

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Petra Lončarić**

6767/N

**STABILNOST NAPITKA OD LISTA MASLINE TIJEKOM  
SKLADIŠTENJA NA SOBNOJ TEMPERATURI**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno – istraživačkog projekta:** Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane

**Mentor:** Prof. dr.sc. *Branka Levaj*

**Zagreb, 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski 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 na sobnoj temperaturi**

***Petra Lončarić, 0058203560 1***

**Sažetak:** Cilj ovog rada je praćenje stabilnosti napitka od lista masline tijekom tromjesečnog skladištenja na sobnoj temperaturi određivanjem ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti, boje, senzorskih svojstava te mikrobiološke kakvoće. Ukupni fenoli su određivani Folin – Ciocalteu metodom, a antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Boja se mjerila po CIELAB sustavu, a za određivanje senzorskih svojstava provedena je kvantitativna deskriptivna analiza. Udio ukupnih fenola u napitku kreće se od 0,276 mg GAE/mL do 0,186 mg GAE/mL, a tijekom skladištenja nije uočen jedinstveni trend promjena. Isto se odnosi i na antioksidacijsku aktivnost napitka samo se ona kretala u vrlo uskom rasponu od 0,144 – 0,149  $\mu\text{mol TAE/mL}$ . Senzorska analiza ukazuje na vrlo male promjene senzorskih svojstava napitka. Skladištenjem se povećava ukupna razlika obojenosti. Mikrobiološka analiza je pokazala prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija iznad dopuštene granice, ali stabilnost tijekom skladištenja.

**Ključne riječi:** antioksidacijska aktivnost, list masline, napitak, skladištenje, ukupni fenoli

**Rad sadrži:** 31 stranicu, 07 slika, 02 tablice, 054 literaturnih navoda, 00 priloga,

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica**

**Prehrambeno biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Branka Levaj

**Pomoć pri izradi:** Dr. sc. Maja Repajić, viša asistentica

**Datum obrane: 7. srpnja 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 room temperature**

***Petra Lončarić, 0058203560 1***

**Abstract:** The purpose of this work is to monitor the stability of olive leaf drink during three months storage at room temperature by determining total phenol content, antioxidant activity, color, sensory properties and microbiological quality. Total phenols were determined by Folin – Ciocalteu method and antioxidant activity by DPPH method. The color was measured by the CIELAB system and quantitative descriptive analysis was used to evaluate the sensory properties. The percentage of total phenol in the drink ranges from 0,276 mg GAE/mL to 0,186 mg GAE/mL and no unique change trend has been observed during storage. The same applies to the antioxidant activity of drink only in a very narrow range of 0,144 – 0,149  $\mu\text{mol TAE/mL}$ . Storage increases the overall color difference. Microbiological analysis showed the presence of aerobic mesophilic bacteria above the allowed limit, but also the stability during storage.

**Keywords:** antioxidant activity, total phenol content, drink, olive leaf, storage

**Thesis contains:** 31 pages, 07 figures, 02 tables, 054 references, 00 supplements

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Full Professor PhD, Branka Levaj

**Technical support and assistance:** Scientific Assistant PhD, Maja Repajić

**Defence date:** July 7<sup>th</sup> 2017

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Maslina ( <i>Olea europaea</i> L.).....	2
2.2. List masline – kemijski sastav.....	3
2.2.1. Fenolni spojevi lista masline.....	3
2.2.2. Oleuropein.....	4
2.3. Utjecaj na zdravlje.....	6
2.3.1. Antihipertenzivno djelovanje.....	6
2.3.2. Antioksidacijsko djelovanje.....	7
2.3.3. Kardioprotektivni učinak.....	7
2.3.4. Primjena u liječenju pretilosti.....	8
2.4. Napitak (vodeni ekstrakt) lista masline.....	9
2.4.1. Proizvodnja čaja od lista masline.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Sirovina.....	10
3.1.2. Priprema napitka od lista masline.....	10
3.1.3. Reagensi.....	11
3.1.4. Aparatura i pribor.....	11
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	12
3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	14
3.2.3. Mjerenje boje.....	16
3.2.4. Senzorska svojstva.....	17
3.2.5. Mikrobiološka analiza.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. LITERATURA.....	25

## 1. UVOD

Drvo masline (*Olea europaea L.*) je jedno od najstarijih poznatih kultiviranih biljaka. Više od 8 milijuna hektara masline se uzgaja širom svijeta, a čak 98 % otpada na područje Mediterana. Španjolska je zemlja s najvećim brojem zasađenih drva masline. Osim na Mediteranu, maslina se uzgaja u velikom broju i na Arapskom poluotoku te u Indiji i Aziji.

Glavni proizvod koji se dobiva od drva masline tj ploda je maslinovo ulje. Procijenjena svjetska proizvodnja maslinovog ulja 2014./2015. je iznosila 2,39 milijuna tona, od čega je 1,53 milijuna tona proizvedeno u Europskoj Uniji. Maslina i maslinovo ulje imaju široku primjenu u ljudskoj prehrani, kao temelj tradicionalne mediteranske prehrane.

Tijekom uzgoja drva masline ili tijekom industrijske prerade stvara se velika količina otpada. Tako i lišće masline koje predstavlja smjesu lišća i grančica koje zaostaje tijekom obrezivanja drva masline te tijekom berbe maslina. U tradicionalnoj medicini poznato je po svojoj ljekovitosti. Znanstvenim istraživanjima utvrđeno je prisustvo velikog broja fenolnih spojeva i antioksidansa u listovima masline, tako da raste interes za njegovu uporabu u hrani i dodacima prehrani. Studije na životinjama i ljudima su pokazale brojne pozitivne učinke sastojaka lista masline, poput antioksidativnog, antihipertenzivnog, antiupalnog djelovanja te hipoglikemičnog, hipokolesterolemičnog i kardioprotektivnog djelovanja. Također, može se koristiti i u liječenju pretilosti. Jedna od mogućnosti korištenja lista masline je u obliku napitka. Do sada nisu provedena istraživanja o stabilnosti pripremljenog napitka.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati stabilnost napitka od lista masline tijekom tromjesečnog skladištenja na sobnoj temperaturi određivanjem ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti, boje, senzorskih svojstava te mikrobiološke kakvoće.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MASLINA (*Olea europaea* L.)

Maslina (*Olea europaea* L.) (Slika 1.) je zimzelena biljna vrsta koja raste kao stablo do visine od 15 metara. Pripada porodici *Oleaceae*. Najznačajniji rod te porodice je *Olea*, koji ima oko 30-tak različitih vrsta i podvrsta. Jedina vrsta koja ima jestive plodove je maslina (*Olea europaea* L.). Ima veliku regenerativnu sposobnost te je vrlo prilagodljiva, a najbolje uspijeva u područjima umjerene klime.

Listovi masline su parni i nasuprotno raspoređeni po grani. Sastoje se od plojke, peteljke i drške. Lice lista je maslinasto-zeleno dok je naličje svijetlozelene boje. Oblik, boja, nazubljenost, površina lisne plojke, broj stoma i veličina lista su svojstva prema kojima se mogu determinirati pojedine sorte. Životni vijek lista masline je dvije godine, dok neki listovi mogu doživjeti i tri godine (Strikić, 2011).



