

Fizikalno-kemijska i senzorska svojstva napitka od lista masline s dodatkom soka naranče

Ekić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:914489>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Sara Ekić

7048/PT

**FIZIKALNO-KEMIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA NAPITKA OD LISTA
MASLINE S DODATKOM SOKA NARANČE**

ZAVRŠNI RAD

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

Mentor: dr. sc. *Maja Repajić*, poslijedoktorand

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Fizikalno-kemijska i senzorska svojstva napitka od lista masline s dodatkom soka naranče

Sara Ekić, 0058206328

Sažetak: U ovom radu ispitana je senzorska prihvatljivost kao i svojstva napitka od lista masline s koncentriranim sokom naranče sa i bez dodanog šećera kao potencijalnog funkcionalnog napitaka. Koncentrirani sok naranče dodavan je ovisno o dodanom šećeru u različitim volumenima i to 2, 4, 6, 8 mL za 100 mL napitka lista masline bez dodanog šećera te 1, 2, 3, 4 mL u napitcima s dodanim šećerom. U svim pripremljenim napitcima određena su fizikalno kemijska svojstva (topljiva suha tvar, pH vrijednost, boja), senzorska svojstva, te udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet. Uslijed dodatka koncentriranog soka naranče u napitak lista masline došlo je do povećanja topljive suhe tvari, a smanjenja pH vrijednost pripremljenih napitaka. Koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet povećavaju se s povećanjem volumena dodanog koncentriranog sok naranče u bazični napitak. Kao najharmoničniji napitak pokazao se onaj u koji je dodan najveći volumen koncentriranog soka naranče i najveća količina saharoze.

Ključne riječi: funkcionalni napitak, koncentrirani sok naranče, list masline

Rad sadrži: 34 stranice, 13 slika, 5 tablica, 66 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: dr. sc. Maja Repajić, poslijedoktorand

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Branka Levaj

Datum obrane: 19. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Physico-chemical and sensory properties of olive leaf beverage with the addition of orange juice

Sara Ekić, 0058206328

Abstract: This paper examines sensory acceptability and properties of olive leaf extract with concentrated orange juice with and without added sugar as a potential functional beverage. Concentrated orange juice was added depending on the added sugar in different volumes of 2, 4, 6, 8 mL for 100 mL of olive leaf extracts without added sugar and 1, 2, 3, 4 mL with added sugar. In all prepared beverages, physicochemical properties (soluble solids, pH value, color), sensory properties, total phenols and antioxidant capacity were determined. Due to addition of concentrated orange juice to olive leaf extract, soluble solids increased and the pH value of the prepared drinks decreased. Concentrations of total phenols and antioxidant capacity increased with the increasing of added volume of concentrated orange juice to basic beverage. The most harmonious drink was the one with the highest volume of concentrated orange juice and the highest sucrose quantity.

Keywords: *functional beverage, concentrated orange juice, olive leaf*

Thesis contains: 34 pages, 13 figures, 5 tables, 66 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of

Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD. Maja Repajić, Postdoctoral Researcher

Technical support and assistance: PhD. Branka Levaj, Full professor

Defence date: September 19th 2018

Sadržaj

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	OSVJEŽAVAJUĆA BEZALKOHOLNA PIĆA	2
2.2	BILJNI EKSTRAKTI	4
2.3	MASLINA	6
2.4	NARANČA	8
3	EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1	Materijali	10
3.1.1	Sirovine za pripremu napitka	10
3.1.2	Priprema napitka lista masline	11
3.1.3	Priprema napitaka lista masline i koncentriranog soka naranče	11
3.1.4	Priprema napitaka lista masline i koncentriranog soka naranče uz dodatak saharoze	11
3.2	Otapala i reagensi	13
3.3	Aparatura i pribor	13
3.4	Metode rada	14
3.4.1	Metoda za određivanje topljive suhe tvari	14
3.4.2	Metoda za određivanje pH vrijednosti	15
3.4.3	Metoda CIELAB za određivanje boje	15
3.4.4	Metoda za određivanje senzorskih svojstava	16
3.4.5	Metoda za određivanje koncentracije ukupnih fenola	17
3.4.6	Metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	19
4	REZULTATI I RASPRAVA	21
5	ZAKLJUČAK	28
6	LITERATURA	29

1 UVOD

Važnost prehrane u očuvanju zdravlja spoznao je i grčki liječnik Hipokrat, rekavši:

"Neka tvoja hrana bude tvoj lijek, a tvoj lijek neka bude tvoja hrana."

