

Utjecaj enzimske ekstrakcije na kemijski sastav lista masline (*Olea europea* L.)

Buha, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:173836>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Jelena Buha

**UTJECAJ ENZIMSKE EKSTRAKCIJE NA
KEMIJSKI SASTAV LISTA MASLINE (*Olea
europea* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju Zavod za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Dent

Zahvala

Hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Maji Dent koja je cijeli ovaj proces pretvorila u jedno divno iskustvo koje ću nositi sa sobom dalje u životu.

Hvala mojim roditeljima, Marijani i Igoru, bratu Petru, mom Ivanu, mojim najmilijim prijateljima za sve što ste činili i sto činite. Bez vas ništa ne bi bilo isto.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ ENZIMSKE EKSTRAKCIJE NA KEMIJSKI SASTAV LISTA MASLINE (*Olea europea* L.)

Jelena Buha univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058222778

Sažetak: List masline predstavlja količinski najveći otpad tijekom rezidbe i branja maslina, a sadrži visoke udjele biološki aktivnih spojeva. Problem otpada nastoji se riješiti iskorištenjem lista masline s ciljem dobivanja novih proizvoda. Jedan od mogućih rješenja problema je primjena enzima potpomognute ekstrakcije pri optimalnim procesnim parametrima kao ekološki prihvatljive metode ekstrakcije. Cilj rada bio je uz pomoć enzimske ekstrakcije enzimom celulaze ekstrahirati maksimalne količine ukupnih šećera i ukupnih fenolnih spojeva iz lista masline te odrediti antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakta DPPH metodom. Primjenom enzima celulaze su dobiveni veći maseni udjeli ukupnih šećera i ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na ekstrakciju bez enzima. Najveći maseni udio ukupnih šećera dobiven je enzimskom ekstrakcijom uz dodatak celulaze od 2 % (w/v) u pročišćenoj vodi (11,669 %), ukupnih fenola u limunskom puferu uz dodatak celulaze od 2,5 % (w/v) (1287,017 mg GAE/100 g). U dobivenim ekstraktima određena je antioksidacijska aktivnost DPPH metodom gdje je najveća antioksidacijska aktivnost određena u ekstraktu dobivenom limunskim puferom, uz dodatak celulaze od 2,5 % (w/v).

Ključne riječi: *list masline, enzimska ekstrakcija, fenoli, šećeri, antioksidacijska aktivnost*

Rad sadrži: 46 stranice, 10 slika, 4 tablica, 63 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Dent

1. prof. dr. sc. Tonči Rezić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Maja Dent (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (član)
4. izv. prof. dr. sc. Tomislav Bosiljkov (zamjenski član)

Datum obrane: 30. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology
Graduate university study programme: Food Engineering

THE INFLUENCE OF ENZYMATIC EXTRACTION ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE OLIVE LEAF (*Olea europea* L.)

Jelena Buha, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058222778

Abstract: The olive leaf represents the largest quantity of waste during pruning and harvesting of olives and contains high levels of biologically active compounds. The problem of waste is being addressed by utilizing olive leaves to create new products. One potential solution is the application of enzyme-assisted extraction under optimal process parameters as an environmentally friendly extraction method. The aim of this study was to extract the maximum amounts of total sugars and total phenolic compounds from olive leaves using cellulase enzyme-assisted extraction and to determine the antioxidant activity of the obtained extracts using the DPPH method. The application of cellulase enzyme resulted in higher yields of total sugars and total phenolic compounds compared to extraction without the enzyme. The highest yield of total sugars was obtained through enzyme-assisted extraction with the addition of 2 % (w/v) cellulase in purified water (11.669 %), while the highest yield of total phenols was obtained in citrate buffer with the addition of 2.5% (w/v) cellulase (1287.017 mg GAE/100 g). The antioxidant activity of the obtained extracts was confirmed using the DPPH method, where the highest antioxidant capacity was determined in the extract obtained with citrate buffer and 2.5 % (w/v) cellulase.

Keywords: *olive leaf, enzymatic extraction, phenols, sugars, antioxidant activity*

Thesis contains: 46 pages, 10 figures, 4 tables, 63 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Maja Dent, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Tonči Rezić, PhD, Full professor (president)
2. Maja Dent, PhD, Associate professor (mentor)
3. Antonela Ninčević Grassino, PhD, Associate professor (member)
4. Tomislav Bosiljkov, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 30th September 2024

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MASLINA (<i>Olea europaea</i> L.)	2
2.2. LIST MASLINE.....	4
2.2.1. Kemijski sastav lista masline.....	5
2.2.2. Zdravstvene koristi i upotreba lista masline	8
2.3. EKSTRAKCIJA.....	10
2.3.1. Ekstrakcija kruto-tekuće	11
2.3.2. Enzimima potpomognuta ekstrakcija	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Biljni materijal.....	14
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Aparatura i pribor	15
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Priprema otopina i pufera.....	15
3.2.1.1. <i>Folin-Ciocalteu reagens</i>	16
3.2.1.2. <i>Zasićena otopina natrijeva karbonata</i> (20 %-tna otopina, w/v)	16
3.2.1.3. <i>Otopina DPPH</i> ($c = 0,0094$ mM)	16
3.2.1.4. <i>Limunski pufer</i> ($pH = 5$).....	16
3.2.1.5. <i>Otopina K-Na-tartarata</i> ($\gamma = 4$ g/mL)	17
3.2.1.6. <i>Otopina DNSA</i>	17
3.2.2. Gravimetrijsko određivanje sadržaja celuloze.....	17
3.2.3. Određivanje enzimске aktivnosti.....	18
3.2.3.1. <i>Izrada baždarnog dijagrama</i>	18
3.2.3.2. <i>Postupak određivanja enzimске aktivnosti celulaze</i>	19

3.2.4. Enzimom potpomognuta ekstrakcija	20
3.2.5. Određivanje masenog udjela ukupnih šećera	21
3.2.5.1. <i>Izrada baždarnog dijagrama</i>	21
3.2.5.2. <i>Postupak određivanja masenog udjela ukupnih šećera</i>	22
3.2.6. Određivanje masenog udjela ukupnih fenola	23
3.2.6.1. <i>Izrada baždarnog dijagrama</i>	23
3.2.6.2. <i>Postupak određivanja masenog udjela ukupnih fenola</i>	24
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	25
3.2.7.1. <i>Izrada baždarnog dijagrama</i>	26
3.2.7.2. <i>Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom</i>	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Udio celuloze u listu masline	28
4.2. Enzimska aktivnost celulaze	29
4.3. Ukupni šećeri u listu masline	30
4.4. Ukupni fenoli u listu masline	33
4.5. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata lista masline	36
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Primjena suvremenih tehnologija u kojima se koriste nusproizvodi i otpad prehrambene industrije su u središtu istraživanja u znanosti i industriji s obzirom na potrebu za održivosti i zaštitom životne sredine. Zbrinjavanje takvog otpada može biti ekološki i ekonomski problem, stoga se istraživanja okreću prema održivim metodama za iskorištavanje tih nusproizvoda s obzirom na to da su često zanemareni, a poznato je da sadrže visokovrijedne biološki aktivne spojeve koji imaju potencijal primjene i u prehrambenoj, kemijskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i drugim industrijama. Poznato je da brojni prehrambeni proizvodi tradicionalne mediteranske prehrane imaju dobrobitne učinke na smanjenje oksidativnog stresa, upale i druge bitne faktore rizika oboljenja. Na području Mediterana često uzgajana biljna kultura je maslina (*Olea europaea* L.), čiji je glavni proizvod ulje. Održavanjem stabala, njihovom rezidbom te berbom maslina nastaje velika količina lišća maslina kao poljoprivredni otpad, čiji potencijal ostaje neiskorišten. List masline sadrži velike količine potencijalno korisnih biološki aktivnih spojeva s dokazanom antioksidacijskom aktivnošću te mogu pronaći svoju primjenu u prehrambenoj industriji kao novi funkcionalni proizvodi.

Kako bi potencijal ovih visoko vrijednih biološki aktivnih spojeva bio iskorišten, razvijaju se nove metode za ekstrakciju biljnih materijala, gdje se kao jedna od novih, zelenih metoda ekstrakcije ističe enzimima potpomognuta ekstrakcija. Stoga, cilj ovog rada je ispitati potencijal enzimske ekstrakcije enzimom celulaza u dva različita medija (pročišćena voda i limunski pufer pri optimalnim parametrima aktivnosti celulaze) za valorizaciju lista masline. Istraživanje je podijeljeno u nekoliko koraka, prvi korak je odrediti maseni udio celuloze u listu masline. Slijedeći korak je ispitati i potvrditi enzimsku aktivnost celulaze pri odabranim procesnim parametrima, nakon čega je provedena enzimom potpomognuta ekstrakcija pri maseno-volumnim udjelima celulaze od 0,5 do 2,5 % (w/v) u limunskom puferu i pročišćenoj vodi pri 55 °C kroz 2 h. U dobivenim ekstraktima lista masline procijenjen je utjecaj enzimske ekstrakcije primjenom celulaze na udjele izoliranih ukupnih šećera i fenola te antioksidacijske aktivnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MASLINA (*Olea europaea* L.)

Maslina (*Olea europaea* L.) se smatra jednim od najstarijih stabala na Zemlji. Radi se o vazdazelenoj vrsti drveta te njezin uzgoj datira još od antičkih vremena. Stablo masline pripada razredu kritosjemenjača (Magnoliophyta), redu Oleales, koji se sastoji od samo jedne porodice maslinovke (Oleaceae), dvosupnice koje se dijele na 30 rodova te preko 600 vrsta. Rod *Olea* uključuje 30 vrsta te jednom od njih pripada *Olea europaea* L. koja je predstavljena kao najznačajnija od njih jer se jedina koristi u prehrani ljudi (Hashmi i sur., 2015). Znanstveni naziv maslina dolazi iz latinske riječi *olea*, što znači ulje. Uspijeva i uzgaja se u mediteranskom području zbog iznimne otpornosti na sušu te za rast i razvoj joj odgovara tropska te subtropska klima. Mediteransko područje, posebice europsko je bogato maslinama i njezinim proizvodima te predstavlja oko 90 % obradive površine na kojoj se uzgajaju masline, što čini više od 11 milijuna hektara (Markhali i sur., 2020).

Stablo masline (slika 1) je relativno nisko i debelo, sastoji se od stabala i trščastih grana u grmolikom obliku s velikim brojem razgranatih grančica na kojima se nalaze listovi masline. Grane kod mladog stabla na sebi mogu imati trnje te mogu biti viseće i uspravne. Viseće grane su iznimno fleksibilne te mogu podnijeti veliki broj plodova na krajevima grančica (Muzzalupo, 2012). Stablo može dosegnuti visinu od 10 m i uglavnom je uvinuto ili savijeno. Stabla masline su dugoga životnog vijeka te mogu poživjeti i do 1000 godina (Hashmi i sur., 2015). Kora stabla je pepeljasto sive boje, kod mladog stabla tekstura kore je glatka dok starenjem postaje hrapavija (Muzzalupo i sur., 2012).



Slika 1. Stabla masline (Khalil i sur., 2022)

Pupovi na stablu masline su prekriveni sitnim dlakama, a cvijet masline je dvospolan i sitan, žuto-bijele boje u obliku grozda, a nakon cvjetanja i oplodnje dolazi do razvoja ploda masline. Plod stabla *Olea europaea* L. je koštunica eliptičnog do loptastog oblika, duljina ploda varira od 15 do 25 mm, a polumjer je oko 6 mm.

Plod je mesnat, svjetlozelene boje te sazrijevanjem poprima ljubičasto-crnu boju (Muzzalupo i sur., 2012). Period dozrijevanja ploda maslina je u rujnu i listopadu. Iznimno je bogat uljem te ima razne zdravstvene benefite (Rapoport i sur., 2016). Sam plod se može podijeliti na tri dijela: koža (epikarp), pulpa (mezokarp) i endokarp u kojem se nalaze sjemenke. Masline su iznimno gorke te se uglavnom ne konzumiraju svježe nego se pretežito koriste za proizvodnju maslinovog ulja te stolnih maslina (Kanakis i sur., 2013).

Sorta masline koja je najzastupljenija u Republici Hrvatskoj je oblica.

Na svijetu najveći proizvođač maslinovog ulja je Španjolska koja proizvodi oko 45 % ulja na ukupnom tržištu. Prilikom proizvodnje ulja nastaje velika količina otpada koji se pretežito odnosi na kominu masline, otpadne vode i lišće stabla masline. Komina je čvrsti nusprodukt koji nastaje nakon proizvodnje maslinova ulja. Prilikom obrade 5 227 770 tona maslina nastane 329 233 tona listova masline, što dovodi do problema zbrinjavanja istih što uzrokuje dodatni

ekonomski i ekološki problem (Hernández-Fernández i sur., 2023). Listovi masline se beru tijekom cijele godine, naročito prilikom obrezivanja stabala kada se u prosjeku sakupi oko 25 kg lišća i grančica po stablu.

2.2. LIST MASLINE

List masline (slika 2) najčešće je duguljast, kožast i uzak zašiljenih vrhova te se sastoji od lisne plojke, peteljke i drške (Miljković i sur., 2011). Lišće je po granama stabla masline raspoređeno neparno perasto što znači da su dva lista uvijek jedan nasuprot drugome, a grana završava samo s jednim listom. Lice lista je tamnozeleno, dok je naličje srebrnkasto-bijelo. Tu mu boju daju mrtve dlačice zvjezdastog oblika koje također štite list od sunca, čime se smanjuje transpiracija. Duljina lista je između 4 i 10 cm sa širinom od 1 do 3 cm (Hashmi i sur., 2015). List masline dozrijeva sporo te se proces fotosinteze odvija u listu, ali tek nakon što list dosegne svoju maksimalnu veličinu (Maayan i sur., 2008).



Slika 2. Grana stabla masline s listovima (Borjan i sur., 2020)

2.2.1. Kemijski sastav lista masline

List masline je bogat biološki aktivnim spojevima te ima potencijal primjene u prehrambenoj, kemijskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i drugim industrijama (Abaza i sur., 2015) u proizvodnji funkcionalnih proizvoda.