Slika 1. Maslina (*Olea europaea* L.) (Anonymous 1, 2016)

## 2.2. LIST MASLINE – KEMIJSKI SASTAV

Kemijski sastav lista masline varira, što ovisi o mnogobrojnim čimbenicima poput podrijetla, uvjetima skladištenja, udjelu vlage, klimatskim uvjetima te stupnju kontaminacije tla (Martín-García i sur., 2008; Delgado-Pertiñez i sur., 2000). Najveći udio lista masline čine hemicelulozna vlakna arabinoznog tipa, dok grančice uglavnom sadrže manozu (Garcia-Maraver i sur., 2013). Osim manoze, glukoze, vlakana te drugih ugljikohidrata u listu masline prisutni su i šećerni alkoholi, polioli od kojih je najznačajniji manitol u koncentraciji od 3 % (Guinda i sur., 2015). Udio sirovih proteina varira između 9,5 % - 12,9 % (Delgado - Pertiñez i sur., 2000). Prema zastupljenosti, od aminokiselina u listu mogu se istaknuti arginin, leucin, prolin, glicin, valin te alanin, dok su siromašni na cisteinu, metioninu i lizinu (Martín - García i sur., 2003). Od esencijalnih elemenata, pronađene su visoke koncentracije klora, fosfora i kalija u mladim listovima, dok je u starijim listovima pronađena visoka koncentracija magnezija. Što se tiče elemenata u tragovima, razina kroma i cinka je veća u mladim listovima, a u starijim prevladavaju nikel i bakar jer je te elemente biljci teže izlučiti (Alcázar - Román i sur., 2014). Prisutni su i pentaciklički triterpeni, od kojih je najzastupljenija oleanolna kiselina u koncentraciji 3 – 3,5 % (Guinda i sur., 2015). Nedavna istraživanja pokazuju kako oleanolna kiselina iz prirodnog biljnog materijala inhibira proliferaciju tumorskih stanica, inducira apoptozu te prevenira angiogenezu kao i invaziju i metastaziranje tumorskih stanica (Shanmugam i sur., 2014). Slijede ju maslinska kiselina, te u manjim količinama ursolna kiselina, eritrodiol te uvaol (Guinda i sur., 2015).

List masline sadrži i vrijedan udio fenolnih spojeva.

### 2.2.1. FENOLNI SPOJEVI LISTA MASLINE

Fenolni spojevi ili polifenoli se definiraju kao sekundarni biljni metaboliti. Nosioci su karakterističnog okusa, boje, mirisa i nutritivne vrijednosti. Ubrajaju se u skupinu fitokemikalija važnih za fiziološki i morfološki razvoj biljke (Balasundram i sur., 2006). Osim toga, važni su i u prehrani ljudi zbog antioksidacijskih svojstava (Petti i sur., 2009). Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini benzenski ili aromatski prsten na koji se može vezati jedna, dvije ili više hidroksilnih –OH skupina. Fenolni spojevi masline se mogu podijeliti u dvije skupine – spojevi koji se sintetiziraju tijekom normalnog rasta i razvoja biljnih tkiva te inducirani fenolni spojevi koji se

sintetiziraju kao odgovor biljke na ozljedu ili infekciju (Talhaoui i sur., 2015). Biotički čimbenici poput starosti lišća, gljivica i bakterija te abiotički čimbenici poput saliniteta, gnojidbe, zemljopisne zone itd., kvalitativno i kvantitativno mijenjaju sastav fenolnih spojeva lista masline (Bilgin i Sahin, 2013; Di Donna i sur., 2010; Japón - Luján i sur., 2006; Markakis i sur., 2010; Papoti i Tsimidou, 2009a).

Postoji pet grupa fenolnih spojeva prisutnih u listu masline: oleuropeozidi (oleuropein i verbaskozid); flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin i diosmetin); flavonoli (rutin); flavan-3-ol (katehin) i supstituirani fenoli (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska i kavaska kiselina). Oleuropein je najrašireniji polifenol u listu masline, prate ga hidroksitirozol, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid i verbaskozid. Hidroksitirozol je prekursor oleuropeina, dok je verbaskozid konjugirani glukozid hidroksitirosola i kavske kiseline (Benavente - García i sur., 2000).

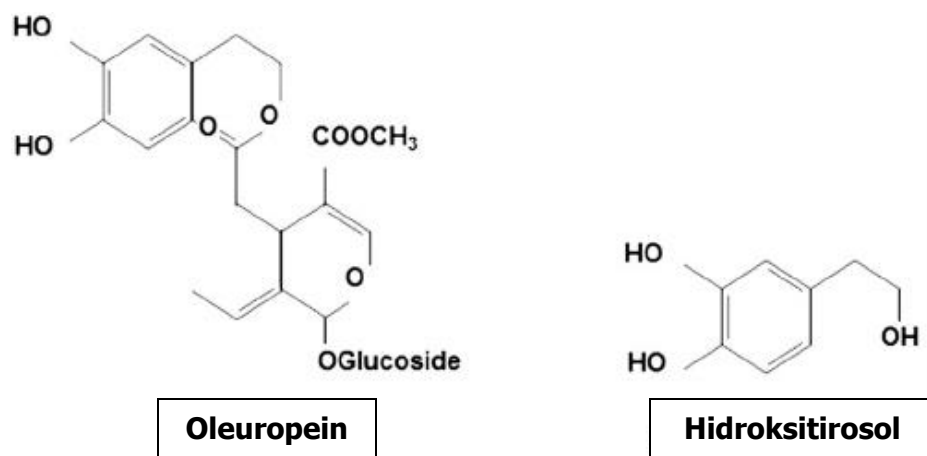
### 2.2.2. OLEUROPEIN

Oleuropein (Slika 2) je spoj odgovoran za karakterističan gorki okus neprerađene masline. Otkriven je 1908. godine od strane Bourquelot - a i Vintilesco - a (Benavente - García i sur., 2000). To je heterozidni ester elenolne kiseline i dihidroksifeniletanola (Benavente - García i sur., 2000). Prisutan je i u listu i u plodu masline, ali koncentracija je znatno veća u listu (1 – 14 %) nego u ulju (0,005-0,12 %) (Japon - Lujan i sur., 2006). Glavni produkt degradacije oleuropeina je 3,4 - dihidroksifenil etanol, poznatiji kao hidroksitirozol (Slika 2). Oleuropein je u visokim koncentracijama prisutan u neprerađenim listovima i plodovima maslina, dok je hidroksitirozol zastupljeniji u maslinovom ulju. Smanjenje koncentracije oleuropeina te povećanje koncentracije hidroksitirosola se događa kao posljedica enzimske reakcije do koje dolazi tijekom sazrijevanja masline ili tijekom procesa prerade (na primjer, proizvodnje maslinovog ulja) (Tan i sur., 2003). Antioksidacijska svojstva oleuropeina su povezana s njegovom kemijskom strukturom, gdje je polovica strukture jednaka kao i hidroksitirozol, ali je sposobnost uklanjanja ABTS<sup>•+</sup> kationskog radikala manja kod oleuropeina nego kod hidroksitirosola zbog veće molekulske mase (Vogel i sur., 2015).

Trenutno nema puno podataka koji govore o biodostupnosti fenolnih spojeva iz masline, poput oleuropeina, hidroksitirosola i tirozola. Međutim, poznato je da se oleuropein slabo apsorbira zbog njegove veličine i planarne konfiguracije. Pretpostavlja se da, obzirom da je



oleuropein glikozid, ima pristup glukoznim transporterima prisutnim na epitelnim stanicama tankog crijeva te da na taj način može ući u stanicu (El i Karakaya, 2011).



