27 - 33.

Cerretani L., Salvador M. D., Bendini A., Fregapane G. (2008) Relationship between sensory evaluation performed by Italian and Spanish official panels and volatile and phenolic profiles of virgin olive oils. *Chemosensory Perception* **1(4)**: 258.

CIE, Commission Internationale de l'Eclairage (1976) Official recommendations on uniform colour spaces, colour differences equations and metric colour terms. Paris: France.

Covas M.I. (2007) Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research* **55**: 175 - 186.

Delgado-Pertinez M., Gomez-Cabrera A., Garrido A. (2000) Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and in vitro studies. *Animal Feed Science and Technology* **87**: 187 - 201.

Dimitrios B. (2006) Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology* **17**: 505 - 512.

Erbay Z., Icier F. (2010) The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International* **26**: 319 - 334.

Fu S., Arráez-Roman D., Segura-Carretero A., Menéndez J.A., Menéndez-Gutiérrez M.P., Micol V., Fernández-Gutiérrez A. (2010) Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**: 643 - 654.

Garcia-Maraver A., Salvachua D., Martinez M.J., Diaz L.F., Zamorano M. (2013) Analysis of the relation between the cellulose, hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees. *Waste Management* **33**: 2245 - 2249.

Giner E., Recio M.C., Ríos J.L., Giner RM. (2013) Oleuropein Protects against Dextran Sodium Sulfate-Induced Chronic Colitis in Mice. *Journal of Natural Products* **76(6)**: 1113 - 1120.

Goulas V., Exarchou V., Troganis A.N., Psomiadou E., Fotsis T., Briasoulis E., Gerothanassis I.P. (2009) Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**: 600 - 608.

Heimler D., Pieroni M., Tattini A., Cimato A. (1992) Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and biflavonoids in *Olea europaea* L. Leaves. *Chromatographia* **33**: 369 - 373.

HRN EN ISO 6579:2003, Hrana i hrana za životinje -- Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp.

HRN ISO 21528-1:2008, Hrana i hrana za životinje, Metoda za brojanje bakterija iz porodice Enterobacteriaceae bez ponovnog oživljavanja – postupak brojenja kolonija

HRN EN ISO 4833-1:2013, Mikrobiologija lanca hrane -- Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C tehnikom zalijevanja podloge

ISO 21527-1:2008, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1: colony count technique in products with water activity greater than 0,95

Japon-Lujan R., Luque-Rodriguez J.M., Luque de Castro M.D. (2006) Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related polyphenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A* **1108**: 76 - 82.

Jemai H., Bouaziz M., Fki I., El Feki A., Sayadi S. (2008) Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico- Biological Interactions* **176(2-3)** : 88 - 98.

Jemai H., El Feki A., Sayadi S. (2009) Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 8798 - 8804.

Jiménez-Zamora A. ,Delgado-Andrade C., Rufián Henares J.A. (2016) Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chemistry* **199**: 339 – 346

Kantonci D. (2006) Maslina. *Glasnik zaštite bilja* **29**: 4 - 14.

Khalatbary A.R., Zarrinjoei G.R. (2012) Anti-Inflammatory Effect of Oleuropein in Experimental Rat Spinal Cord Trauma. *Iranian Red Crescent Medical Journal* **14(4)**: 229 - 234.

Kiritsakis K., Kontominas M.G., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D., Moustakas A., Kiritsakis A. (2010) Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **87**: 369 - 376.

- Kontogianni V.G., Charisiadis P., Margianni E., Lamari F.N., Gerothanassis I.P., Tzakos A.G. (2013) Olive Leaf Extracts Are a Natural Source of Advanced Glycation End Product Inhibitors. *Journal of Medicinal Food* **16**: 817 - 822.
- Kopjar M., Knežević I., Piližota V. (2013) Sadržaj polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost voćnih čajeva. *Hrana u zdravlju i bolesti* **2(2)**: 42 - 49.
- Kozak M., Sobczak P., Krajewska M., Ślaskagrzyszyna B., Wojtowicz A., Żukiewicz-Sobczak W. (2017) Evaluation of health promoting properties and quality of herbal teas obtained from fine-grained fraction of herbs. *Journal of Central European Agriculture* **18(2)**: 388 - 402.
- Laguerre M., López Giraldo L.J., Piombo G., Cruz Figueroa-Espinoza M., Pina M., Benaissa M., Combe A., Rossignol Castera A., Lecomte J., Villeneuve P. (2009) Characterization of olive-leaf phenolics by ESI-MS and evaluation of their antioxidant capacities by the CAT assay. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **86**: 1215 – 1225.
- Liang J., Xiao-Bai L., Dan-Qing T., Xian-Ping F., Yong-Ming Y., Hui-Qin Z., Ya-Ying G., Guang-Ying M., Wei-Yong W., Wen-Fei X., Mei L. (2016) Antioxidant properties and color parameters of herbal teas in China. *Industrial Crops and Products* **87**: 198 - 209.
- Martin-Garcia A.I., Moumen A., Yanez-Ruiz D.R., Molina-Alcaide E. (2003) Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology* **107**: 61 - 74.
- Martin-Garcia A.I., Molina-Alcaide E. (2008) Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **142**: 317 - 329.
- McGuire R.G. (1992) Reporting of objective colour measurements. *Horticultura Science* **27(12)**: 1254 - 1255.
- Molina-Alcaide E., Yanez-Ruiz D.R. (2008) Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology* **147**: 247 - 264.
- Nekooeian A.A., Khalili A., Khosravi M.B. (2014) Oleuropein offers cardioprotection in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension. *Indian Journal of Pharmacology* **46**: 398 - 403.