Udio vlage u listu masline iznosi oko 3,95 %, masti 7,45 %, proteina 11,04 %, pepela 3,72 % te ugljikohidrata 76,46 % (vlakna i šećeri) (Lee i sur., 2005). Manitol je primarni šećer identificiran u listu masline te nakon njega slijede saharoza, glukoza te fruktoza (Medina i sur., 2019). Od vlakana u najvećem udjelu se nalazi lignin (oko 15 %). Pored lignina list masline sadrži celulozu te hemicelulozu (Lama-Muñoz i sur., 2020). Aminokiselinski sastav lista masline čine esencijalne aminokiseline u udjelu od 57,51 % te neesencijalne aminokiseline čiji udio čini ostatak, odnosno 42,49 %. Najzastupljenije aminokiseline su lizin (17,12 %), glicin (10,35 %) i glutaminska kiselina (9,54 %). List masline sadrži sve esencijalne aminokiseline osim metionina (Ibrahim i sur., 2016).

U listu masline prevladavaju nezasićene masne kiseline u odnosu na zasićene. Udio nezasićenih masnih kiselina iznosi od 44,50 % do 58,29 %, dok zasićenih masnih kiselina od 23,30 % do 28,99 %. Općenito, najveći udio masnih kiselina u listu masline se odnosi na linolensku kiselinu (30 – 42 %), oleinsku (18,20 – 26,36 %) te palmitinsku kiselinu (18,22 – 22,42 %) (Bahloul, Kechaou i Boudhrioua, 2014).

Zastupljeni su i minerali, u najvećem udjelu kalcij (Bahloul i sur., 2014), zatim kalij, fosfor, magnezij, silicij, cink, natrij, mangan i željezo (de Oliveira i sur., 2023). Na mineralni sastav lista, ali i ploda značajno utječu hranjivi sastojci iz tla te okolišni uvjeti (Bahloul i sur., 2014).

Biološki aktivni spojevi imaju dokazano protuupalno, antimikrobno i antioksidativno djelovanje (Hamzalıoğlu i Gökmen, 2016).

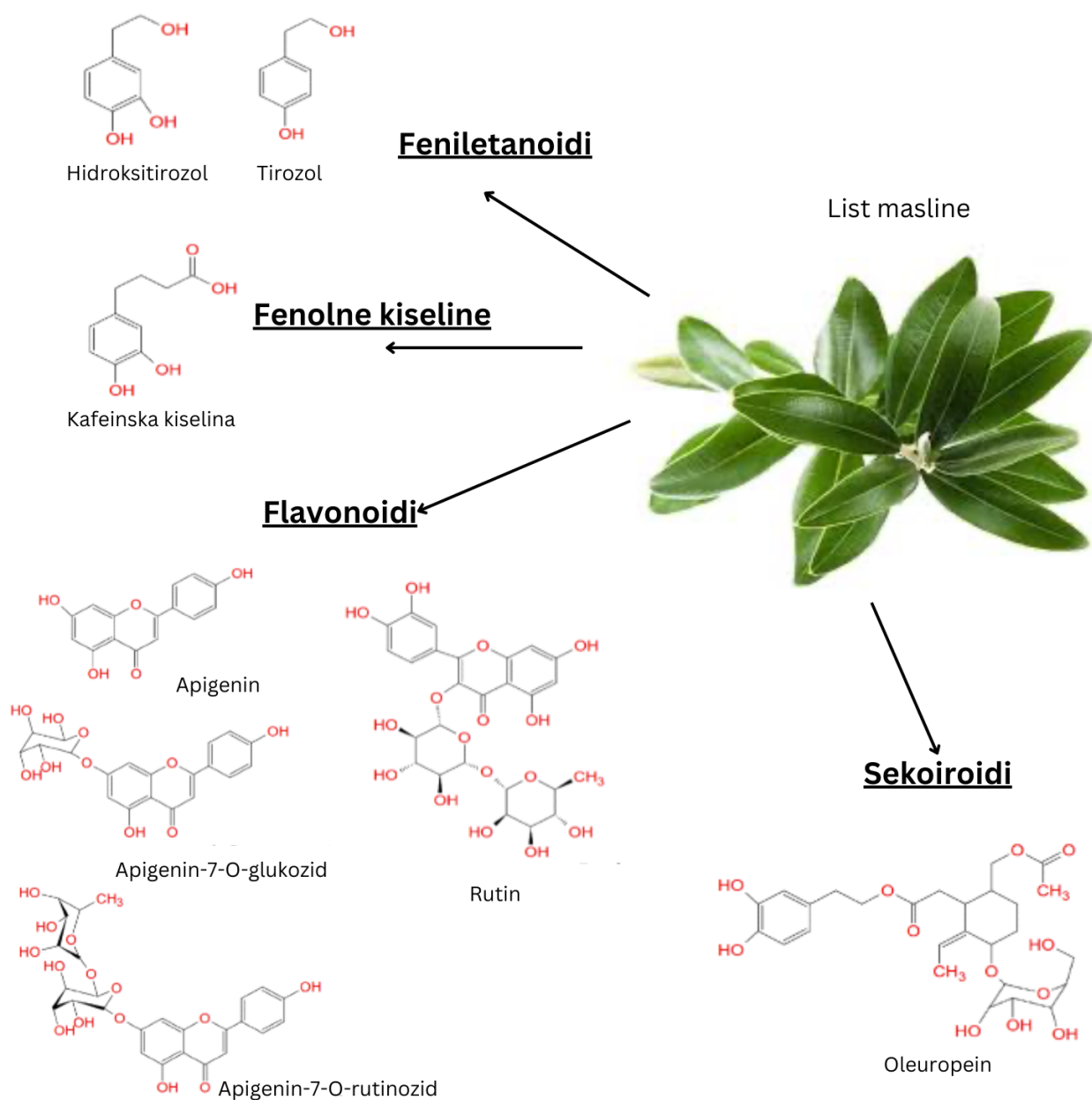
Triterpenoidi predstavljaju sekundarne metabolite koji se uglavnom nalaze u vanjskoj ovojnici lista masline, u vosku (Jäger i sur., 2009). U listu masline se nalazi velika količina pentacikličkih triterpenoida koji sadrže značajnu količinu oleanolne kiseline te uvaola. Oleanolna kiselina je zastupljena u značajnom udjelu od 3,0 do 3,8 % (Martín-García i sur., 2019), dok se sadržaj uvaola kreće u rasponu od 0,07 do 0,14 % (Guinda i sur., 2015). Ovisno o vremenu same berbe i sorti ovise i koncentracije oleanolne kiseline i uvaola (Canabarro i Mazutti, 2019).

U listu masline zastupljen je α -tokoferol te njegov udio ovisi o sorti masline, a kreće se od 10,12 $\mu\text{g/g}$ s.tv. (sorta Neb Jmel) do 82,37 $\mu\text{g/g}$ s.tv. (sorta Oueslati) (Markhali i sur.,2020). Od pigmenata su zastupljeni klorofil i karotenoidi koji su primarno odgovorni za boju plodova i lista, ali i provođenja drugih reakcija te sazrijevanje biljke. Karotenoidi se odlikuju antioksidativnim, antiupalnim, antimutagenim i antikancerogenim djelovanjem (Markhali i sur., 2020). Klorofil *a* glavni je pigment u sustavu fotosinteze te se pojavljuje u dva oblika: klorofil *a* i klorofil *b* (Trees i sur., 2000). Sadržaj karotenoida u listu masline u sortama maslina Neb Jmel i Oueslati iznosi od 26,90 do 44,33 $\mu\text{g/g}$ s. tv., a sadržaj klorofila u sortama masline Oueslati iznosi oko 829,29 $\mu\text{g/g}$ s. tv. (Markhali i sur., 2020).

2.2.1.1.Fenolni sastav lista masline

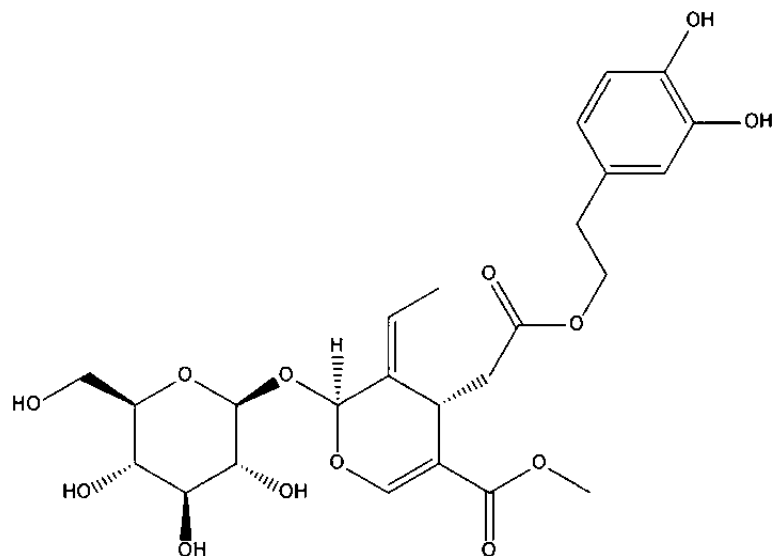
Sve biljne vrste imaju mogućnost sinteze velikog broja niskomolekulskih spojeva koji imaju različite korisne uloge u metabolizmu biljke, a upravo takvi spojevi jesu fenoli, raznolika skupina spojeva s benzenskim prstenom na koji je vezana hidroksilna skupina. Uloga fenola u metabolizmu i životu biljke jest prilagodba na okolišne uvjete te obrambena uloga fenolnih spojeva u biljci od UV zračenja i patogena.

List masline iznimno je bogat fenolima (slika 3), među kojima su zastupljeni sekoiridoidi (oleuropein i oleuropein-aglikon), flavonoidi (rutin, luteolin-7-glukozid, luteolin, apigenin-7-glukozid, diosmetin, luteolin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, rutin), fenolne kiseline (vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina, kumarinska kiselina, siringinska kiselina, galna kiselina (Ghomari i sur., 2019; Mir-Cerdà i sur., 2023).



Slika 3. Fenolni sastav lista maslina (prema Souilem i sur., 2017)

Od svih navedenih fenola u listu masline prevladavaju oleuropein te hidroksitirozol. Oleuropein (slika 4) karakterizira esterska veza glukozida elenolne kiseline i hidroksitirozola (Markhali i sur., 2020). Upravo zbog specifične sekoiridoidne strukture ima gorak okus (Acar-Tek i Ağagündüz, 2020). Maseni udio oleuropeina u suhom listu masline iznosi od 6 do 9 %. Količina hidroksitirozola u listu masline iznosi oko 2,28 mg na 100 g ekstrakta lišća, a količina tirozola iznosi oko 0,0007 mg/g s.tv. (Markhali i sur., 2020).

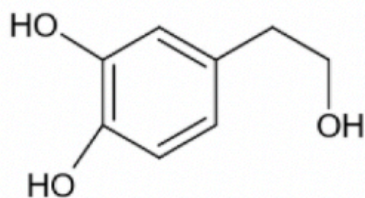


Slika 4. Kemijska struktura oleuropeina

2.2.2. Zdravstvene koristi i upotreba lista masline

List masline se odlikuje jedinstvenim sastavom biološki aktivnih spojeva te se odavno koristi u tradicionalnoj medicini, prehrani i kozmetici. Danas se najčešće može pronaći u praškastom obliku, kao ekstrakt, ali se koriste i svježi ili osušeni listovi za pripremu čajeva (Žugčić i sur., 2019).

Fenolni profil lista masline je velikom glavnom zaslužan za mnogobrojne pozitivne učinke koje list ima na ljudski organizam, a posebice se odlikuje snažnim antioksidacijskim djelovanjem (Hejrati, 2020). Oleuropein i njegov metabolit hidroksitirozol (slika 5) pored antioksidacijskog djelovanja odlikuju se antimikrobnim, antiupalnim, antikancerogenim i antivirusnim djelovanjem (Omar, 2010).



Slika 5. Kemijska struktura hidroksitirozola

Antioksidacijsko djelovanje hidroksitirozola temelji se na inhibiranju slobodnih radikala. Proces se uglavnom odvija doniranjem vodikovih atoma iz hidroksilnih skupina čime dolazi do stvaranja niskoenergetskih veza koje imaju minimalnu reaktivnost zbog delokalizacije u denoksilnom radikalu (Markhali i sur., 2020). Na staničnoj razini može modificirati patofiziološke procese. Hidroksitirozol svojim djelovanjem smanjuje koncentraciju kolesterola niske gustoće te triglicerida čime se smanjuje mogućnost nastanka infarkta (Omar, 2010). Djeluje antiaterogeno, antihipertenzivno te posjeduje inhibirajuće djelovanje na trombocite (Petroni i sur., 1995) te stvaranje eikosanoida (Omar, 2010).

Oleuropein ima neuroprotektivni učinak te se pokazao uspješnim kod smanjenja oksidativnog oštećenja crne tvari u regiji mozga koja je najzahvaćenija neurodegeneracijom u oboljelih od Parkinsonove bolesti (Sarbishegi i sur., 2014). Hidroksitirozol djeluje preventivno na Alzheimerovu bolest, depresiju te kognitivne poremećaje. Inhibira sintezu proteina koji su izraženi u stanicama raka dojke (Sun i sur., 2017), koristi se za prevenciju postmenopauzalne osteoporoze (Liu i sur., 2022), dijabetesa, smanjuje količinu glukoze u krvi, oksidativni stres, krvni tlak, taloženje masti (Da Porto i sur., 2021). Antimikrobno djelovanje fenolnih spojeva kao što je rutin, hidroksitirozol, oleuropein, kafeinska kiselina, luteolin-7-O-glukozid, se dokazalo iznimno djelotvornim u inhibiranju rasta bakterija *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* te *Staphylococcus aureus*. Tirozol inhibira bakteriju *Listeria monocytogenes* te plijesan *Aspergillus flavus*, dok rutin inhibira rast kvasca *Candida albicans* (Borjan i sur., 2020).

Upotreba lista masline je široka te se koristi u mnogobrojnim prehrambenim proizvodima. Kod rafiniranih ulja dodatak ekstrakta lista masline ima pozitivan učinak na antioksidacijsku aktivnost i bolju oksidativnu stabilnost ulja. Hidroksitirozol povećava hranjivu vrijednost ulja te onemogućava stvaranje toksičnih produkata oksidacije lipida (Artajo i sur., 2006). Kod sojinog ulja se može koristiti nanoinkapsulirani ekstrakt lista masline koji ulju daje veću oksidacijsku stabilnost. Dodavanjem ekstrakta lista masline u ekstra djevičansko maslinovo ulje unaprijeđuje se hranjiva vrijednost ulja. Dodatkom ekstrakta lista masline komercijalnim i uljima niže nutritivne vrijednosti dobiju se značajne karakteristike visokokvalitetnog ulja (Mohammadi i sur., 2016).