Slika 2. Kemijska struktura oleuropeina i hidroksitirosola (Anonymous 2, 2014)

## 2.3. UTJECAJ NA ZDRAVLJE

Maslinovo ulje i listovi masline imaju bogatu povijest ljekovitih svojstava. Ekstrakt maslinovog ulja je korišten kao narodni lijek za suzbijanje vrućice i drugih bolesti (Benavente – García i sur., 2000). Zdrastveni benefiti masline pripisuju se fenolnim spojevima i široko se proučavaju posljednjih desetljeća. Oleuropein, najzastupljeniji polifenol u listu masline, prevenira kardiovaskularne bolesti štiteći membrane od lipidne oksidacije (Somova i sur., 2003; Ferreira i sur., 2007), uzrokuje vazodilataciju, to jest širenje krvnih žila (Singh i sur., 2008), ubrzava metabolizam lipida (Molina - Alcaide i Yáñez - Ruiz, 2008), posjeduje antivirusna svojstva (Soni i sur., 2006; Pereira i sur., 2007) te mnoga druga. Hidroksitirozol, derivat oleuropeina, djeluje slično kao i oleuropein (Somova i sur., 2003). Prevenira aterosklerozu te dijabetičku neuropatiju (Sato i sur., 2007).

### 2.3.1. ANTIHIPERTENZIVNO DJELOVANJE

Provedena je studija s 40 jednojajčanih blizanaca koji su bili u stanju prehipertenzije. Dobivali su dnevnu dozu od 500 odnosno 1000 mg ekstrakta lista masline, a pratio se sistolički i dijastolički krvni tlak kroz 8 tjedana. Rezultati su pokazali da je došlo do značajnog smanjenja i sistoličkog i dijastoličkog tlaka kod grupe koja je dobivala 1000 mg. Kod grupe koja je dobivala dnevnu dozu od 500 mg, također je došlo do smanjenja sistoličkog i dijastoličkog tlaka, ali ne značajno (Perrinjaquet – Moccetti i sur., 2008). Još jedna studija koja je koristila životinjski model s dijabetesom tipa 2 i renalnom hipertenzijom pokazala je smanjenje sistoličkog tlaka uslijed antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lista masline (Nekooeiann i sur., 2014).

Mehanizam oleuropeina odgovoran za sniženje krvnog tlaka još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Neke studije pripisuju taj učinak inhibiciji angiotenzin pretvarajućeg enzima (Rodriguez – Rodriguez i sur., 2009), vazodilataciji (Zarzuelo i sur., 1991) te aktivnosti spojeva koji vežu slobodne radikale (Jemai i sur., 2009).

### 2.3.2. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE

Reaktivni spojevi kisika i dušika se stalno stvaraju u ljudskom tijelu, a njihova proizvodnja je regulirana enzimima poput superoksid dismutaze (SOD), glutation preroksidaze i katalaze (CAT). Ako dolazi do pretjeranog stvaranja takvih reaktivnih spojeva, dolazi do oksidativnog oštećenja na staničnoj razini. To oštećenje stanica je povezano s povećanim rizikom od kroničnih oboljenja poput kardiovaskularnih bolesti i raka. Vjeruje se da antioksidansi mogu prevenirati ili smanjiti oksidacijska oštećenja i posljedično, smanjiti rizik od kroničnih bolesti (Dimitrios, 2006).

Oleuropein je u testu s DPPH (2,2 - difenil – 1 - pikrilhidrazil radikal) radikalom pokazao antioksidacijsku aktivnost vrlo sličnu askorbinskoj kiselini (vitamin C) te  $\alpha$ -tokoferolu (vitamin E) (Visioli i sur., 1998.) Oleuropein štiti od oksidacije lipoproteina niske gustoće (LDL), te koncentraciju ukupnog, slobodnog i esterificiranog kolesterola u eksperimentu sa zečevima (Coni i sur., 2000). Protektivan učinak oleuropeina na lipidnu oksidaciju je dokazan smanjenom razinom nastajanja reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline te nus proizvoda lipidne peroksidacije, poput malondialdehida (MDA) i 4 - hidroksinonenala (4-HNE) (Visioli i sur., 1995).

### 2.3.3. KARDIOPROTEKTIVNI UČINAK

Studija koja je istraživala učinak oleuropeina na ozljede miokarda je pokazala da unos od 20 mg po kg tjelesne mase prije inducirane ishemije kod štakora rezultira sa smanjenim otpuštanjem kreatin kinaze (CK), koja je važan marker kod određivanja stupnja ozljede srčanog mišića i oksidiranog glutationa (GSSG), koji je marker izloženosti srca oksidacijskom stresu. Da bi se procijenile specifične oksidacijske promjene na molekularnoj razini, mjerila se i koncentracija reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline (TBARS) koji su se znatno povećali u srčanom mišiću nakon ishemije, ukazavši na razne oksidacijske promjene na fosfolipidnim membranama. Studija nije pokazala značajan porast TBARS kod miševa koji su dobivali oleuropein u usporedbi s kontrolnom grupom (Manna i sur., 2004). U studiji koja je proučavala kardioprotektivni učinak oleuropeina kod miševa pokazao se kako pred tretman oleuropeinom pruža zaštitu od akutnog srčanog infarkta, prevenirajući zastoj rada srca nakon akutnog srčanog infarkt (Janahmadi i sur., 2014). Druga studija je pokazala da unos oleuropeina od 10 - 20 mg

po kg tjelesne mase kroz 6 tjedana ili 20 mg po kg tjelesne mase kroz 3 tjedana smanjuje jačinu infarkta u usporedbi s kontrolnom grupom ( $p = 0,001$ ) (Andreadou i sur., 2006).

#### 2.3.4. PRIMJENA U LIJEČENJU PRETILOSTI

Studija je pokazala da oleuropein smanjuje diferencijaciju pred adipocitnih stanica u adipocitne te lipidnu akumulaciju i na taj način regulira veličinu adipocita (Dira i sur., 2011). Još jedna studija je pokazala da oleuropein inhibira aktivnost PPAR $\gamma$  (peroksisom proliferator-aktivirani receptor gama) koji je esencijalan za formiranje i funkciju adipocita (Svobodova i sur., 2014).

## 2.4. NAPITAK (VODENI EKSTRAKT) LISTA MASLINE

Posljednjih godina raste interes za biljnim čajevima zbog zdravstvenih benefita. Čaj od lista masline je jedan od biljnih čajeva koji je tradicionalno korišten diljem Mediterana za liječenje raznih bolesti te čija popularnost naglo raste. Ekstrakt listova masline tamnosmeđe je boje i gorkog okusa (Sito i sur., 2015).