Ough CS, Amerine MA (1998) Methods for analysis of musts and wines. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Panizzi L., Scarpati M.L., Oriente G. (1960) The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazzetta Chimica Italiana* **90**: 1449 - 1486.

Pérez-Trujillo M., Gómez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Parella T. (2010) Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from *Olea Europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 9129 – 9136.

Pe Rrinjaquet-Mocchetti T., Busjahn A., Schmidlin C., Schmidt A., Bradl B., Aydogan C. (2008) Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research* **22(9)**: 1239 - 1242.

Pereira A.P., Ferreira I.C., Marcelino F., Valentão P., Paula B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J.A. (2007) Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* **12**: 1153 - 1162.

Prior R.L., Wu X.L., Schaich K., (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(10)**: 4290 - 4302.

Rafiee Z., Jafari S.M., Alami M., Khomeiri M. (2011) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *Journal of Animal and Plant Sciences* **21**: 738 - 745.

Rahmanian N., Jafari S.M., Wani T.A. (2015) Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology* **42**: 150 - 172.

Romero-García J.M., Niño L., Martínez-Patiño C., Álvarez C., Castro E., Negro M.J. (2014) Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. *Bioresource Technology* **159**: 421 - 432.

- Santiago-Mora R., Casado-Diaz A., De Castro M.D., Quesada- Gomez J.M. (2011) Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporosis International* **22**: 675 – 684.
- Sato H., Genet C., Strehle A., Thomas C., Lobstein A., Wagner A., Mioskowski C., Auwerx J., Saladin R. (2007) Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362(4)**: 793 - 798.
- Singh I., Mok M., Christensen A.M., Turner A.H., Hawley J.A. (2008) The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **18**: 127 - 132.
- Shortle E., O'Grady M.N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerry J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98(4)**: 828 - 834.
- Signal P.K., Deally C.M.R., Weinberg L.E. (1987) Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **19(8)** : 817 - 828.
- Singal P.K., Iliskovic N. (1988) Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* **339**: 900 - 905.
- Silva S., Gomes L., Leitao F., Coelho A.V., Vilas Boas L. (2006) Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International* **12**: 385 - 396.
- Sito S., Dovečer S., Borić V., Ploha M., Borić M. (2015) Uređaji i oprema za proizvodnju čaja od maslinovog lista. *Glasnik zaštite bilja* **38**: 28 - 32.
- Soni M.G., Burdock G.A., Christian M.S., Bitler C.M., Crea R. (2006) Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology* **44**: 903 - 915.
- Stone H., Bleibaum R., Thomas H. A. (2012). *Sensory evaluation practices*. Academic press.
- Susalit E., Agus N., Effendi I., Tjandrawinata R.R., Nofiarny D., Perrinjaquet-Moccetti T. (2011) Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine* **18**: 251 - 258.

Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A.R., Simonič M., Knez Ž. (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **89**: 191 - 198.

Talhaouia N., Taamallic A., Gomez-Caravaca A.M., Fernandez-Gutierrez A., Segura-Carretero A. (2015) Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* **77**: 92 - 108.

Tuck K.L., Hayball P.J. (2002) Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *The Journal Of Nutritional Biochemistry* **13**: 636 – 644.

Visioli F., Bellomo G., Montedoro G., Galli C. (1995) Low density lipoprotein oxidation is inhibited *in vitro* by olive oil constituents. *Atherosclerosis* **117**: 25 – 32.

Visioli F., Galli C. (1998) The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New findings. *Nutrition Reviews* **56**: 142 – 147.

Vogel P., Kasper Machado I., Garavaglia J., Zani V.T., de Souza D., Morelo Dal Bosco S. (2014) Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea L*) to human health. *Nutricion Hospitalaria* **31**: 1427 – 1433

Quirantes-Piné R., Lozano-Sánchez J., Herrero M., Ibáñez E., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2012) HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochemical Analysis* **24**: 213 – 223.

Ranalli A., Contento S., Lucera L., Di Febo M., Marchegiani D., Di Fonzo V. (2006) Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea L.*). *Journal of Agricultural And Food Chemistry* **54**: 434 – 440.

Ryan D., Antolovich M., Herlt T., Prenzler P.D., Lavee S., Robards K. (2002) Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar 'hardy's mammoth'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 6716 – 6724.

Taamalli A., Arráez-Román D., Ibañez E., Zarrouk M., Segura-Carretero A., Fernández Gutiérrez A. (2012) Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 791 – 798.

Xie P., Huang L., Zhang C., You F., Zhang Y. (2015) Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. *Food and Bioproducts Processing* **93**: 29 – 38.

Ye J., Wijesundera C., Shi M. (2014) Effects of agronomic and oil processing conditions on natural antioxidative phenolics in olive (*Olea europaea* L.). *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences* **2**: 1 – 8.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

ime i prezime studenta