Uspješna primjena ekstrakta lista masline dokazana je u tretiranju raznog voća, naročito u očuvanju antioksidacijskog potencijala voća. Jabuka koja je premazana otopinom kitozana s ekstraktom lista masline, smanjen je pad antioksidansa, flavonoida te fenola u jabuci, a kod hladno skladištenih jagoda je zadržana antioksidacijska aktivnost tvari (Lalas i sur., 2011). List masline ima i dokazano antimikrobno djelovanje pa se uspješno dodaje u mliječne i mesne

proizvode. U mlijeku i jogurtu dodatak ekstrakta ima antimikrobno djelovanje, smanjenjem rasta bakterije *Bacillus cereus* te inhibitorno djelovanje na enzim α -glukozidaza čime se produžuje trajnost mlijeka i mliječnih proizvoda. Dodatkom praha lista masline u mljeveno meso došlo je do znatnog smanjenja rasta mezofilnih aerobnih bakterija (Selim i sur., 2022). Također, dodatkom praha maslinovog lista i vodenoga ekstrakta lista masline dimljenom lososu pokazano je antibakterijsko djelovanje protiv *L. monocytogenes* (Khemakhem i sur., 2019). Pored svih navedenih prednosti list masline se i dan danas uglavnom koristi kao stočna hrana jer je predstavljen kao nusproizvod prehrambene industrije. Međutim, određenim tretmanima sirovina se može mnogo više iskoristiti i plasirati na tržište. Primjerice, vrlo uspješno se može iskoristiti i u drugim granama industrije. Termokemijskom obradom i spaljivanjem sirovine može se dobiti energija (Espeso i sur., 2021). U kozmetičkoj industriji se list masline zbog visokog udjela fenolnih spojeva koji djeluju antioksidativno i kao UV blokatori može uspješno koristiti u zaštiti kože te usporavanju procesa starenja (Cádiz-Gurrea i sur., 2021).

2.3. EKSTRAKCIJA

Uzevši u obzir prirodu i sadržaj biološki aktivnih spojeva koji se nalaze u sirovinama, odabir prigodne ekstrakcijske metode ovisi ponajviše o strukturi i kemijskom sastavu sirovine koja se ekstrahira, prirodi biološki aktivnih spojeva, a zatim i od zahtjeva kvalitete ekstrakta kojeg želimo dobiti, kao i ekonomske prihvatljivosti primjenjenog procesa. Konvencionalne ekstrakcije metode koje se koriste danas u industriji nose sa sobom određene nedostatke, među kojima se ponajviše ističu dugotrajnost postupka, korištenje organskih otapala (Ramos i sur., 2002) te je nakon provedenog postupka ekstrakte vrlo često potrebno dodatno pročišćavati. U cilju nadilaženja navedenih nedostataka i unaprijeđenja postupaka za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljnih sirovina, razvijene su suvremene metode ekstrakcije poput mikrovalne, ultrazvučne, enzimske ekstrakcije, ekstrakcije potpomognute visokim tlakom i dr. Suvremene ekstrakcijske metode su uglavnom razvijene u skladu sa principima "zelene" ekstrakcije (Chemat i sur., 2012). Cilj ovih tehnologija je da se pronađe ravnoteža između ekonomskih i ekoloških zahtjeva.

2.3.1. Ekstrakcija kruto-tekuće

Ekstrakcija čvrsto-tekuće je difuzijski postupak u kojem dolazi do prijelaza tvari iz krute faze u tekuće otapalo zbog razlike u topljivosti te je u cilju izolirati ciljanje spojeve ili smjesu ciljanih spojeva s najvećim mogućim iskorištenjem. Ekstrakcija se odvija kada kruta porozna tvar i tekuće otapalo dođu u kontakt te se odvija difuzija tvari ovisno o topivosti spojeva od interesa u otapalu. Porozna, kruta tvar je često biljni materijal, koji je potrebno prije same ekstrakcije pravilno pripremiti sušenjem i usitnjavanjem kako bi se povećala kontaktna površina otapala i sirovine.

Na prijenos mase u otapalo će utjecati vrsta biljnog materijala, kemijski sastav, oblik i veličina čestica, veličine pora u sirovini. Najčešće, na učinkovitost ekstrakcije utječe vrsta otapala koje se koristi. Polarni spojevi s visokom dielektričnom konstantom se dobro otapaju u polarnim otapalima i obrnuto. Također, viskoznost otapala povećava koeficijent difuzije i ubrzava postupak ekstrakcije. Povećanjem temperature može se poboljšati ekstrakcijski učinak, kao i produženjem vremena ekstrakcije. Međutim, previsoka temperatura i dugo trajanje postupka ekstrakcije može dovesti do degradacije spojeva od interesa (Tiwari, 2015).

Nisko iskorištenje, dugo trajanje, velika potrošnja energije i uporaba velikih količina toksičnih otapala često ograničavaju korištenje konvencionalne kruto - tekuće ekstrakcije u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Stoga, industrija i znanost se okreću zelenim metodama ekstrakcije, koje daju potencijalna rješenja prethodno spomenutim problemima te do sada pokazuju značajnu ulogu u dobivanju ekstrakta s visokim sadržajem biološki aktivnih spojeva (Gupta i sur., 2012).

2.3.2. Enzimima potpomognuta ekstrakcija

Kako bi se povećalo iskorištenje ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz biljnih sirovina, ali u isto vrijeme i očuvala njihova biološka i funkcionalna svojstva prilikom ekstrakcije, s obzirom na to da postupci ekstrakcije uglavnom zahtijevaju visoke temperature i uporabu toksičnih otapala, jedno od potencijalnih rješenja predstavlja upotrebu enzima u postupku ekstrakcije. Prisutnost različitih kompleksnih struktura u biljnim stanicama poput hemiceluloze, celuloze i pektina u strukturi stanične stijenke, može smanjiti učinkovitost ekstrakcije konvencionalnim metodama. Stoga, prema načelima zelene kemije javljaju se nove metode u kojima se kao jedno od rješenja predstavlja enzimima potpomognuta ekstrakcija.

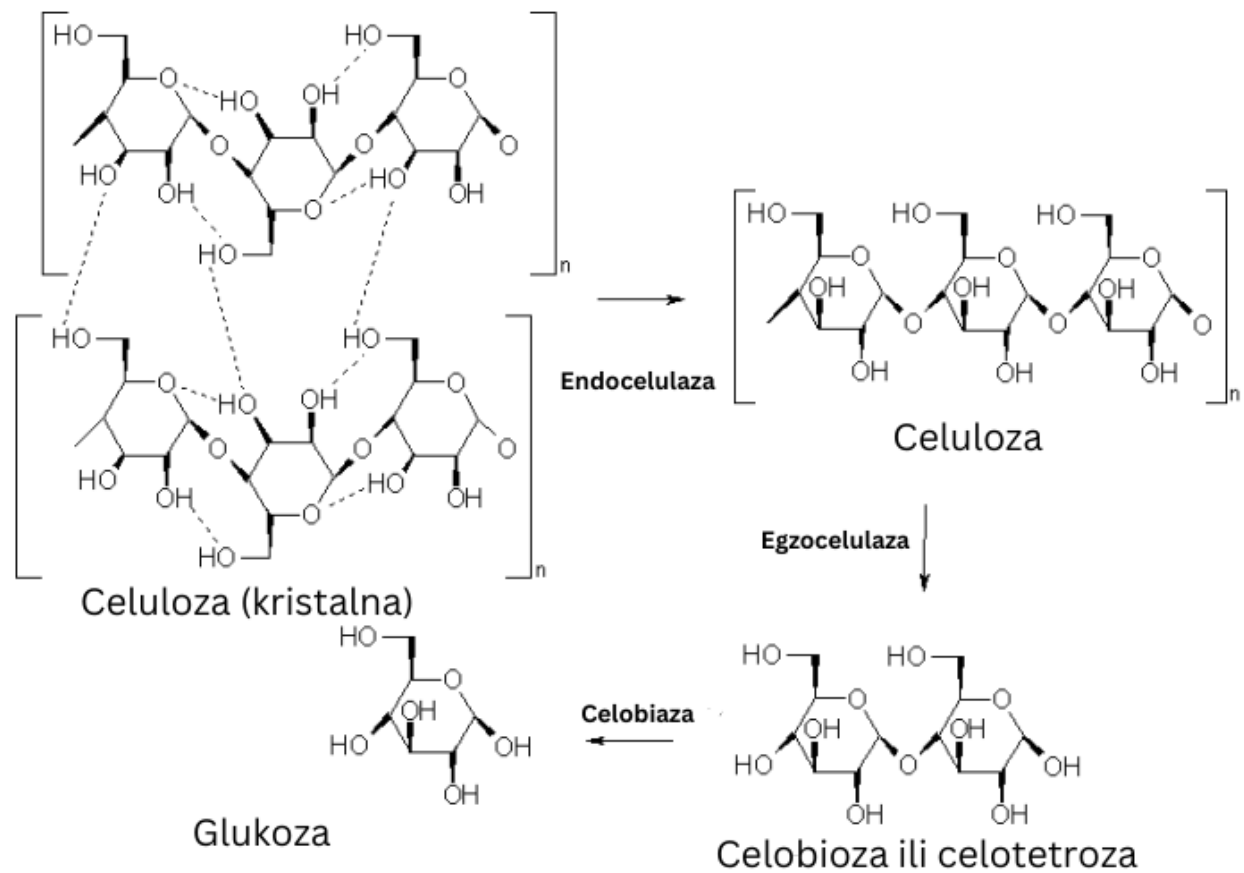
Enzimaska ekstrakcija je postupak ekstrakcije primjenom specifičnih enzima koji pomažu oslobađanju biološki aktivnih komponenti iz različitih sirovina. Enzim svojom aktivnošću razgrađuje gradivne molekule stanične stijenke reakcijom hidrolize pri optimalnim eksperimentalnim uvjetima. Djelovanjem enzima dolazi do reakcije hidrolize, odnosno učinkovitije razgradnje polimera unutar stanične stijenke i samim time je uvelike omogućen pristup otapala staničnom sadržaju čime je olakšana izolacija biološki aktivnih spojeva iz stanice. Samim time, uporabom enzima koji selektivno depolimeriziraju i razgrađuju celulozu kao bitan dio biljnih stanica, povećava se iskorištenje i učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala.

Ekstrakcija ovisi o sposobnosti enzima da ubrza reakcije za određene supstrate selektivnošću, bez da dođe do ikakvih izmjena njihove strukture (Akyüz i Ersus, 2021; Sheldon i van Pelt, 2013). Korištenjem enzima prilikom ekstrakcije dolazi i do manje potrošnje energije, veće učinkovitosti i blažih ekstrakcijskih uvjeta.

Ekstrakcija potpomognuta enzimima ima niz prednosti, kao što su npr. smanjenje količine kemijskih otapala, primjena vode kao otapala, niže temperature ekstrakcije što je čini ekonomski prihvatljivijom metodom (Domínguez-Rodríguez i sur., 2021). Međutim, zbog osjetljivosti enzima, enzimski potpomognutu ekstrakciju treba provoditi uz kontrolirane uvjete kao što je odgovarajuća temperatura, pH otapala u kojem se provodi reakcija, vrijeme ekstrakcije, koncentracija odgovarajućeg enzima kako bi optimizirali postupak ekstrakcije (M'hiri i sur., 2014). Enzimski potpomognuta ekstrakcija fenolnih spojeva lista guave poboljšava udio topivih fenola i flavonoida gotovo dva puta. Fenolni ekstrakti lista guave nakon enzimski potpomognute ekstrakcije pokazali su najveću antioksidacijsku aktivnost i zaštitni učinak protiv oštećenja DNA (Wang i sur., 2017). Tretman lista lovora enzimom celulaza pokazao je da enzimima potpomognuta ekstrakcija rezultirala povećanjem prinosa eteričnog ulja do 245 % (Boulila i sur., 2015).

Celulaza i pektinaza su enzimi koji se najčešće koriste za ekstrakciju biljnog materijala, među kojima su fenoli iz otpada nakon berbe masline (Wang i sur., 2017), morskih algi *Ulva armoricana* H. (Hardouin i sur., 2016), češnjaka (*Allium sativum* L.) (Lee i sur., 2013), ali i peteljki brijesta (*Ulmus pumila* L.) i lista lovora (*Laurus nobilis* L.) (Boulila i sur., 2015).

Celulaza je enzim koji reakcijom hidrolize razgrađuje β -1,4 glikozidne veze celuloze, a kao produkt hidrolize nastaju jednostavni šećeri (slika 6) (Ejaz i sur., 2021).



Slika 6. Hidrolitička aktivnost celulaznih enzima (Bacovsky, 2010)

3. EKSPRERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu kao uzorak su se koristili listovi masline ubrani u lipnju 2022. godine u Republici Hrvatskoj na području Pirovca (Dalmacija). Kao prirodno osušeni na zraku, listovi su skladišteni na suho i tamno mjesto u propilenskim vrećicama, a prije upotrebe su usitnjeni pomoću električnog mlinca (Tefal GT 110838, Kina).

3.1.2. Kemikalije

- DNSA (3,5-dinitrosalicilna kiselina) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Dušična kiselina 65 % (Kemika d.d., Zagreb)
- Enzim Celullase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Etanol (Thermo Fisher Scientific, Maharashtra, Indija)
- Fenol 99+ % (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Maharashtra, Indija)
- Folin-Ciocalteu reagens (Gram – Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Glukoza (Gram – Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- K-Na-tartarat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Limunska kiselina (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Metanol (Thermo Fisher Scientific, Maharashtra, Indija)
- NaOH (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijev karbonat (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Pročišćena voda
- Sumporna kiselina (Carlo Erba Reugents S.A.S., Francuska)

3.1.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (Tehničar, 2001, Zagreb, RH)
- Električni mlinac (Tefal GT 110838, 180 W, Kina)
- Eppendorf epruvete
- Erlenmeyerova tikvica
- Falcon kiveta
- Laboratorijska čaša
- Lijevak za filtraciju
- Lijevak za filtraciju sa sinterom (G4)
- Magnetska mješalica (MS-H-S, DLABScientific, Peking, Kina)
- Menzura volumena 10, 25, i 250 mL
- Mikropiteta 100 – 1000 μ L (KemoLab d.o.o., Zagreb)
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 100mL, 200 mL, 1000 mL
- Okrugla tikvica 1L
- pH metar (LAB 860, SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka)
- Pinceta
- Plastična ladica za vaganje
- Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 1, Waltham, SAD)
- Staklena čaša volumena 1000 mL
- Staklena pipeta 1mL, 2 mL
- Staklene epruvete
- Staklene epruvete
- Staklene kivete
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, RH)
- Vodeno hladilo
- Vortex mješalica (Labo Moderne, Pariz, Francuska)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema otopina i pufera

3.2.1.1. Folin-Ciocalteu reagens ($c = 2 \text{ mol/L}$)

Folin-Ciocalteu reagens je razrijeđen deioniziranom vodom u omjeru 1:2, (v/v).