### 2.4.1. PROIZVODNJA ČAJA OD LISTA MASLINE

Lišće masline za proizvodnju čaja najbolje je brati u rano proljeće jer tada sadrži najviše ljekovitih tvari. Kada se lišće skine s grančica potrebno ga je oprati i probrati samo mlade, zdrave i neoštećene listove. Oprani i probrani listovi podvrgavaju se sušenju bilo prirodnim putem na zraku tijekom nekoliko dana ili umjetnim putem u sušarama. U oba slučaja listove treba u tankom sloju položiti na prozračne lese. U regalnim sušarama stavljaju se na police i sušenje se odvija na niskim temperaturama zraka, od 35 do 38 °C kako bi se sačuvali svi ljekoviti sastojci lista. Proces sušenja, u prosjeku, traje 25 - 30 sati, a duljina sušenja ovisi o debljini sloja lišća na policama, vanjskoj temperaturi zraka, režimu sušenja i drugim čimbenicima. Nakon sušenja, listovi se režu na manje komadiće za što služe strojevi rezačice na kojima se može podešavati veličina reza. Radi ujednačavanja veličine komadića izrezani listići prelaze preko sita i sakupljaju se u platnenim ili papirnatima prozračnim vrećama. Prema potrebi, lišće se može samljeti u prah u za to posebno izrađenom mlinu (Sito i sur., 2015).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. SIROVINA

Za pripremu napitka korišteni su listići masline ubrani u Ravnim kotarima u jesen 2016. godine i predstavljali su mješavinu nekoliko sorti i to oko 90 % sorte Orkula, 5 % sorte Leccina, te ostalo sorte Marokanka i Garbunčela. Listići su dopremljeni u laboratorij na PBF-u gdje su bili rašireni u tankom sloju po stolovima i tijekom nekoliko dana pri sobnoj temperaturi su ostavljeni kako bi se osušili. Nakon toga su odvojeni od grančica, očišćeni te su samo ispravni cijeli listići izdvojeni za provedbu pokusa. Listići su do provedbe pokusa čuvani u kartonskoj kutiji pri sobnoj temperaturi. Prije pokusa listići su oprani tekućom hladnom vodom i ponovno kratko na zraku prosušeni te izrezani.

##### 3.1.2. PRIPREMA NAPITKA OD LISTA MASLINE

Za potrebe pokusa pripremljeno se oko 2500 mL napitka, pri čemu je omjer listića i vode bio 4 g u 100 mL. Odvažuje se određena masa prethodno opranih, osušenih te usitnjenih listova masline te se stavi u odgovarajuću količinu prethodno do vrenja zagrijane destilirane vode. Listići su se kuhali 3 minute, a zatim su još stajali u toj vodi 10 minuta. Nakon toga napitak je procijeđen kako bi se uklonili listići te se provela pasterizacija pri 85° C 10 sekundi. Napitak je napunjen u prethodno oprane i sterilizirane staklenke od 200 mL, koje su hermetički zatvorene te su stavljene na skladištenje 12 tjedana pri sobnoj temperaturi, 22° C. Za svaki uzorak se pripremi 400 mL čaja, to jest dvije staklenke. Svaka 3 tjedna provedene su analize i to mjerenje boje te mikrobiološka i senzorska analiza, a za određivanje ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti uzorci su sakupljeni i svi zamrzavani na -80° C, osim uzorka skladištenog 12 tjedana te su analize provedene za sve uzorke isti dan.

### 3.1.3. REAGENSI

- Metanol 100% - tni (Avantor Performance Materials, Poljska)
- Folin – Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka)
- Natrijev karbonat bezvodni (Grammol, Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata se otopi u 800 mL vruće destilirane vode, a zatim se ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni se do oznake u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 sata filtrira.

- DPPH (2,2 – difenil – 1 - pikrilhidrazil radikal) (Sigma – Aldrich, Njemačka)
- 0,2 mM otopine DPPH (2,2 – difenil – 1 - pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,0079 g 2,2 – difenil – 1 - pikrilhidrazil radikala se odvaže u plastičnoj ladici te kvantitativno prenese i otopi u 100%-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100% - tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.

### 3.1.4. APARATURA I PRIBOR

- Spektrofotometar UV – 1600 PC (VWR, SAD)
- Analitička vaga AX224 (Ohaus Corporation, SAD)
- Tehnička vaga K7 (Mettler, Zürich)
- Vortex MS2 (IKA, SAD)
- Vodena kupelj od rotavapora B 490 (Buchi Labortechnik AG, Švicarska)
- Kolorimetar CM - 3500d (Konica Minolta, Japan)
- Staklene kivete
- Stakleni lijevak
- Plastična ladica za vaganje
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice od 100 mL i 1000 mL

- Mikropipete
- Laboratorijska čaša

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

##### *Princip metode:*

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin - Ciocalteu reagensom te mjerenjem intenziteta nastalog obojenja. Folin - Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline. Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima dolazi do redukcije kiseline u volframov oksid i molibden oksid koji daju plavo obojenje. Redukcija kiseline, odnosno tvorba plavog kompleksa bit će intenzivnija što je veći broj hidroksilnih ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

##### *Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu$ L ekstrakta, 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa te se uzorci termostatiraju 25 minuta na 50° C u vodenoj kupelji od rotavapora. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju, odnosno voda.

##### *Izrada baždarnog pravca:*

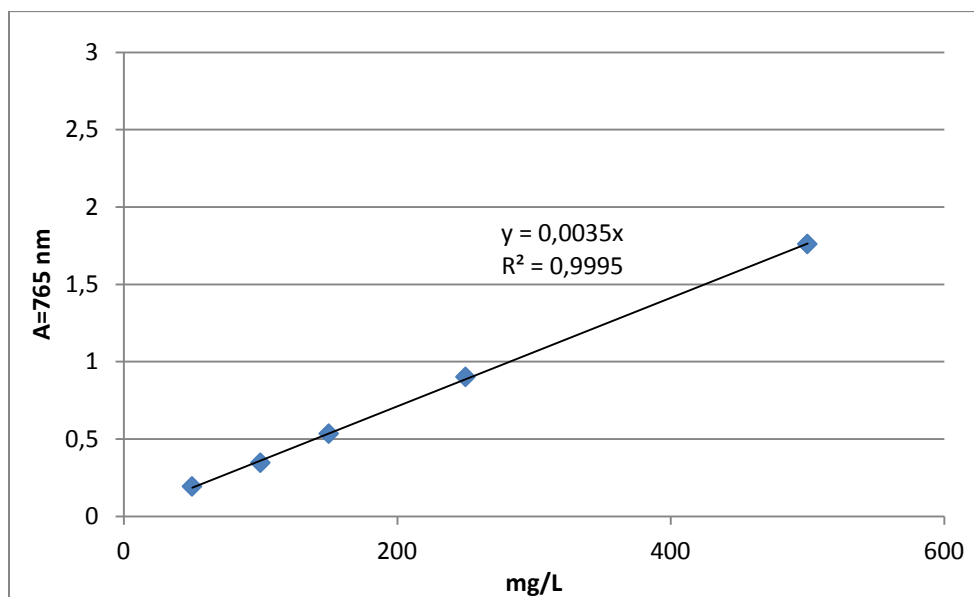
Odvaži se 0,5 g galne kiseline te se odvaži otopi u 10 mL 96% - tnog etanola u odmjerneju tikvici od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

Od tako napravljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopune destiliranom vodom do oznake. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200  $\mu$ L Folin - Ciocalteu reagensa



i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa te se uzorci termostatiraju 25 min na 50° C u vodenoj kupelji od rotavapora. Za slijepu probu uzima se 100 µL destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću Microsoft Excela pri čemu se na apscisu nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije. Koncentracija ukupnih fenola se izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 3: Baždarni pravac za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y=0,0035 * X$$

gdje je:

Y - apsorbancija pri 765 nm

X - koncentracija galne kiseline (mg/L)

### *Račun:*

Za svaki uzorak napitka izmjerene su dvije vrijednosti apsorbancije te su uvrštene u formulu kao parametar Y i na taj način su dobivene vrijednosti X te je uzeta njihova srednja vrijednost, odnosno koncentracija fenola u pojedinom uzorku napitka izražena je kao ekvivalent galne kiseline.