3.2.1.2. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina, w/v)

Zasićena otopina natrijeva karbonata je pripravljena otapanjem 200 g bezvodnog natrijeva karbonata u 800 mL vruće destilirane vode te je potom ohlađena do sobne temperature. Dodano je nekoliko kristalića natrijeva karbonata te je nadopunjeno u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL i nakon 24 sata otopina je filtrirana.

3.2.1.3. Otopina DPPH ($c = 0,0094 \text{ mM}$)

Za pripravu 0,0094 mM otopine DPPH, odvagano je 7,6 mg DPPH i otopljeno u 200 mL dodatkom metanola. Otopina je kontinuirano miješana 20 minuta kako bi se DPPH otopio u potpunosti. Kada je DPPH otopljen, uzorak je čuvan u zatvorenoj tikvici na tamnome mjestu.

3.2.1.4. Limunski pufer ($\text{pH} = 5$)

Pufer otopina je pripravljena na način da je odvagano 900 g limunske kiseline u laboratorijsku čašu volumena 1000 mL i dodano 900 mL pročišćene vode. Nakon što se limunska kiselina otopila u vodi, pH otopine se podesi primjenom pH metra. Sonda pH-metra se uroni u čašu s otopinom gdje se postupnim dodavanjem 2 M otopine NaOH pH vrijednost podesi do 5. Nakon podešene pH vrijednosti sadržaj je preliven u bocu i čuvan na tamnom i hladnom mjestu do sljedeće upotrebe.

3.2.1.5. Otopina K-Na-tartarata ($\gamma = 0,4 \text{ g/mL}$)

Otopina K-Na-tartarata se priprema tako da je u odmjernu tikvicu od 10 mL odvagano 4 g K-Na-tartarat monohidrata, te je tikvica nadopunjena do oznake destiliranom vodom.

3.2.1.6. Otopina DNSA

Za pripravu otopine DNSA korištene za određivanje enzimske aktivnosti potrebno je izvagati 10 g DNSA, 0,5 g natrijevog sulfata, 10 g natrijevog hidroksida te dodati 2 mL otopine fenola (5 %, w/v). Izvagane tvari su prebačene u odmjernu tikvicu od 1000 mL te otopljeni destiliranom vodom. Nakon što su krute tvari otopljene, tikvica je nadopunjena do oznake, promiješana i sadržaj je prebačen u zatamnjenu bocu i čuvano na 4 °C.

3.2.2. Gravimetrijsko određivanje sadržaja celuloze

Odvagano je 1 g uzorka lista masline u tikvicu te je dodano 250 mL otopine HNO_3 ($c = 15,57 \text{ mol/dm}^3$):etanol (96 %, v/v) = 1:4. Sadržaj u tikvici je kuhan na vodenoj kupelji 60 minuta uz povratno hladilo. Tekućina je oddekantirana u prethodno odvagani lijevak za filtraciju sa sinterom te je ponovno u tikvicu dodano 25 mL smjese HNO_3 ($c = 15,57 \text{ mol/dm}^3$):etanol (96 %, v/v) = 1:4 i dodatno je kuhano još 60 minuta. Ostatak u tikvici mora u potpunosti biti bijel te je stoga postupak ponovljen sve do postizanja bijele boje. Vrućom destiliranom vodom je zatim ispiran do neutralne reakcije. Lijevak za filtraciju sa sinterom se suši u sušioniku do konstantne mase pri temperaturi od 105 °C.

Maseni udio celuloze (w) se računa prema jednadžbi 1:

$$w(\text{celuloza}) = \frac{m_2 - m_1}{m_3} \cdot 100 \% \quad [1]$$

U jednadžbi:

m_1 - masa praznog filter lončića (g)

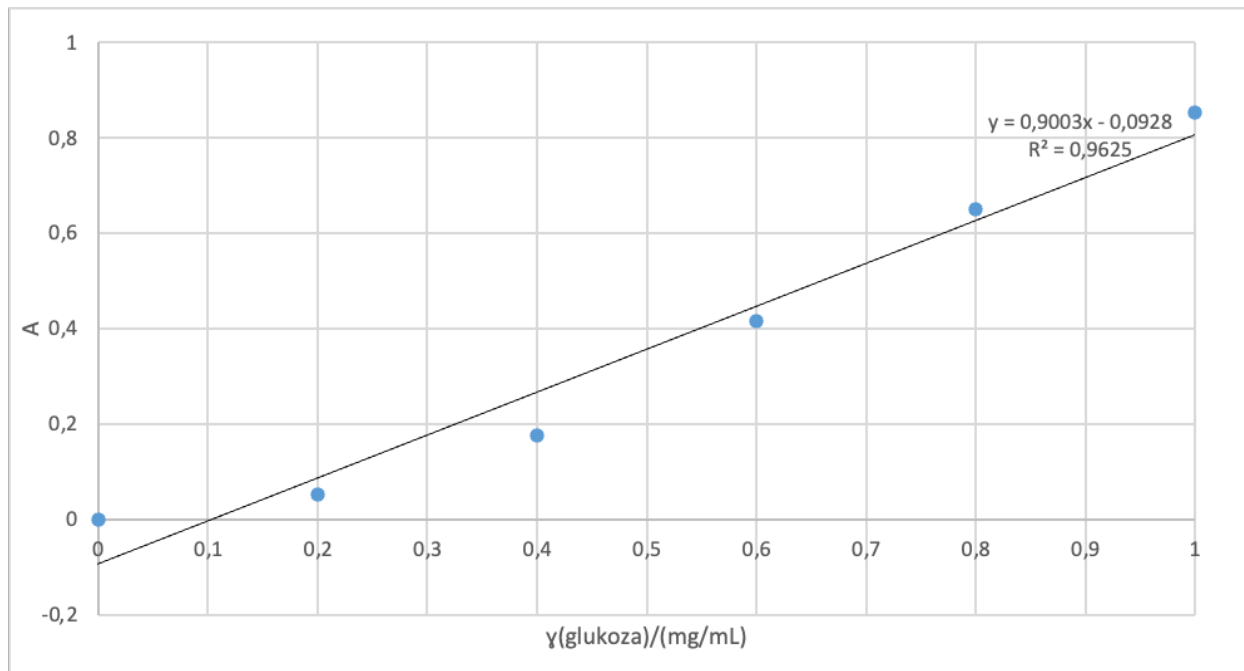
m_2 - masa filter lončića s celulozom (g)

m_3 - masa apsolutnog suhog uzorka (g).

3.2.3. Određivanje enzimске aktivnosti

3.2.3.1. Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama (slika 7) potrebno je pripremiti standardnu otopinu glukoze ($\gamma = 1$ g/L) tako što je odvagano 1 mg glukoze te otopljeno u 1 mL destilirane vode i tikvica je nadopunjena do oznake. Pripremljena standardna otopine glukoze ($\gamma = 1$ g/L) je razrijeđena na standarde masenih koncentracija 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL i 0,8 mg/mL. U epruvetu je otpipetirano 600 μ L otopine odgovarajućeg standarda glukoze za koncentraciju koja se mjeri te 600 μ L DNSA. Kao slijepa proba korišteno je 600 μ L pročišćene vode umjesto standardne otopine glukoze. Sadržaj u epruveti je promiješan uz pomoć Vortex miješalice te se vrši inkubacija u tresilici s grijačem pri 95 °C kroz 15 minuta. Završetkom inkubacije dodano je 200 μ L K-Na-tartarata, uzorci su ohlađeni kroz 5 minuta te im je izmjerena apsorbancija pri 575 nm. Baždarni dijagram je konstruiran pomoću Microsoft Excel programa.



Slika 7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze

Jednadžba 2 predstavlja jednadžbu baždarnog pravca glukoze:

$$y = 0,9003x - 0,0928$$

[2]

U kojoj je:

y - apsorbancija uzorka pri 575 nm

x - masena koncentracija glukoze izražena u mg/mL.

3.2.3.2. Postupak određivanja enzimске aktivnosti celulaze

Enzimska aktivnost celulaze određuje se prema protokolu za određivanje celulazne i hemicelulazne aktivnosti enzima pomoću 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNSA) (Kracher i sur., 2014). Prema DNSA postupku, prvo se u plastičnoj epruveti pomiješa 5-10 mg supstrata (celuloze) i 1000 μ L otopine enzima celulaze u određenom masenom udjelu. Sadržaj epruvete se potom vorteksira i epruvete se inkubiraju u tresilici s grijanjem. Inkubacija traje 1 sat i provodi se pri 50 °C. Završetkom inkubacije uzorci se centrifugiraju (10 000 rpm, 5 minuta). Nakon centrifugiranja, 600 μ L supernatanta se izdvoji u čistu epruvetu i doda se 600 μ L DNSA. Epruvete se nakon toga ponovno inkubiraju i inkubacija traje 15 minuta pri temperaturi od 95°C. Završetkom druge inkubacije u epruvete se doda po 200 μ L K-Na-tartarata te sadržaj epruvete se vorteksira, nakon toga se epruvete hlade 5 minuta u hladnjaku. Nakon hlađenja uzorcima se mjeri apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 575 nm.

Prilikom određivanja enzimске aktivnosti enzima celulaza izvršene su tri kontrolne probe, uključivale su slijepu probu bez otopine ispitivanog enzima, slijepu probu bez supstrata te slijepu probu bez otopine DNSA. Otopine enzima i DNSA su nadopunjene destiliranom vodom u odgovarajućem volumenu. Slijepa proba bez ispitivanog enzima se sastojala od otopine DNSA, supstrata, pročišćene vode i K-Na-tartarata. Slijepa proba bez DNSA sastojala se od vodene otopine enzima, supstrata, pročišćene vode i K-Na-tartarata. Slijepa proba bez supstrata sadrži sve otopine osim krutog supstrata.

Nakon izmjerene apsorbancije pri valnoj duljini od 575 nm oduzeta je izmjerena apsorbancija slijepa probe. Dobivena razlika je uvrštena u jednadžbu baždarnoga pravca glukoze te se dobiveni rezultat množi s faktorom konverzije za glukozu, koji iznosi 5,5506 μ mol. Time se izračuna oslobođena količina šećera, a enzimska aktivnost celulaze se dobije pomoću jednadžbe 3:

$$\text{Enzimska aktivnost} = \frac{c(C_6H_{12}O_6)}{t \cdot 1 \text{ mL}} \cdot f \quad [3]$$

Enzimska aktivnost enzima celulaza izražena je u U/mL

$c(C_6H_{12}O_6)$ - koncentracija šećera (mM)

t - vrijeme trajanja ekstrakcije (s)

f - faktor razrjeđenja.

3.2.4. Enzimom potpomognuta ekstrakcija

Enzimom potpomognuta ekstrakcija lista masline je provedena primjenom dvaju otapala, pročišćene vode i limunskog pufera (pH = 5) uz dodatak različitog maseno-volumnog udjela enzima celulaze (0,5; 1; 1,5; 2 i 2,5 %, w/v) pri temperaturi od 50 °C kroz 2 sata. Enzim celulaza je odvagano na analitičkoj vagi tako da su pripravljene otopine jakosti enzima celulaze od 10, 20, 30, 40 i 50 U/mg u vodi te u limunskom puferu (pH = 5).

U Erlenmeyerovu tikvicu volumena 100 mL odvagano je 2 g usitnjenog lišća masline s točnošću $\pm 0,01$ g te je dodano a) 25 mL pročišćene vode i b) 25 mL limunskog pufera (pH = 5). Enzim celulaza je odvagano (od 12,5 do 62,5 mg) na analitičkoj vagi, na način da su pripravljene otopine pufera s maseno-volumnim udjelom enzima od 0,5; 1; 1,5; 2 i 2,5 % celulaze (w/v) što odgovara jakosti enzima celulaze od 10, 20, 30, 40, 50 U/mg u a) pročišćenoj vodi i b) limunskom puferu (pH = 5).

Sadržaj tikvice dobro je promiješan te postavljen na magnetsku miješalicu pri temperaturi 50 °C kroz 2 sata. Na tikvicu je postavljeno vodeno hladilo. Nakon provedene ekstrakcije sadržaj iz tikvice je pomoću filter papira profiltriran u odmjernu tikvicu volumena 25 mL, uz dopunjavanje otapalom do oznake. Sadržaj je prebačen u plastične *Falcon* kivete koje su prethodno označene i uzorci su čuvani na temperaturi pri -18 °C.

Rađena je i negativna kontrola, što podrazumijeva isti ekstrakcijski postupak ali bez dodatka enzima celulaze.

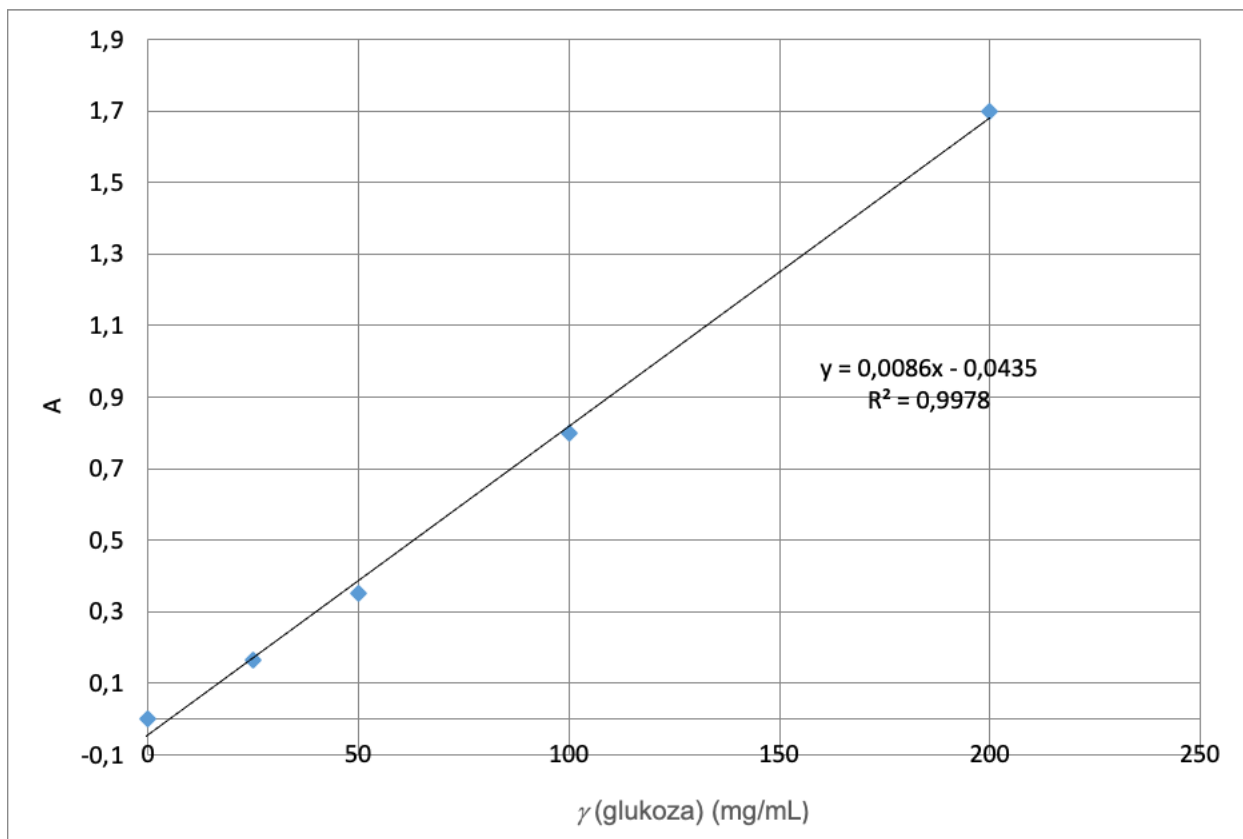
3.2.5. Određivanje masenog udjela ukupnih šećera

Maseni udio ukupnih šećera u ekstraktu lista masline određen je prethodno opisanom kolorimetrijskom metodom (DuBoise i sur., 1956).

3.2.5.1. Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnoga dijagrama glukoze (slika 8) pripravljena je otopina glukoze, masene koncentracije ($\gamma = 200 \mu\text{g/mL}$) tako što je odvagano 20 mg glukoze te otopljeno u 100 mL destilirane vode i tikvica je nadopunjena do oznake. Pripremljen je niz standardnih otopina glukoze da masene koncentracije otopine glukoze iznose redom 25, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/mL}$. Razrijeđene standardne otopine su pripravljene na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira 1,25; 2,5 te 5 mL alikvot otopine glukoze ($\gamma = 200 \mu\text{g/mL}$) te do oznake napuni destiliranom vodom. Slijepa proba sadržavala je sve osim glukoze, umjesto čega je dodana destilirana voda.

U epruvetu je otpipetirano 600 μL odgovarajuće prethodno pripravljene razrijeđene otopine glukoze, 600 μL otopine fenola (5 %, w/v) i 3 mL koncentrirane sumporne kiseline. Sadržaj u epruveti je homogenizirana i termostatiran 5 min u proključaloj vodi, nakon čega je hlađen u ledenoj vodi, stajanjem na tamnome mjestu kroz 30 minuta. Uzorcima je izmjerena apsorbancija na spektrofotometru pri 492 nm. Na isti način je pripravljena i slijepa proba, osim što je umjesto otopine glukoze korištena voda. Nakon izmjerenih vrijednosti apsorbancija svih pripravljenih otopina glukoza, konstruiran je baždarni dijagram te izračunata jednadžba pravca pomoću Microsoft Excel programa.



Slika 8. Baždarni dijagram glukoze

Jednadžba 4 predstavlja jednadžbu baždarnog pravca glukoze:

$$y = 0,0086x - 0,0435 \quad [4]$$

U jednadžbi:

y - apsorbancija uzorka pri 492 nm

x - masena koncentracija glukoze izraženu u $\mu\text{g/mL}$.

3.2.5.2. Postupak određivanja masenog udjela ukupnih šećera

Nakon provedene enzimom potpomognute ekstrakcije, izuzeti su ekstrakti, te su razrijeđeni 121 puta kako bi se moglo izvršiti određivanje ukupnih šećera.

U epruvetu je otpipetirano 600 μL razrijeđenoga uzorka ekstrakta, 600 μL otopine fenola (5 %, w/v) i 3 mL koncentrirane sumporne kiseline. Sadržaj u epruveti je homogenizirana i

termostatiran 5 min u proključaloj vodi, nakon čega je hlađen u ledenoj vodi, stajanjem na tamnome mjestu kroz 30 minuta. Uzorcima je izmjerena apsorbancija na spektrofotometru pri 492 nm. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, osim što je umjesto uzorka korištena voda, odnosno limunski pufer, ovisno o kojem je uzorku se radi.

Maseni udio ukupnih šećera u uzorcima je izračunat prema jednadžbi 5:

$$w(\text{šećeri}) = \frac{x \cdot V \cdot f}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \% \quad [5]$$

x - masena koncentracija glukoze (mg/mL)

V - volumen uzorka

f - faktor razrjeđenja koji je korišten

m (*uzorak*) - masa uzorka (mg)

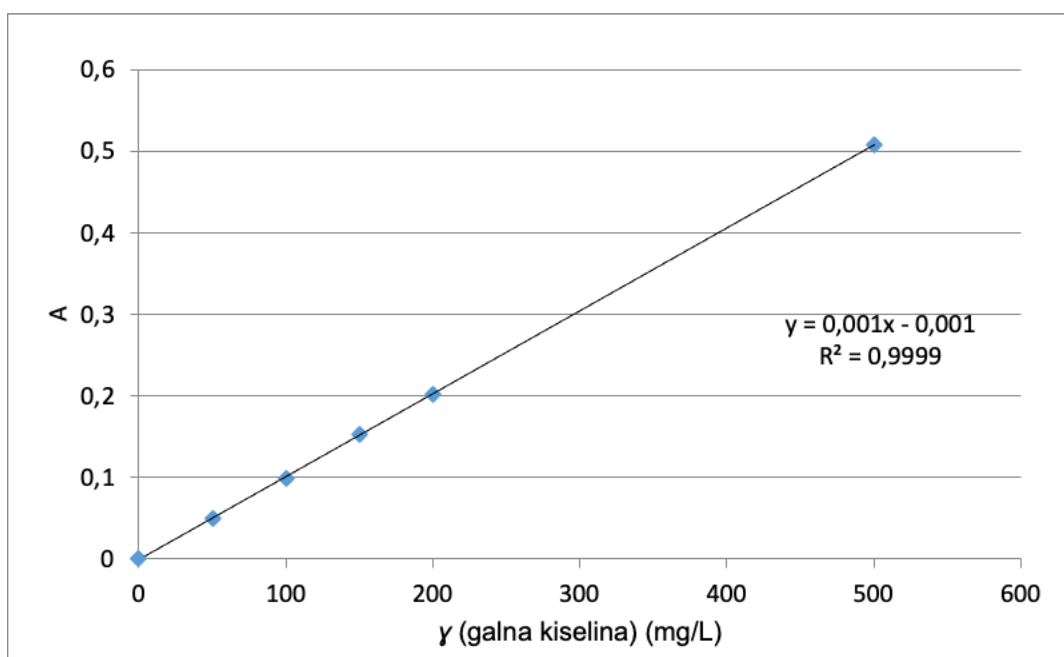
3.2.6. Određivanje masenog udjela ukupnih fenola

Metoda određivanja ukupnih fenola se bazira na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, mjerenjem nastalog obojenja pri 765 nm (Singleton i Rossi, 1965). Reagens Folin-Ciocalteu predstavlja smjesu fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline u kojoj pri blago alkalnim uvjetima oksidacijom fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid te su plavoga obojenja. Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba stabilne plave boje kod kompleksa bit će intenzivnija što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima (Jakopić i sur., 2009).

3.2.6.1. Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama (slika 9) potrebno je pripremiti standardnu otopinu galne kiseline ($\gamma = 5 \text{ g/L}$) tako što je odvagano 250 mg galne kiseline te otopljeno u 10 mL 96 % etanola u odmjerne tikvici volumena 50 mL, te s deioniziranom vodom je nadopunjen do oznake. Od pripremljene standardne otopine galne kiseline potrebno je napraviti razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumene 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 4, 5 te 10 mL alikvota standardne

otopine galne kiseline i nadopuni vodom do oznake. Njezinim razrjeđivanjem pripremile su se standardne otopine galne kiseline masenih koncentracija 50, 100, 150, 200, i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 125 μ L otopine standarda galne kiseline u staklene epruvete, doda se 625 μ L Folin-Ciocalteu reagensa (1:2, v/v) i 10 mL destilirane vode te se nakon 3 minute doda 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata (20 %, w/v). Nakon što su uzorci homogenizirani i termostatirani 25 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C, izmjerena im je apsorbancija pri 765 nm. Za slijepu probu je korištena destilirana voda umjesto standarda galne kiseline. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije i izračunatih koncentracija galne kiseline, nacrtan je baždarni dijagram i izračunata jednadžba pravca pomoću Microsoft Excel programa.



Slika 9. Baždarni dijagram galne kiseline

Jednadžba 6 predstavlja jednadžbu baždarnog pravca galne kiseline:

$$y = 0,001x - 0,001$$

[6]

y - apsorbancija uzorka pri 765 nm

x - masena koncentraciju galne kiseline izražena u mg/L.

3.2.6.2. Postupak određivanja masenog udjela ukupnih fenola

Za mjerenje obojane reakcije nastalog plavog obojenja nastalih fenolnih spojeva, izuzeti su ekstrakti, te su razrijeđeni 5 puta s odgovarajućim otapalom, ovisno o uzorku.

U staklenu epruvetu je otpipetirano 125 µL prethodno razrijeđenoga uzorka ekstrakta, zatim 625 µL Folin-Ciocalteu reagensa (1:2, v/v) te 10 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute, dodano je 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata (20 %, w/v). Uzorci su homogenizirani i termostatirani 25 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C te je izmjerena apsorbancija svakog uzorka pri 765 nm. Slijepa proba je pripravljena na isti način, samo je umjesto ekstrakta korišteno otapalo za ekstrakciju.

Maseni udio ukupnih fenola u uzorcima je izračunat prema jednadžbi 7:

$$w(\text{ukupni fenoli}) = \frac{x \cdot V \cdot f}{m(\text{uzorak})} \quad [7]$$

x - masena koncentracija galne kiseline (mg/mL),

V - volumen uzorka (mL),

f - faktor razrjeđenja koji je korišten,

m (*uzorak*) - masa uzorka (g).

Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline na 100 g suhog lista masline (mg GAE/ 100 g).

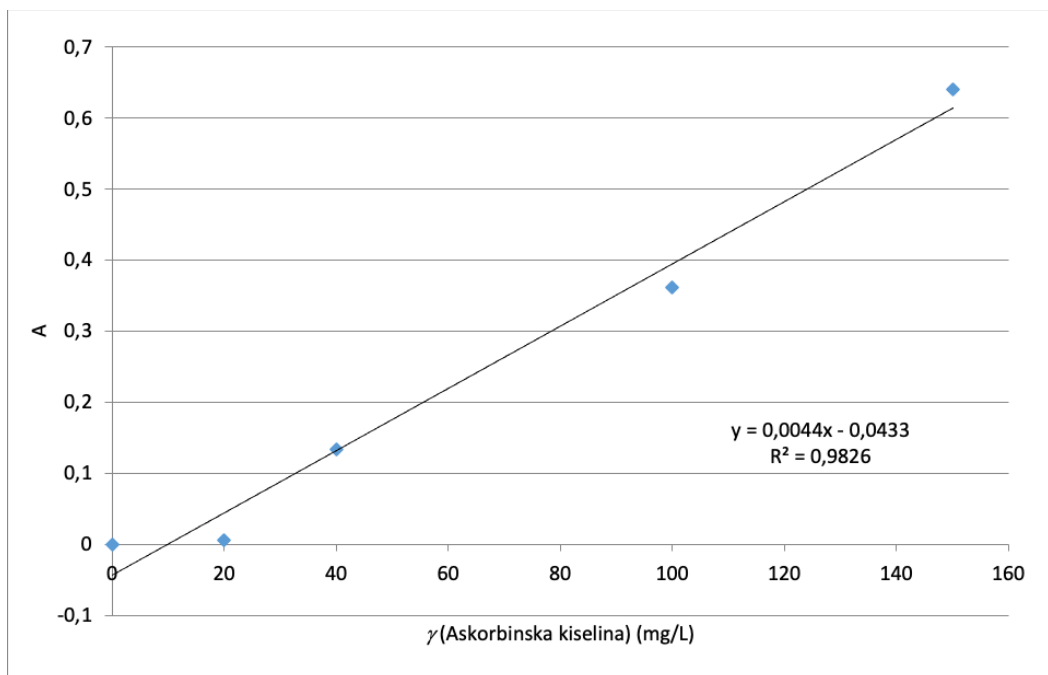
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata lista masline temelji se na mogućnosti redukcije DPPH (2,2,-difetil-1-pikrilhidrazil) radikala koji se nalazi u metalnoj otopini u kojoj dolazi do sparivanja nesparenog elektrona. DPPH predstavlja stabilan dušikov radikal koji stvara tamnoljubičasto obojenje. Reakcija se odvija promjenom boje iz ljubičaste u žutu te se prati pomoću spektrofotometrijske metode i to kao pad apsorbancije pri 517 nm (Brand-Williams i sur., 1995).

3.2.7.1. Izrada baždarnog dijagrama

Za konstrukciju baždarnog dijagrama askorbinske kiseline, koja se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti pripremljena je standardna otopina askorbinske kiseline ($\gamma = 100$ mg/L). od koje je pripremljen niz standardnih otopina askorbinske kiseline, masenih koncentracija od 20, 40, 100 i 150 mg/L.

U staklenu epruvetu se otpipetira 100 μ L pojedinačnih standardnih otopina, 3,9 mL 0,0094 mM otopine DPPH te se sadržaj u epruveti homogenizira. Slijepa proba je pripremljena na način da je u 100 μ L metanola dodano 3,9 mL 0,0094 mM otopine DPPH. Uzorci su ostavljeni na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 30 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm pomoću spektrofotometra. Dobivenim izmjerenim vrijednostima apsorbancija i izračunatih masenih koncentracija askorbinske kiseline nacrtana se baždarni dijagram (slika 10) i izračuna jednadžba pravca pomoću Microsoft Excel programa. Rezultati određene antioksidacijske aktivnosti su izraženi kao ekvivalent askorbinske (mg AAE/ g suhog lista masline).