### 3.2.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

#### *Princip metode:*

DPPH (2,2 – difenil – 1 - pikrilhidrazil) je stabilan dušikov radikal, tamno ljubičastog obojenja. Zbog nesporenog elektrona princip određivanja temelji se na sposobnosti redukcije DPPH radikala pri čemu dolazi do sparivanja nesporenog elektrona s vodikom antioksidansa. Reakcija se očituje u promjeni boje iz ljubičaste u žutu, što se prati spektrofotometrijski kao pad apsorbancije pri 517 nm (Brand - Williams i sur., 1995). Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

#### *Postupak određivanja:*

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakta te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se dodaje 2,25 mL 100 % - tnog metanola.

Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

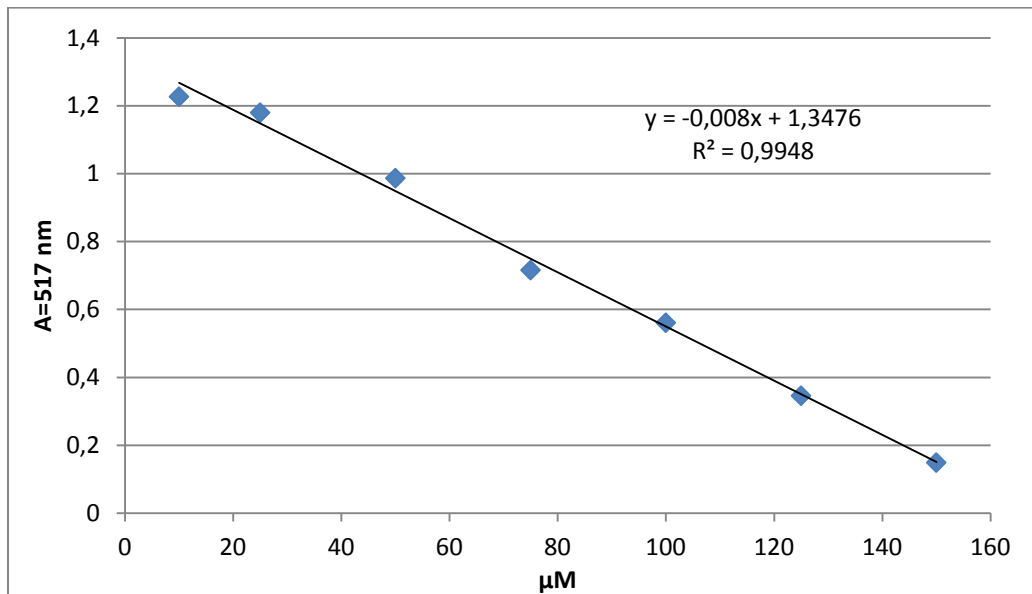
#### *Izrada baždarnog pravca za Trolox (0,2 mM DPPH):*

Pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6 - hidroksi - 2,5,6,7,8 - tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa, odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom do oznake u odmjerne tikvici od 100 mL.

Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150 µM.

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100%-tnog metanola. Epruvete sa

sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.



Slika 4: Baždarni pravac za Trolox

Jednadžba pravca glasi:

$$Y = -0,008 x + 1,3476$$

gdje je

Y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

X – ekvivalent Troloxa (TAE) (µM)

*Račun:*

Za svaki uzorak napitka izmjerene su dvije vrijednosti apsorbancije te su uvrštene u formulu kao parametar Y i na taj način su dobivene vrijednosti X te je uzeta njihova srednja vrijednost, odnosno antioksidacijska aktivnost pojedinog uzorka napitka izražena kao ekvivalent Troloxa.

### 3.2.3. MJERENJE BOJE

Mjerenje boje temelji se na parametrima trodimenzionalnog spektra boja ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) korištenjem kolorimetara koji rade na principu mjerenja stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine. Parametar  $L^*$  je svjetloća boje ili luminacija iskazana vrijednostima od 0 do 100 (0 = crno, 100 = bijelo). Vrijednost  $a^*$  je iskazana vrijednostima od -60 do 60, a iskazuje spektar od crvene (pozitivne vrijednosti) do zelene (negativne vrijednosti) boje. Veća pozitivna vrijednost parametra  $a^*$  karakterizira crveniju boju. Parametar  $b^*$  ukazuje na spektar nijansi između žute i plave boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra (McGuire, 1992). Kombinacijom parametara  $a^*$  i  $b^*$  dobiva se boja uzorka, a  $L^*$  označuje svjetlinu te boje. Iz  $a^*$  i  $b^*$  se mogu izračunati vrijednosti za H ili ton boje te C ili zasićenost boje prema sljedećim formulama:

$$H = \arctan b/a$$

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

gdje je:

$a^*$  - udio zelene (-  $a^*$ ) i crvene (+  $a^*$ ) komponente

$b^*$  - udio žute (-  $b^*$ ) i plave (+  $b^*$ ) komponente

U svrhu praćenja razlike boje u odnosu na neku ishodišnu boju, računa se ukupna razlika obojenosti  $\Delta E$ . Ukupna razlika obojenosti određuje se iz razlika svih triju dimenzija neke boje u odnosu na referentni uzorak (početni napitak):

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

U uzorcima napitaka izmjereni su  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  parametri pomoću kolorimetra.

### 3.2.4. SENZORSKA SVOJSTVA

Za određivanje pojedinih senzorskih svojstava u napitaka provedena je kvantitativna deskriptivna analiza (QDA) (Stone i sur. 2012.). Senzorska ispitivanja provodila je grupa od 10 panelista. Ispitivano je 12 senzorskih svojstava. Intenzitet pojedinog svojstva se izražava skalom od 1 (neizraženo svojstvo) do 10 (maksimalno izraženo svojstvo). Uzorci napitaka servirani su u plastičnim čašicama. U literaturi nisu pronađeni radovi o senzorskim svojstvima napitka od lista masline tako da je ovaj ocjenjivački listić kreiran u okviru izrade ovog rada uz korištenje određene terminologije prema radu Cerretani i sur. (2008).

1. uzorak				Ocjenjivač:							Datum		
Dan skald	Temp sklad. 22°C	Intenzitet boje		Miris		Okus					Aroma		
		Žuta boja	Smeđa boja	Miris lista masline	Strani miris	Trpki okus	Gorki okus	Okus na list masline	Strani okus	Harmonični okus	Svojstveno na list masline	Na zeleno	Strana aroma