Slika 10. Baždarni dijagram askorbinske kiseline

Jednadžba 6 predstavlja jednadžbu baždarnog askorbinske kiseline:

$$y = 0,0044x - 0,0433$$

[8]

y - apsorbancija uzorka pri 517 nm

x - masena koncentraciju askorbinske kiseline izražena u mg/L.

3.2.7.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

U staklenu epruvetu se otpipetira 100 μ L, prethodno 5 puta razrijeđenog ekstrakta lista masline, 3,9 mL 0,0094 mM otopine DPPH te se sadržaj u epruveti homogenizira. Slijepa proba je pripremljena na način da je u 100 μ L metanola dodano 3,9 mL 0,0094 mM otopine DPPH. Uzorci su ostavljeni na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 30 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm pomoću spektrofotometra. Rezultati određene antioksidacijske aktivnosti su izraženi kao ekvivalent askorbinske kiseline (mg AAE/ g suhog lista masline).

4.REZULTATI I RASPRAVA

List masline kao agroindustrijski otpad zbog svog kemijskog sastava i visokog udjela biološki aktivnih spojeva predstavlja dobru sirovinu za pripremu ekstrakta lista masline i njegovu potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji. U ovom radu je istražena mogućnost ekstrakcije lista masline ekološki prihvatljivom metodom kao što je enzimski potpomognuta ekstrakcija enzimom celulaza zbog visokog udjela prirodno zastupljene celuloze u listu masline. U tu svrhu, gravimetrijskom metodom je određen maseni udio celuloze u listu masline. List masline je ekstrahiran enzimom potpomognutom ekstrakcijom primjenom pročišćene vode te limunskog pufera (pH = 5), dodatkom enzima maseno-volumnih udjela 0,5; 1; 1,5; 2 i 2,5 % (w/v) što odgovara jakosti enzima celulaze (10, 20, 30, 40 i 50 U/mg) pri optimalnim uvjetima enzimske aktivnosti na temperaturi pri 50 °C kroz 2 sata. Rađena je i negativna kontrola, ekstrakcija pri istim procesnim parametrima, ali bez dodatka enzima u svrhu procjene enzimske aktivnosti celulaze. Također, spektrofotometrijski DNSA metodom je određena aktivnost primijenjenog enzima celulaze, jakosti enzima (10 – 50 U/mg) te su rezultati prikazani u tablici 1. U dobivenim ekstraktima lista masline su spektrofotometrijskim metodama određeni: ukupni šećeri (tablica 2), ukupni fenoli (tablica 3) i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom (tablica 4). Na temelju dobivenih rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih šećera, ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u listu masline procijenit će se učinkovitost enzimom potpomognute ekstrakcije enzimom celulaze na ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih šećera i ukupnih fenola iz lista masline.

4.1. Udio celuloze u listu masline

Prethodno je pokazano da je list masline kvalitetan lignocelulozni materijal (Romero-García i sur, 2014). Lignoceluloza je složena struktura sastavljena od polimera ugljikohidrata (celuloza, hemiceluloza) i aromatskog polimera (lignina). Celuloza je najzastupljenija od navedenih lignoceluloznih spojeva, stoga je poznavanje kvantitativnog sastava lišća i udjela celuloze neophodno za enzimski tretman lista masline, posebice enzimom celulaza kako bi se učinila efikasna ekstrakcija fenolnih spojeva. U listu masline gravimetrijski je određen masni udio celuloze od 20,976 %. S obzirom na visoki udio celuloze, list masline predstavlja dobar potencijalan supstrat za enzim celulaza. U prethodnim istraživanjima, pokazano je da udio celuloze u listu ovisi o sorti, tako je u španjolskoj sorti Picuval izmjeren maseni udio od 15,85 %

(del Mar Contreras i sur., 2019), dok je drugim istraživanjem primjenom kiselinske hidrolize lista masline određen maseni udio od 21,5 % i 20,4 % (Schiavi i sur., 2022).

4.2. Enzimska aktivnost celulaze

Za uspješnost enzimom potpomognute ekstrakcije bitni su procesni parametri ekstrakcije i aktivnost enzima te je važno ekstrakciju provesti pri optimalnim uvjetima aktivnosti enzima.

U tablici 1 prikazani su rezultati određene enzimске aktivnosti celulaze DNSA metodom pri odabranim procesnim parametrima enzimom potpomognute ekstrakcije. Ispitana je enzimska aktivnost pri najmanjem maseno-volumnom udjelu celulaze (0,5 %, w/v) i najvećem (2,5 %, w/v) u limunskom puferu i pročišćenoj vodi pri optimalnim procesnim parametrima. Limunski pufer (pH = 5) je odabran s obzirom na to da celulaze mikrobnog podrijetla imaju optimalnu aktivnost u rasponu od 4,2 do 5,8, dok je optimalna temperatura za katalitičku aktivnost samog enzima između 50 i 55 °C (Padro i Forchiassin, 1999). S obzirom da na enzimsku aktivnost utječu vrijeme ekstrakcije i temperatura, navedeni procesni parametri su odabrani u skladu s istraživanjem (Dent i sur. 2023). Odabrani su slijedeći uvjeti ekstrakcije: temperatura pri 50 °C i vrijeme ekstrakcije od 2 sata. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da primjenom limunskog pufera (pH = 5) je postignuta zadovoljavajuća enzimska aktivnost već pri najmanjem maseno-volumnom udjelu celulaze (0,5 %, w/v) te je iznosila 8,303 U/mL, dok s najvećim maseno-volumnim udjelom enzima (2,5 %, w/v) je iznosila znatno više (14,775 U/mL). U pročišćenoj vodi kao primijenjenom otapalu, aktivnost celulaze je nešto manja što je i očekivano jer optimalnu aktivnost celulaza postiže pri nižim pH vrijednostima otopine. Enzimska aktivnost celulaze u pročišćenoj vodi maseno-volumnog udjela celulaze (0,5 %, w/v) je iznosila 5,220 U/mg, dok je maseno-volumnim udjelom enzima u vodi (2,5 %, w/v) aktivnost celulaze nešto viša i iznosi 6,247 U/mL. Ovisno o izvoru enzima celulaza, prethodno je pokazano da celulaza proizvedena od plijesni *A. furnigatus* pokazuje ukupnu celulaznu aktivnost u vrijednosti 1,02 U/mL kada koristi za supstrat rižinu slamu, dok za pšeničnu slamu ta aktivnosti za enzim celulazu iz *A. heteromorphus* iznosi 3,2 U/mL.

Tablica 1. Enzimaska aktivnost celulaza u pročišćenju vodi i limunskom puferu (pH = 5)

Otapalo	w (enzim)/(%)	Enzimaska aktivnost/(U/mL)
Pročišćena voda	0,5	5,220
	2,5	6,247
Limunski pufer	0,5	8,303
	2,5	14,775

Povećanjem maseno-volumnog udjela enzima u otopini dolazi i do povećanja enzimske aktivnosti celulaze, gdje je skok u povećanju aktivnosti, odnosno koncentracije produkta značajno vidljiviji u limunskom puferu. Povećanjem koncentracije enzima dolazi do veće proizvodnje glukoze, tj. veći broj enzima celulaza pospješuje hidroliziraju glikozidne veze u celulozi dajući veći broj jedinica glukoze. Poznavajući enzimsku kinetiku, koncentracija slobodnog enzima je proporcionalna s katalitičkom učinkovitošću i brzinom konverzije supstrata u produkt. Međutim, posljedica prevelike koncentracije supstrata može kao posljedicu nositi inhibiciju enzima supstratom ili produktom reakcije. Monosaharidi koji nastaju kao posljedica hidrolize celuloze imaju nekompetitivni inhibitorski učinak na celulaze, gdje njihova prisutnost remeti hidrataciju aktivnog mjesta, čime utječe na hidrolitičku aktivnost enzima (Hsieh i sur., 2014).

4.3. Ukupni šećeri u listu masline

Maseni udjeli ukupnih šećera u ekstraktima lista masline određeni su spektrofotometrijski Folin - Ciocalteu metodom i prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Maseni udio ukupnih šećera u listu masline u ispitanim otapalima

Otpalo	w(enzim)/(%)	w(ukupni šećeri)/(%) ± S.D.
Pročišćena voda	0	7,406 ± 0,094
	0,5	8,122 ± 1,224
	1	9,225 ± 0,650
	1,5	9,921 ± 2,350
	2	11,669 ± 1,806
	2,5	11,616 ± 0,003
Limunski pufer	0	2,749 ± 0,147
	0,5	5,850 ± 1,109
	1	6,214 ± 0,427
	1,5	6,812 ± 0,598
	2	6,292 ± 0,268
	2,5	9,582 ± 0,004

U tablici 2 su prikazani rezultati spektrofotometrijskog određivanja masenog udjela ukupnih šećera u ekstraktima lista masline dobivenih enzimom potpomognutom ekstrakcijom uz dodatak enzima celulaze maseno-volumnih udjela od 0,5 do 2,5 % (w/v) što odgovara jakosti celulaze od 10 do 50 U/mL u pročišćenoj vodi i limunskom puferu. Maseni udio ukupnih šećera ekstrahiran u vodi se kretao od 7,406 do 11,669 %, a u limunskom puferu od 2,749 do 9,582 %.

Također, rađene su i negativne kontrole, odnosno ekstrakcija pri istim procesnim parametrima, ali bez dodatka enzima kako bi se mogao procijeniti utjecaj enzima celulaze na izolaciju ukupnih šećera iz lista masline. U ekstraktima dobivenim bez enzima su maseni udjeli ukupnih šećera niži nego primjenom enzima. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da su dobiveni veći maseni udjeli ukupnih šećera iz lista masline primjenom pročišćene vode nego limunskog pufera. Povećanjem maseno-volumnog udjela celulaze od 0,5 do 2,5 % (w/v) u pročišćenoj vodi i limunskom puferu raste maseni udio izoliranih šećera pa se može zaključiti da primjenom većih udjela celulaze se postiže bolji ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih šećera iz lista masline. Najbolja učinkovitost ekstrakcije ukupnih šećera iz lista masline postignuta enzimom potpomognutom ekstrakcijom uz dodatak celulaze u pročišćenoj vodi od 2 % (w/v) (11,669 %) i od 2,5 % (w/v) (11,616 %). Primjenom limunskog pufera uz dodatak celulaze do 2,5 % (w/v) izoliran je maksimalni udio ukupnih šećera od 9,582 %, dok primjenom nižih maseno-volumnih udjela celulaze su i maseni udjeli ukupnih šećera niži. Iz prikazanih rezultata se može zaključiti da na izolaciju ukupnih šećera iz lista masline ima utjecaj maseni udio celulaze u otapalu, s višim maseno-volumnim udjelima celulaze su postignuti viši prinosi. Usporedimo li primijenjeno otapalo, pročišćenom vodom su izolirani veći udjeli ukupnih šećera nego primjenom limunskog pufera. Voda je obično bolje otapalo za ekstrakciju šećera općenito zbog njihove velike topivosti u istima. Upravo je to vidljivo i u rezultatima ekstrakcije bez enzima celulaza, gdje je postignuta učinkovitost ekstrakcije 7,406 % u vodi, dok je u limunskom puferu 2,749 %.

U listu masline najzastupljeniji šećer je manitol, čiji maseni udio iznosi između 1,58 % i 2,23 % (Ramirez i sur., 2022). Manitol je posebno zanimljiv zbog svog potencijala u prehrambenoj industriji kao funkcionalni zaslađivač, čime list masline postaje obećavajući izvor ovog biološki aktivnog spoja. Uz manitol, u listu masline prisutni su u značajnijim koncentracijama saharoza (0,50 %), glukoza (0,59 %) i fruktoza (0,38 %), ali udio šećera u listu najprije ovisi o vremenu berbe, sorti i klimatskom području u kojem se nalazi sama biljka (Medina i sur., 2019).

Vidljivo je da u usporedbi s literaturnim navodima u kojima su određeni ukupni šećeri HPLC metodom, u ovom radu maseni udio šećera je veći u dobivenim ekstraktima. Veće vrijednosti se mogu objasniti s reakcijom koju provodi enzim celulaza, čiji produkt djelovanja jesu šećeri. Dakle, hidrolitičkom aktivnošću enzima celulaza dolazi do cijepanja β -1,4 glikozidne veze, te se kao produkt otpušta glukoza. Porastom koncentracije enzima, dolazi do hidrolize većeg broja veza unutar celuloze, te posljedično nastaje i veća količina šećera koji se ekstrahiraju u otapalo (Jayasekara i Ratnayake, 2018).

Vidljivo je u sustavima s oba otapala, da porastom maseno-volumnih udjela enzima dolazi i do povećanog masenog udjela ukupnih šećera u ekstraktu što potvrđuje potencijal primjene enzimske ekstrakcije u svrhu izolacije šećera iz lista masline. Možemo zaključiti da, enzimskom ekstrakcijom celulazom masenog udjela 2 i 2,5 % (w/v) u pročišćenoj vodi se postižu znatno veći maseni udjeli izoliranih ukupnih šećera iz lista masline nego primjenom limunskog pufera ili ekstrakcije bez dodatka enzima. Stoga, enzimska ekstrakcija može poslužiti kao nova, „zelena“ metoda za dobivanje visoko kvalitetnih ekstrakta u pogledu njihova iskorištenja, ali također, i nutritivnih i funkcionalnih svojstava.

4.4. Ukupni fenoli u listu masline

Rezultati određenih masenih udjela ukupnih fenola u ekstraktu lista masline dobivenih enzimom potpomognutom ekstrakcijom maseno-volumnih udjela celulaze od 0,5 do 2,5 % (w/v) što odgovara jakosti celulaze od 10 do 50 U/mL prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Maseni udio ukupnih fenola u listu masline u ispitanim otapalima

Otapalo	w (enzim)/(%)	w(ukupni fenoli)/(mg GAE/100 g) ± S.D.
Pročišćena voda	0	713,276 ± 23,406
	0,5	1125,653 ± 38,299
	1	1166,162 ± 71,704
	1,5	1191,445 ± 73,092
	2	1071,312 ± 4,228
	2,5	892,991 ± 0,442
Limunski pufer	0	696,338 ± 48,650
	0,5	1205,949 ± 0,085
	1	1226,958 ± 48,481
	1,5	1261,869 ± 0,535
	2	1086,766 ± 0,115

	2,5	1287,017 ± 0,500
--	-----	------------------

U tablici 3 vidljivo je da različiti maseni udjeli enzima mogu imati utjecaj na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva iz lista masline. Masni udjeli ukupnih fenolnih spojeva ekstrahiranih enzimom potpomognutom ekstrakcijom celulazom maseno-volumnih udjela od 0,5 do 2,5 % (w/v) u pročišćenoj vodi kreću se od 713,276 do 1191,445 mg/GAE 100 g suhog lista masline, dok u limunskom puferu od 696,338 do 1287,017 mg GAE/100 g suhog lista masline. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da su maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva ekstrahiranih enzimom potpomognutom ekstrakcijom maseno-volumnih udjela celulaze od 0,5 % (w/v) značajno viši nego primjenom istog ekstrakcijskog postupka bez dodatka enzima bez obzira na primijenjeno otapalo, pročišćenu vodu ili limunski pufer. Iako je najveći maseni udio ukupnih fenola dobiven primjenom limunskog pufera maseno-volumnog udjela celulaze od 2,5 % (w/v) (1287,017 mg GAE/100 g suhog lista), značajni porast masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva postignut je već pri maseno-volumnom udjelu enzima od 0,5 % (w/v) u limunskom puferu (1205 mg GAE/100 g suhog lista) u odnosu na ekstrakciju bez enzima (696 mg GAE/100 g suhog lista). Primjenom pročišćene vode, uočen je sličan trend, naime već pri maseno-volumnom udjelu celulaze od 0,5 % (w/v) maseni udio ukupnih fenola iznosi 1125 mg GAE/100 g suhog lista u odnosu na ekstrakciju bez enzima 713 mg GAE/100 g suhog lista. Ono što je uočljivo jest da u vodenom mediju prilikom enzimske ekstrakcije lista masline dolazi do porasta masenog udjela ukupnih fenola u ekstraktu s povećavanjem maseno-volumnog udjela enzima od 0,5 do 1,5 % (w/v) (do 1191,445 mg GAE /100 g). Daljnjim povećanjem maseno-volumnih udjela celulaze u pročišćenoj vodi (1,5 – 2,5 %) ne postiže se veći ekstrakcijski kapacitet izolacije fenola iz lista masline. Takav trend nije vidljiv ekstrakcijom ukupnih fenolnih spojeva u limunskom puferu. Ipak, najveći maseni udio ukupnih fenola je ekstrahiran u limunskom puferu s maseno-volumnim udjelom enzima celulaza od 2,5 % (w/v). Dakle, može se zaključiti da primjenom limunskog pufera (pH = 5) se postižu veći prinosi ukupnih fenola iz lista masline nego primjenom pročišćene vode, čemu pridonosi pH vrijednost otopine koja je optimalna za hidrolitičku aktivnost enzima celulaza. Još jedan od razloga zašto je veći prinos fenola u limunskom puferu jest sposobnosti održavanja stabilnih pH uvjeta, koji su ključni za optimalnu aktivnost enzima uključenih u ekstrakciju fenola. Fenolni spojevi sami po sebi mogu inhibirati aktivnost enzima. Njihova inhibicija enzima često se ostvaruje putem vezivanja za aktivna mjesta enzima ili promjenom konformacije enzima, čime se smanjuje aktivnost. Na primer, fenolni spojevi kao što su flavonoidi mogu se vezati za specifične aminokiseline unutar enzima, ometajući tako vezivanje supstrata i inhibirajući katalitičku aktivnost enzima. Također, fenolni

spojevi mogu formirati stabilne komplekse sa metalnim ionima koji su esencijalni za funkciju određenih enzima, čime dodatno sprečavaju njihovu aktivnost (Yun Bae i sur., 2022). Pufferi, s druge strane, mogu djelomično neutralizirati ovu inhibiciju održavanjem optimalnih uvjeta za enzimsku aktivnost i pružajući zaštitnu ulogu strukturi enzima.

Pufferi također mogu spriječiti denaturaciju enzima i omogućiti bolju topivost fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Nadalje, dodatkom enzima od 1,5 % se postiže zadovoljavajući ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenolnih spojeva iz lista masline (1261,869 mg GAE/100 g). Povećanjem na 2,5 % maseni udio ukupnih fenola je tek nešto viši (1287,017 mg GAE/100 g). Primjenom pročišćene vode kao ekstrakcijskog otapala maksimalni ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenolnih spojeva je postignut uz dodatak enzima (1,5 %, w/v) i iznosi 1191,445 mg GAE/100 g.

Pregledom literature, ekstrakcijom lista masline različitim otapalima (metanol, etanol, voda, aceton) određeni su maseni udjeli ukupnih fenola u suhoj tvari od 1652 mg do 2493 mg GAE/100 g, od kojih je vodeni ekstrakt sadržavao najmanju količinu fenolnih spojeva (Abaza i sur., 2011). Dobivene vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva izoliranih primjenom organskih otapala su nešto više u odnosu na naše dobivene rezultate. S obzirom na jednostavnost izvedbe ekstrakcije potpomognute enzimima i primjenu ekološki prihvatljivih otapala (pročišćene vode i limunskog pufera) uz dodataka enzima, u budućnosti bi se mogle ispitati primjene većih koncentracija enzima ili dodatne prilagodbe pH vrijednosti kako bi se povećao ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz lista masline. Također, povećanje iskorištenja ekstrakcije fenolnih spojeva potencijalno bi se moglo unaprijediti uporabom i drugih suvremenih metoda u kombinaciji s enzimskom ekstrakcijom. Potvrđena je izvedivost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) i enzimске ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAEE) za izdvajanje fenolnih spojeva iz koštica i lišća masline. Utvrđeno je da primjenom MAE na 60 °C tijekom 30 minuta, ekstrakti dobiveni iz lista masline imali udio fenola od 2800 mg GAE/100 g, dok je prilikom korištenja MAEE pri 60 °C kroz 30 minuta, udio fenola je iznosio 2952 mg GAE/100 g (Chanioti i sur., 2016).

Možemo zaključiti da primjena enzimom potpomognute ekstrakcije pri optimalnom pH = 5 u limunskom puferu uz dodatak celulaze, maseno-volumnog udjela (0,5 %, w/v) doprinosi većem ekstrakcijskom kapacitetu izolacije ukupnih fenola iz lista masline u odnosu na ekstrakciju bez enzima, ali i primjenu pročišćene vode kao ekstrakcijskog otapala. Ipak, provedbom ekstrakcije potpomognute enzimom celulaza maseno-volumnog udjela od 1,5 % do 2,5 % postiže se veći

ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenolnih spojeva iz lista masline, naročito primjenom limunskog pufera, dok u pročišćenoj vodi su udjeli nešto niži. Povećanjem maseno-volumnih udjela celulaze do 2,5 % u pročišćenoj vodi nije došlo do značajnog porasta izolacije fenolnih spojeva iz lista masline.

4.5. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata lista masline

U tablici 4 su prikazani rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lista masline dobivenih enzimom potpomognutom ekstrakcijom maseno-volumnih udjela celulaze od 0,5 do 2,5 % (w/v) u pročišćenoj vodi te limunskom puferu. Prikazani rezultati prikazuju kako maseni udio enzima celulaza i odabir otapala utječe na antioksidacijski kapacitet biološki aktivnih komponenti u listu masline.

Tablica 4. Rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lista masline u različitim otapalima dobivena DPPH metodom

Otapalo	w (enzim) / (%)	DPPH / (mg AAE/100 g) ± S.D.
Pročišćena voda	0	466,416 ± 2,399
	0,5	500,474 ± 0,618
	1	590,858 ± 0,584
	1,5	511,478 ± 1,083
	2	910,460 ± 0,161
	2,5	842,252 ± 2,895
Limunski pufer	0	613,587 ± 0,065
	0,5	610,785 ± 13,298
	1	863,242 ± 0,061
	1,5	826,150 ± 2,559
	2	847,865 ± 0,0899

	2,5	1023,054 ± 0,398
--	-----	------------------

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lista masline kreću se u rasponu od 466,416 mg AAE/100 g kod vodenog ekstrakta bez enzima do 910,460 mg AAE/100 g maseno-volumnog udjela enzima celulaza od 2 %, (w/v). Antioksidacijska aktivnost lista masline u limunskom puferu se kreće od 613,587 mg AAE/100 g bez enzima do 1023,054 mg AAE/100 g kod ekstrakta u limunskom puferu maseno-volumnog udjela celulaze od 2,5 %, (w/v). Vodeni ekstrakti pokazuju nižu antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte u limunskom puferu, što je u skladu s rezultatima određenih masenih udjela ukupnih fenola. Dobiveni rezultat može se objasniti razlikom u topljivosti biološki aktivnih spojeva u vodi i limunskom puferu, te potencijalnom inhibicijom enzima celulaza pod djelovanjem fenola. Također, pojedini fenolni spojevi snažno reagiraju prema Folin-Ciocalteu reagensu, ali ne reagiraju prema DPPH radikalima, čime se mogu objasniti niže vrijednosti DPPH u odnosu na očekivane s obzirom na udio fenola (Yang i sur., 2007). Također, osim fenola postoje i druge biološki aktivne tvari s antioksidacijskim djelovanjem u listu masline među kojima su flavonoidi, iridoidi, hidroksicimetne kiseline, terpenke kiseline, kumarini i dr. U strukturi spojeva koji su značajni za antioksidacijsku aktivnost fenola, hidroksilne grupe imaju najveći značaj. Utvrđeno je da položaj hidroksilnih skupine ima veći učinak na aktivnost nego njihov broj. Hidroksilne skupine utječu na antioksidativnu aktivnost kinetičkim ili termodinamičkim svojstvima: kao izvori vodikovih atoma potrebnih za neutralizaciju slobodnih radikala i mogućnošću povećanja stabilnosti radikala flavonoida otpuštanjem još jednog vodikovog atoma iz druge hidroksilne grupe. Različiti fenolni spojevi imaju različite odgovore u antioksidacijskim testovima. Razlike u antioksidativnom kapacitetu fenola mogu biti posljedica različitog sadržaja i različite reaktivnosti prisutnih spojeva u ekstraktima (Espinoza i sar., 2009).

Rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lista masline u limunskom puferu pokazuju sličan trend kao i rezultati masenih udjela ukupnih fenola – porastom masenog udjela enzima celulaze prilikom postupka ekstrakcije, dolazi i do porasta antioksidacijske aktivnosti, što se objašnjava većom količinom biološki aktivnih komponenti koje su ekstrahirane. Također, usporedbom antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata i u puferu, uočava se da ekstrakti u limunskom puferu imaju uglavnom veće vrijednosti u odnosu na vodene ekstrakte, što se slaže s rezultatima određenih masenih udjela ukupnih fenola, kojima se pripisuje dio antioksidativnog kapaciteta. Pregledom literature, u listu masline je potvrđena antioksidacijska aktivnost ABTS metodom u etanolnim ekstraktima sorti Negrinha do Freixo i Cornicarba, određena je antioksidativna aktivnost od 26,76 mg AAE/g, odnosno 17,79 mg AAE/g. DPPH metodom, dobiveni su slični rezultati u

ekstraktima lista masline (84,21 mg TE/g, odnosno 14,46 mg TE/g) (Oleviera i sur., 2021). Dakle, u našim ekstraktima su određene nešto više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lista masline, što se svakako može pripisati i primjeni ekstrakcijskog postupka i procesnih parametara. Na biološka svojstva i antioksidativna svojstva ekstrakta lista masline utječu brojni čimbenici. Kako bi se točno odredilo koji su čimbenici razlika između antioksidativne aktivnosti potrebno je provesti dodatna istraživanja kemijskog sastava i biološki aktivnih komponenti lista. Iako je DPPH metoda široko korištena i efikasna za određivanje antioksidacijske aktivnosti zbog svoje jednostavnosti i brzine, ona ne pruža potpuni uvid u sve aspekte antioksidacijskog kapaciteta uzorka. Za točniju procjenu dobivenih rezultata svakako bi bilo poželjno provesti barem još jedan postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom neke druge metode.

5. ZAKLJUČCI

1. Korišteni komercijalni enzim celulaza pokazuje zadovoljavajuću enzimsku aktivnost već pri maseno-volumnim udjelima celulaze od 0,5 i 2,5 %, (w/v) u pročišćenoj vodi (5,220 U/mL i 6,247 U/mL) te limunskom puferu (8,303 U/mL i 14,775 U/mL) pri odabranim procesnim parametrima enzimom potpomognute ekstrakcije (pri 50 °C kroz 2 sata).

2. Najveći maseni udio ukupnih šećera postignut je enzimskom ekstrakcijom uz dodatak celulaze od 2 % (w/v) u pročišćenoj vodi (11,669 %), što je više nego kod limunskog pufera s istim udjelom enzima (9,582 %).

3. Najveći maseni udio ukupnih fenola (1287,017 mg GAE/100 g) dobiven je enzimskom ekstrakcijom uz dodatak celulaze od 2,5 % (w/v) u limunskom puferu, dok je u pročišćenoj vodi s 1,5 % (w/v) celulaze maseni udio ukupnih fenola 1191,445 mg GAE/100 g.

4. Ekstrakt lista masline ekstrahiran enzimom potpomognutom ekstrakcijom, maseno-volumnog udjela celulaze od 2,5 % (w/v) u limunskom puferu imao je najveću antioksidacijsku aktivnost (1023,054 mg AAE/100 g). Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima ukupnih fenola, jer veći udio fenola, doprinosi većoj antioksidacijskoj aktivnosti.

5. Primjena enzimom potpomognute ekstrakcije enzimom celulaze maseno-volumnih udjela od 0,5 do 2,5 % (w/v) u limunskom puferu i pročišćenoj vodi primjenom optimalnih procesnih parametara iz lista masline omogućuje dobivanje ekstrakata s visokim masenim udjelom ukupnih šećera, ukupnih fenola s dokazanom antioksidacijskom aktivnošću. Ovakvi rezultati pokazuju potencijal primjene enzima celulaze u enzimskoj ekstrakciji kao „zelene metode“ za poboljšanje prinosa i kvalitete biološki aktivnih spojeva u ekstraktima.

6. LITERATURA

Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M (2015) Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants* **4**, 682 - 698., doi:10.3390/antiox4040682

Acar-Tek N, Ağagündüz D (2020) Olive Leaf (*Olea europaea* L. folium): Potential Effects on Glycemia and Lipidemia. *Ann Nutr Metab* **76**, 10 – 15, doi:10.1159/000505508.