Slika 5: Listić za senzorsku analizu

### 3.2.5. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

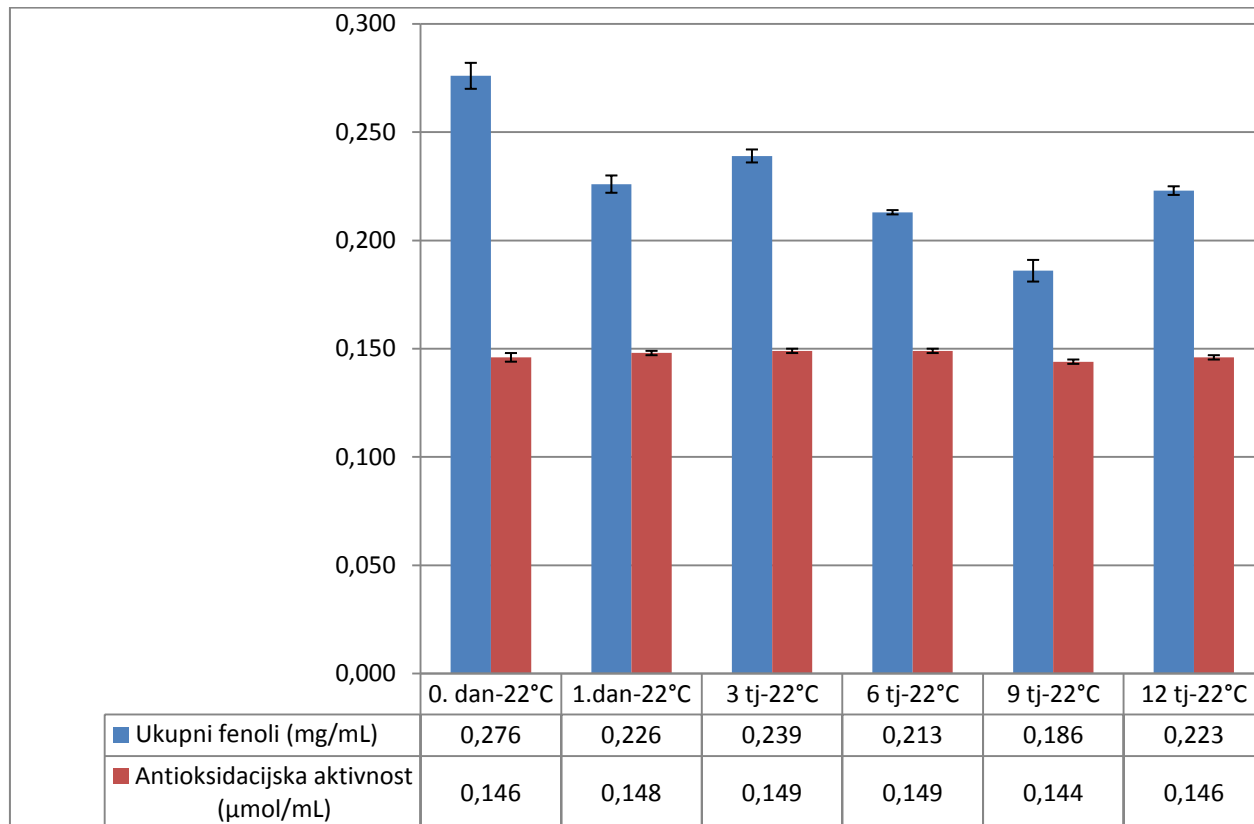
Mikrobiološka ispitivanja provodila su se prema standardnim metodama u akreditiranom laboratoriju PBF-a, u Centru za kontrolu namirnica, Jagićeva 31. Ispitivani su sljedeći mikroorganizmi prema navedenim metodama:

- aerobne mezofilne bakterije (metoda HRN EN ISO 4833:2008)
- kvasci (metoda HRN EN ISO 21527:2008)
- plijesni (metoda HRN EN ISO 21527:2008)
- bakterije *Salmonella* vrste (metoda HRN EN ISO 6579:2003)
- *Enterobacteriaceae* (metoda HRN EN ISO 21528-1:2008)

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

##### 4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Na slici 6 su prikazane srednje vrijednosti dvaju mjerenja te standardna devijacija.



Slika 6: Koncentracije ukupnih fenola (mg/mL) i antioksidacijska aktivnost (μmol/mL) napitka od lista masline skladištenog pri sobnoj temperaturi

Koncentracije ukupnih fenola (UF) u napitku od lista masline kreću se u rasponu od 0,276 mg GAE/mL do 0,186 mg GAE/mL. Najveća koncentracija UF 0,276 mg GAE/mL je određena 0. dan u svježe pripremljenom napitku i najveće smanjenje zabilježeno je između 0. i 1. dana dok se ostale dane koncentracija smanjuje pa ponovno raste. Najmanja koncentracija 0,186 mg GAE/mL je određena u 9. – om tjednu skladištenja. Antioksidacijska aktivnost (AA) se kreće u rasponu od 0,144 μmol TAE/mL do 0,149 μmol TAE/mL. 0. dana te zadnjeg dana skladištenja je jednaka AA 0,146 μmol TAE/mL, a najveća AA je u 3. – em i 6. – om tjednu skladištenja 0,149 μmol TAE/mL. Promjene tijekom skladištenja ni koncentracije ukupnih fenola niti antioksidacijske

aktivnosti ne pokazuju određeni jedinstveni trend niti kontinuiranog smanjenja niti povećanja vrijednosti.

Jiménez – Zamora i sur. (2016) određivali su UF i AA u listu masline kojeg su skladištili tijekom tri i šest mjeseci na sobnoj temperaturi. 0. dan je određena koncentracija UF  $0,094 \pm 1$  mg GAE/mL, a nakon tri mjeseca skladištenja  $0,058 \pm 3$  mg GAE/mL. AA 0. dan iznosila  $1,29 \pm 0,12$   $\mu$ mol TAE/mL, a nakon tri mjeseca se smanjila te je iznosila  $0,50 \pm 0,07$   $\mu$ mol TAE/mL.

U usporedbi s rezultatima Jiménez – Zamora i sur., koncentracija UF dobivenih u ovom radu je oko tri puta veća. Što se tiče AA, ona je značajno veća kod Jiménez – Zamora i sur., ali skladištenjem se AA dvostruko smanjila, a prema rezultatima ovog rada AA je postojana tijekom skladištenja.



## 4.2. MJERENJE BOJE

Tablica 1: Rezultati parametara boje u napitku od lista masline skladištenog na sobnoj temperaturi

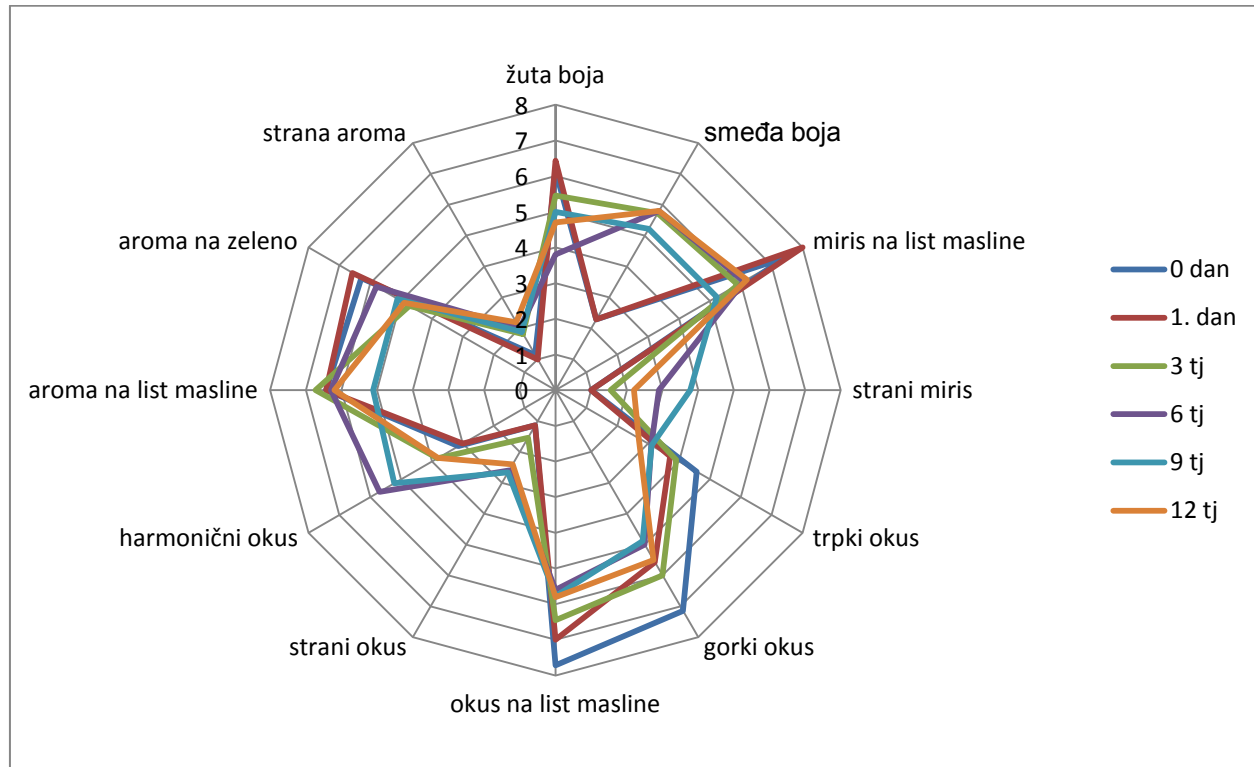
	0.dan	1.dan	3 tj	6 tj	9 tj	12 tj
L	91,14±0,49	92,85±0,06	91,93±0,11	90,52±0,10	88,9±0,06	88,92±0,15
a	-1,98±0,12	-1,24±0,03	-0,07±0,1	0,34±0,02	0,89±0,01	0,69±0,03
b	19,18±0,14	20,43±0,08	23,28±0,19	25,73±0,21	28,64±0,09	26,93±0,13
C	19,29±0,15	20,46±0,08	23,28±0,19	25,73±0,02	28,65±0,09	26,94±0,13
h	95,89±0,3	93,48±0,08	90,19±0,02	89,25±0,03	88,22±0,01	88,52±0,06
ΔE	-	2,25	4,59	6,97	10,13	8,49

U tablici su prikazane srednje vrijednosti triju mjerenja te standardna devijacija.

L, a, b su mjereni parametri, a C, h i ΔE su izračunati parametri.

Skladištenjem se povećava ukupna razlika obojenosti (ΔE) u odnosu na 0. dan što je moguća posljedica neenzimskog posmeđivanja u kojem dolazi do reakcije između amino skupine aminokiselina, peptida ili proteina te karbonile skupine reducirajućih šećera. ΔE se povećava skladištenjem do 9. – og tjedna (10,13), a u 12. - om tjednu skladištenja ta razlika je nešto manja u odnosu na 9. – ti tjedan (8,49). Dolazi do porasta parametra a, to jest on prelazi iz negativnih u pozitivne vrijednosti, kao i parametra b. Parametar L raste do 6. – og tjedna, nakon čega pada (88,9) ispod početne vrijednosti (91,14). Zasićenost boje (C) raste, a ton boje (h) se smanjuje.

### 4.3. SENZORSKA SVOJSTVA



Slika 7: Rezultati senzorskog ocjenjivanja napitka od lista masline skladištenog na sobnoj temperaturi

Žuta boja je najizraženija 0. – og te 1. – og dana skladištenja. Intenzitet žute boje se smanjuje s vremenom skladištenja, a smeđa boja raste s vremenom skladištenja te je najizraženija od 3. – eg tjedna pa do kraja skladištenja ostaje ista. Miris na list masline je najjači 0. i 1. dan, a daljnjim skladištenjem se smanjuje. Strani miris nije prisutan 0. ni 1. dan, ali od 3. – eg tjedna se povećava, a zadnji tjedan skladištenja se smanjio. Gorki i trpki okus su najizraženiji 0. dan te se smanjuju s vremenom. Okus na list masline je najizraženiji 0. – ti i 1. dan, a ostale dane je postojan te se ne mijenja. Strani okus vrlo niskog intenziteta se pojavljuje od 3. – eg tjedna, a zadnji tjedan se smanjio. Harmonični okus je najizraženiji u 6. – om tjednu, odnosno sredinom perioda skladištenja. Aroma na list masline je stabilna tijekom skladištenja, a najizraženija je u 3. – em tjednu. Aroma na zeleno se smanjuje s vremenom, a strana aroma se pojavljuje od 3. – eg tjedna te nije značajno prisutna.

#### 4.4. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

Tablica 2: Rezultati mikrobiološkog ispitivanja napitka od lista masline skladištenog na sobnoj temperaturi

		0.dan	1.dan	3 tj	6 tj	9 tj	12 tj	KRITERIJI
Aerobne mezofilne bakterije	1,00 mL	30	30	20	35	20	20	<b>&lt;10</b>
Kvasci	1,00 mL	<10	<10	<1	<1	<1	<1	<b>&lt;1</b>
Plijesni	1,00 mL	<10	<10	<1	<1	<1	<1	<b>&lt;1</b>
Bakterije <i>Salmonella</i> vrste	25,00 mL	-	-	Nije izolirana	Nije izolirana	Nije izolirana	Nije izolirana	<b>Nije izolirana</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,00 mL	-	-	<1	<1	<1	<1	<b>&lt;1</b>

0. i 1. dan skladištenja je određena veća koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija te kvasaca i plijesni nego ostale dane skladištenja. U 3. – em, 6. – om, 9. – om te 12. - om tjednu određena je dopuštena koncentracija kvasaca, plijesni te *Enterobacteriaceae* (<1), dok bakterije vrste *Salmonella* nisu izolirane. Koncentracija aerobnih mezofila je iznad dopuštene granice tijekom cijelog perioda skladištenja, ali ne dolazi do jasnog povećanja, što prije upućuje na određenu neispravnost prilikom punjenja i zatvaranja staklenki nego na nestabilnost napitka tijekom skladištenja. Uzevši u obzir sve rezultate mikrobiološke analize može se primijetiti zadovoljavajuća mikrobiološka stabilnost napitka tijekom skladištenja.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih analiza na uzorcima napitka od lista masline tijekom više mjesečnog skladištenja i dobivenih rezultata proizlaze sljedeći zaključci:

1. Udio ukupnih fenola u napitku kreće se od 0,276 mg GAE/mL (0. dan) do 0,186 mg GAE/mL (9. tj), a tijekom skladištenja nije uočen jedinstveni trend promjena.
2. Antioksidacijska aktivnost napitka tijekom skladištenja je vrlo stabilna i kreće se od 0,144 – 0,149  $\mu$ mol TAE/mL, ali također bez jasnog trenda promjena.
3. Skladištenjem napitak poprima tamniju boju što proizlazi iz svih izmjerenih parametara boje. Dolazi do porasta  $L^*$  i  $b^*$  vrijednosti te  $a^*$  prelazi iz negativne u pozitivne vrijednosti, povećava se ukupna razlike obojenosti, smanjuju se vrijednosti za ton boje ( $H^\circ$ ) (što ukazuje na veći udio crvenih nijansi) te dolazi do porasta zasićenosti boje (C).
4. Senzorskim ocjenjivanjem uočeno je da se žuta boja napitka smanjuje skladištenjem, a smeđa boja povećava. Miris na list masline je najizraženiji prvi dan, a ostale dane se smanjuje. Vrlo blagi strani miris i okus se pojavljuju tek od 3. – eg tjedna skladištenja, . Gorki i trpki okus se smanjuju skladištenjem, a okus na list masline je postojan tijekom skladištenja, kao i aroma na list masline. Strana aroma nije prisutna.
5. Tijekom skladištenja napitka ne dolazi do povećanja koncentracije aerobnih mezofila iako su tijekom cijelog perioda skladištenja neznatno iznad dopuštenih vrijednosti, a kvasci, plijesni te *Enterobacteriaceae* su u dopuštenim koncentracijama te bakterije *Salmonella* vrste nisu izolirane.
6. Svi prikazani rezultati ukazuju da je napitak na bazi lista masline prilično stabilan tijekom skladištenja pri sobnoj temperaturi.