Akyüz A, Ersus S (2021) Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production. *Food Chem* **335**, 127673, doi:10.1016/j.foodchem.2020.127673.

Artajo LS, Romero MP, Morelló JR, Motilva MJ (2006) Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *J Agric Food Chem* **54**, 6079 – 6088, doi:10.1021/jf060874q.

Bahloul N, Kechaou N, Boudhrioua N (2014) Comparative investigation of minerals, chlorophylls contents, fatty acid composition and thermal profiles of olive leaves (*Olea europaea* L.) as by-product. *Grasas y Aceites* **65**, e035, doi:10.3989/gya.0102141.

Borjan D, Leitgeb M, Knez Ž, Hrnčič MK (2020) Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules* **25**, 5946, doi:10.3390/molecules25245946.

Brkan B (2011). *Maslina i maslinovo ulje: Božji dar u Hrvata*, Mavi d.o.o., Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb

Cádiz-Gurrea M de la L, Pinto D, Delerue-Matos C, Rodrigues F (2021) Olive Fruit and Leaf Wastes as Bioactive Ingredients for Cosmetics—A Preliminary Study. *Antioxid* **10**, 245, doi:10.3390/antiox10020245.

Canabarro NI, Mazutti MA, do Carmo Ferreira M (2019) Drying of olive (*Olea europaea* L.) leaves on a conveyor belt for supercritical extraction of bioactive compounds: Mathematical modeling of drying/extraction operations and analysis of extracts. *Ind Crop Prod* **136**, 140 – 151

Chanioti S, Siamandoura P, Tzia C (2016) Evaluation of Extracts Prepared from Olive Oil By-Products Using Microwave-Assisted Enzymatic Extraction: Effect of Encapsulation on the Stability of Final Products. *Waste Biomass Valori* **7**, 831 - 842. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-016-9533-1>

Da Porto A, Brosolo G, Casarsa V, Bulfone L, Scandolin L, Catena C, Sechi LA (2021) The Pivotal Role of Oleuropein in the Anti-Diabetic Action of the Mediterranean Diet: A Concise Review. *Pharm* **14**, 40, doi:10.3390/pharmaceutics14010040.

Dent M, Vujović T, Miljanović A, Jerković I, Marijanović Z, Grbin D, Rezić T (2023) Effect of xylanase addition and ultrasonic pretreatment on the yield and volatile profile of bay laurel and sage essential oil. *J Essential Oil Bear Plant* **26**, 970 – 986.

Domínguez-Rodríguez G, Marina ML, Plaza M (2021) Enzyme-assisted extraction of bioactive non-extractable polyphenols from sweet cherry (*Prunus avium* L.) pomace. *Food Chem* **339**, 128086, doi:10.1016/j.foodchem.2020.128086.

Ejaz U, Sohail M, Ghanemi A (2021) Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics* **6**, 44, doi:10.3390/biomimetics6030044.

Espeso J, Isaza A, Lee JY, Sørensen PM, Jurado P, Avena-Bustillos R de J, Olaizola M, Arbolea JC (2021) Olive Leaf Waste Management. *Front Sustain Food Syst* **5**, doi:10.3389/fsufs.2021.660582.

Ghomari O, Sounni F, Massaoudi Y, Ghanam J, Drissi Kaitouni LB, Merzouki M, Benlemlih M (2019a) Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnol Rep* **23**, e00347, doi:10.1016/j.btre.2019.e00347.

Guinda Á, Castellano JM, Santos-Lozano JM, Delgado-Hervás T, Gutiérrez-Adánez P, Rada M (2015) Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *LWT-Food Sci Technol* **64**, 431 – 43

Gupta A, Naraniwal M, Kothari V (2012) Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int J Appl Nat Sci* **1**, 8 - 26

Hamzalıoğlu A, Gökmen V (2016) Interaction between Bioactive Carbonyl Compounds and Asparagine and Impact on Acrylamide. *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*; Gökmen, V., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 355 – 376

Hashmi MA, Khan A, Hanif M, Farooq U, Perveen S (2015) Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evid Based Complement Alternat Med* **2015**, 541591, doi:10.1155/2015/541591.

Hejrati A (2020) Olive leaf and its various health-benefitting effects: a review study. *Pakistan J Med Health Sci* **14**, 1301 – 1312.

Hernández-Fernández A, Garrido Y, Iniesta-López E, Pérez de los Ríos A, Quesada-Medina J, Hernández-Fernández FJ (2023) Recovering Polyphenols in Aqueous Solutions from Olive Mill Wastewater and Olive Leaf for Biological Applications. *Processes* **11**, 2668, doi:10.3390/pr11092668.

Hsieh CC, Cannella D, Jørgensen H, Felby C, Thygesen LG (2014) Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *J Agric Food Chem* **62**, 3800 – 3805, doi:10.1021/jf5012962.

Ibrahim EH, Abdelgaleel MA, Salama AA, Metwalli SM (2016) Chemical and nutritional evaluation of olive leaves and selection the optimum conditions for extraction their phenolic compounds. *J Agric Res* **42**, 445 - 459. doi: 10.21608/JSAS.2016.2850

Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A (2009) Pentacyclic triterpene distribution in various plants—rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* **14**, 2016 – 2031, doi <https://doi.org/10.3390/molecules14062016>

Jayasekara, Sandhya & Ratnayake, Renuka (2019) Microbial Cellulases: An Overview and Applications. 10.5772/intechopen.84531.

Khalil M, Rita Caponio G, Diab F, Shanmugam H, Di Ciaula A, Khalifeh H, Vergani L, Calasso M, De Angelis M, Portincasa P (2022) Unraveling the beneficial effects of herbal Lebanese mixture “Za’atar”. History, studies, and properties of a potential healthy food ingredient. *J Funct Foods* **90**, 104993, doi:10.1016/j.jff.2022.104993.

Khemakhem I, Fuentes A, Lerma-García MJ, Ayadi MA, Bouaziz M, Barat JM (2019) Olive leaf extracts for shelf life extension of salmon burgers. *Food Sci Technol Int* **25**, 91 – 100, doi:10.1177/1082013218795816.

Lalas S, Athanasiadis V, Gortzi O, Bounitsi M, Giovanoudis I, Tsaknis J, Bogiatzis F (2011) Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chem* **127**, 1521 – 1525, doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.009.

Lama-Muñoz A, Del Mar Contreras M, Espínola F, Moya M, Romero I, Castro E (2020) Characterization of the lignocellulosic and sugars composition of different olive leaves cultivars. *Food Chem* **329**, 127153, doi:10.1016/j.foodchem.2020.127153.

Lee ok-hwan, Lee H-B, Lee J, Son J-Y, Rhee S-K, Kim H-D, Kim Y-C, Lee B-Y (2005) Chemical Properties of Olive and Bay Leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **34** doi:10.3746/jkfn.2005.34.4.503.

Liu H, Zhao A, Huang Y, Hou A, Miao W, Hong L, Deng N, Fan Y (2022) Efficacy and Mechanisms of Oleuropein in Postmenopausal Osteoporosis. *Comput Math Methods Med* **2022**, 9767113, doi:10.1155/2022/9767113.

M'hiri N, Ioannou I, Ghouli M, Boudhrioua NM (2014) Extraction Methods of Citrus Peel Phenolic Compounds. *Food Rev Int* **30**, 265 – 290. doi:[10.1080/87559129.2014.924139](https://doi.org/10.1080/87559129.2014.924139)

Maayan I, Shaya F, Ratner K, Mani Y, Lavee S, Avidan B, Shahak Y, Ostersetzer-Biran O (2008) Photosynthetic activity during olive (*Olea europaea*) leaf development correlates with plastid biogenesis and Rubisco levels. *Physiol Plant* **134**, 547 – 558, doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01150.x.

Manzanares P, Ruiz E, Ballesteros M, Negro MJ, Gallego FJ, López-Linares JC, Castro E (2017) Residual biomass potential in olive tree cultivation and olive oil industry in Spain: valorization proposal in a biorefinery context. *Spanish J Agric Research* **15**, e0206 – e0206, doi:10.5424/sjar/2017153-10868.

Markhali FS, Teixeira JA, Rocha CMR (2020a) Olive Tree Leaves—A Source of Valuable Active Compounds. *Processes* **8**, 1177, doi:10.3390/pr8091177.

Martín-García B, Verardo V, León L, De la Rosa, R, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Gómez-Caravaca AM (2019) GC-QTOF-MS as valuable tool to evaluate the influence of

cultivar and sample time on olive leaves triterpenic components. *Food Res Int* **115**, 219 – 226, doi 10.1016/j.foodres.2018.08.085

Medina E, Romero C, García P, Brenes M (2019) Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food Funct* **10**, 4716 – 4724, doi:10.1039/C9FO00698B.

Miljković I, Gašparec Skočić Lj, Milat V, Strikić F, Oplanić M, Brkan B i sur. (2011) Maslina i maslinovo ulje: Božji dar u Hrvata, Mavi d.o.o., Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb

Mir-Cerdà A, Granados M, Saurina J, Sentellas S (2023) Green Extraction of Antioxidant Compounds from Olive Tree Leaves Based on Natural Deep Eutectic Solvents. *Antioxid* **12**, 995, doi:10.3390/antiox12050995.

Mohammadi A, Jafari SM, Esfanjani AF, Akhavan S (2016a) Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chem* **190**, 513 – 519, doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.115.

Muzzalupo I (2012) Olive Germplasm: The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy

Nediani C, Ruzzolini J, Romani A, Calorini L (2019) Oleuropein, a Bioactive Compound from *Olea europaea* L., as a Potential Preventive and Therapeutic Agent in Non-Communicable Diseases. *Antiox* **8**, 578, doi:10.3390/antiox8120578.

Oliveira NM, Lopes L, Chéu MH, Soares E, Meireles D, Machado J (2023) Updated Mineral Composition and Potential Therapeutic Properties of Different Varieties of Olive Leaves from *Olea europaea*. *Plants* **12**, 916, doi:10.3390/plants12040916.

Omar SH (2010a) Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm J* **18**, 111 – 121, doi:10.1016/j.jsps.2010.05.005.

Omar SH (2010b) Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Sci Pharm* **78**, 133 – 154, doi:10.3797/scipharm.0912-18.

Ramírez EM, Brenes M, Romero C, Medina E (2022) Chemical and Enzymatic Characterization of Leaves from Spanish Table Olive Cultivars. *Foods* **11**, 3879, doi:10.3390/foods11233879.

Rapoport HF, Fabbri A, Sebastiani L (2016) Olive Biology. In *The Olive Tree Genome*, E. Rugini, L. Baldoni, R. Muleo, and L. Sebastiani, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 13 – 25.

Robinson PK (2015). *Enzymes: principles and biotechnological applications*. *Essays Biochem.* **59**: 1-41. 41. Bisswanger, H. (2014). *Enzyme assays Perspect Sci* **1**, 41 - 55. doi: 10.1042/bse0590001

Romero C, Medina E, Mateo MA, Brenes M (2017) Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit. *J Sci Food Agric* **97**, 1725 – 1732, doi:10.1002/jsfa.7920.

Romero-García JM, Lama-Muñoz A, Rodríguez-Gutiérrez G, Moya M, Ruiz E, Fernández-Bolaños J, Castro E (2016) Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. *Food Chem* **210**, 457 – 465, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.003.

Sahin S, Malik NSA, Perez JLA, Brockington JE (2012) Seasonal changes of individual phenolic compounds in leaves of twenty olive cultivars grown in Texas, *J Agric Sci Technol* **2**, 242 – 247.

Sarbishegi M, Mehraein F, Soleimani M (2014) Antioxidant role of oleuropein on midbrain and dopaminergic neurons of substantia nigra in aged rats. *Iran Biomed J* **18**, 16 – 22, doi:10.6091/ibj.1274.2013.

Schiavi D, Francesconi S, Taddei AR, Fortunati E, Balestra GM (2022) Exploring cellulose nanocrystals obtained from olive tree wastes as sustainable crop protection tool against bacterial diseases. *Sci Rep* **12**, 6149, doi:10.1038/s41598-022-10225-9.

Seaf Elnasr TA, Ibrahim OM, Alhumaimess MS, Alsohaimi IH, El-Ossaily YA, Hussein MF, Rafea MohamedA, Hassan HMA, Sobhy SE, Hafez EE, El-Aassar MohamedR (2024) Olive leaf extract-derived chitosan-metal nanocomposite: Green synthesis and dual antimicrobial-anticancer action. *Int J Biol Macromol* **270**, 132252, doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.132252.

Selim S, Albqmi M, Al-Sanea MM, Alnusaire TS, Almuhayawi MS, AbdElgawad H, Al Jaouni SK, Elkelish A, Hussein S, Warrad M, El-Saadony MT (2022) Valorizing the usage of olive leaves, bioactive compounds, biological activities, and food applications: A comprehensive review. *Front Nutr* **9**, 1008349, doi:10.3389/fnut.2022.1008349.

Sheldon RA, van Pelt S (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem Soc Rev* **42**, 6223 – 6235. doi <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>

Sun W, Frost B, Liu J (2017) Oleuropein, unexpected benefits! *Oncotarget* **8**, 17409, doi:10.18632/oncotarget.15538.

Talhaoui N, Gómez-Caravaca AM, Roldán C, León, R De la Rosa L, Fernandez-Gutiérrez A, Segura- Carretero A (2015) Chemometric Analysis for the Evaluation of Phenolic Patterns in Olive Leaves from Six Cultivars at Different Growth Stages, *J Agric Food Chem* **63**, 1722 – 1729.

Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Anal Chem* **71**, 100 - 109 doi <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>

Tizón Alba A, Aliaño-González MJ, Palma M, Fernández Barbero G, Carrera C (2023b) Enhancing Efficiency of Enzymatic-Assisted Extraction Method for Evaluating Bioactive Compound Analysis in Mulberry: An Optim Approach. *Agron* **13**, 2548, doi:10.3390/agronomy13102548.

Trees CC, Clark DK, Bidigare RR, Ondrusek ME , Mueller JL (2020) Accessory pigments versus chlorophyll a concentrations within the euphotic zone: A ubiquitous relationship. *Limnol Oceanogr* **45**, 1130 – 1143, doi <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.5.1130>

Žugčić T, Abdelkebir R, Alcantara C, Collado MC, García-Pérez JV, Meléndez-Martínez AJ, Režek Jambrak A, Lorenzo JM, Barba FJ (2019) From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. *Trends in Food Sci & Tech* **83**, 63 – 77, doi:10.1016/j.tifs.2018.11.005.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Jelena Buha, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.