## 6. LITERATURA

Anonymus 1 (2016) Gnojdba < <http://www.gnojdba.info/gnojdba-masline/preporuka-gnojdbemaslina-92016/>> Pristupljeno 27. lipnja 2017.

Anonymus 2 (2014) ResearchGate < [https://www.researchgate.net/figure/267983455\\_fig2\\_Fig-2-Chemical-structures-of-oleuropein-glucoside-and-its-derivative-hydroxytyrosol](https://www.researchgate.net/figure/267983455_fig2_Fig-2-Chemical-structures-of-oleuropein-glucoside-and-its-derivative-hydroxytyrosol)> Pristupljeno 27. Lipnja 2017.

Alcázar-Román R., Amorós J. A., Pérez de los Reyes C., García Navarro F. J., Bravo S. (2014) Major and trace element content of olive leaves. *Olivae* **119**: 1 - 7.

Andreadou I., Iliodromitis E. K., Mikros E., Constantinou M., Agalias A., Magiatis P. (2006) The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *Journal of Nutrition* **8**: 2213 - 2219.

Balasundram N., Sundram L., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and Agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191 -203.

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., Sahin 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.

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.

Brand – Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a Free – Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science Technology – Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie* **28**(1): 25-30.

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* **4**: 258.

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

Coni E., di Benedetto R., di Pasquale M., Masella R., Modesti M., Mattei R., Carlini E.A. (2000) Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* **35**: 45 - 54.

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 and Technology* **17**: 505 - 512.

Di Donna L., Mazzotti F., Naccarato A., Salerno R., Tagarelli A., Taverna D., Sindona G. (2010) Secondary metabolites of *Olea europaea* leaves as markers for the discrimination of cultivars and cultivation zones by multivariate analysis. *Food Chemistry* **121**: 492 - 496.

Drira R., Chen S., Sakamoto K. (2011) Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Life Science* **89**: 708 - 716.

El S. N., Karakaya S. (2011) Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews* **67**: 632 - 638.

Ferreira I. C. F. R., Barros L., Soares M. E., Bastos M. L., Pereira J. A. (2007) Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry* **103**: 188 - 195.

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.

Guinda A., Castellano J. M., Santos-Lozano J. M., Delgado-Hervás T., Gutiérrez-Adánez P., Rada M. (2015) Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *Food Science and Technology* **64**: 431 - 438.

HRN ISO 4833: 2008, Horizontalna metoda za brojenje mikroorganizama -- Tehnika brojenja kolonija na 30 °C

HRN ISO 6579: 2003, Horizontalna metoda za otkrivanje bakterije *Salmonella spp.*

HRN ISO 21528-1: 2008, Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* postupkom predobogaćivanja

HRN ISO 21527: 2008, Brojenje kvasaca i plijesni

Janahmydi Z., Nekoeian A. A., Moaref A. R., Emamghoreishi M. (2014) Oleuropein Offers Cardioprotection in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Cardiovascular Toxicology* **15**: 61 - 68.

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**: 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.

Manna C., Migliardi V., Golino P., Scognamiglio A., Galletti P., Chiariello M., Zappia V. (2004) Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **15**: 461 - 466.

Markakis E. A., Tjamos S. E., Antoniou P. P., Roussos P. A., Paplomatas E. J., Tjamos E. C. (2010). Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and non defoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. *The American Phytopathology Society* **94**: 1156 - 1162.

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.

McGuire R. G. (1992) Reporting of objective colour measurements. *Horticultura Science* **27**(12): 1254-1255.

Molina-Alcaide E., Yáñez-Ruiz D. R. (2008) Potential use of olive by-products in ruminant feeding. *Animal Feed and Science Technology* **147**: 247 - 264.

Nekooeian A. A., Khalili A., Khosravi M. B. (2014) Effects of oleuropein in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: a study of antihypertensive mechanisms. *Journal of Asian Natural Products Research* **16**: 953 - 962.

Papoti V. T., Tsimidou M. Z. (2009a) Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 3470 – 3477.

Perreira A. P., Ferreira I. C. F. R., Marcelino F. (2007) Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules* **12**: 1153 - 1162.



Perrinjaquet – Moccetti T., Busjahan A., Schmidlin C., Schmidt A., Bradl B., Aydogan C. (2008) Food supplementation with an olive (*Olea europea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research* **22**: 1239 - 1242.

Petti S., Scully C. (2009) Polyphenols oral health and disease: a review. *Journal of Dentistry* **37**: 413 - 423.

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.

Rodriguez-Rodriguez R., Herrera M. D., Sotomayor M. A., Ruiz-Gutierrez V. (2009) Effects of pomace olive oil-enriched diets on endothelial function of small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition* **102**: 1435 - 1444.

Sato H., Genet C., Strehle A. (2007) Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europea*. *Biochememical and Biophysiscal Research Communications* **362**: 793 - 798.

Shanmugam M. K., Dai X., Kumar A. P., Tan B. K. H., Sethi G., Bishayee A. (2014) Oleanolic acid and its synthetic derivatives for prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence. *Cancer Letters* **346**: 206 - 216.

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.

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.

Sito S., Dovečer S., Borić V., Ploh M., Borić M. (2015) Uređaji i oprema za proizvodnju čaja od maslinovog lista. *Glasnik zaštite bilja* **38**: 28 – 32.

Somova L. I., Shode F. O., Ramnanan P., Nadar A. (2003) Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europea*, subspecies *Africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* **84**: 299 - 305.

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

Strikić F. (2011) Maslina i maslinovo ulje – Božji dar u Hrvata, 1. izdanje, Mavi d.o.o., Zagreb str. 108

Svobodova M., Andreadou I., Skaltsounis A. L., Kopecky J., Flachs P. (2014) Oleuropein as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Genes & Nutrition* **9**: 376.

Talhaoui N., Taamalli A., Gómez-Caravaca A. M., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. (2015) Phenolic compound in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* **77**: 92 - 108.

Tan H. W., Tuck K. L., Stupans I., Hayball P. J. (2003) Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **785**: 187 - 191.

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., Bellomo G., Montedoro G., Galli C. (1998) Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **247**: 60 - 64.

Vogel P., Kasper Machado I., Garavaglia J., Terezinha Zani V., De Souza D., Morelo Del Bosco S. (2015) Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europea L.*) to human health. *Nutricion Hospitalaria* **31**: 1427 - 1433.

Zarzuelo A., Duarte J., Jimenez J., Gonzalez M., Utrilla M. P. (1991) Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Medica* **57**: 417 - 419.

## *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.*

Petra Lončarić

---

ime i prezime studenta