Samim time, Hipokrat je pridonio današnjoj popularizaciji funkcionalne hrane i funkcionalnih pića. Svijest o primjeni funkcionalnih pića sve je razvijenija i prihvaćenija u zemljama Europske unije. Shodno tome, bilježi se sve veći interes potrošača za pićima dostupnim na tržištu koja sadrže različite bioaktivne komponente koje pridonose poboljšanju njihova zdravlja. Osluškujući želje potrošača, prehrambena industrija nastoji osmisliti proizvode koji će u jednu ruku sadržavati nutritivno i biološki vrijedne komponente, a u drugu ruku osigurati privlačna senzorska svojstva za potrošača, u vidu boje, mirisa i okusa.

Osobito zanimljiv fokus je na lišću masline koje se još od davnina koristilo za liječenje različitih zdravstvenih stanja. Napretkom znanosti, nastali su i pisani zapisi u vidu različitih znanstvenih istraživanja koja dokazuju povoljan utjecaj komponenti lišća masline na organizam čovjeka.

Antihipertenzivno, antimikrobno, antioksidacijsko, antikancerogeno, hipoglikemijsko, kardioprotektivno te protuupalno djelovanje samo su dio zabilježenih pozitivnih učinaka lišća masline. Lišće masline zapravo se smatra otpadom koji nastaje tijekom proizvodnje konzumnih maslina ili tijekom njihove industrijske prerade, no usprkos tome prehrambena industrija nastoji kreirati funkcionalni proizvod upravo na bazi lišća masline. Upravo zbog užurbanog ritma življenja osobito pogodnim smatraju se funkcionalni, obogaćeni napitci.

Stoga je cilj ovog završnog rada ispitati mogućnost uporabe lišća masline i koncentriranog soka naranče u proizvodnji funkcionalnih pića. Eksperimentalnim radom obuhvaćeno je ispitivanje utjecaja dodanog volumena koncentriranog soka naranče (2, 4, 6 i 8 mL na 100 mL napitka) i saharoze na fizikalno kemijska svojstva (topljiva suha tvar, pH vrijednost, boja), senzorska svojstva, udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet napitka.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 OSVJEŽAVAJUĆA BEZALKOHOLNA PIĆA

Glavna odlika osvježavajućih bezalkoholnih pića kao što sam naziv govori jeste njihov osvježavajući karakter. Osvježavajuća bezalkoholna pića (slika 1) proizvodi su dobiveni odgovarajućim tehnološkim postupkom od vode ili mineralne vode, šećera, voćnog soka, koncentriranog voćnog soka, voćne pulpe, voćnog markara, voćne baze, biljnih ekstrakata, žitarica, proizvoda od žitarica, sirutke, proizvoda od sirutke, sirupa za osvježavajuća bezalkoholna pića, s dodatkom ili bez dodatka ugljičnog dioksida i aditiva dopuštenih ovim pravilnikom (Pravilnik, 1997). Shodno tome, može ih se podijeliti na gazirana (sa šećerom ili sladilima) i negazirana (sa šećerom ili sladilima) ovisno o dodatku CO₂.



Slika 1. Osvježavajuća bezalkoholna pića (Anonymous 1)

U javnosti su osvježavajuća bezalkoholna pića najčešće povezana s negativnim učincima na zdravlje potrošača. Jedna od poznatijih nepogodnosti svakako je oštećenje zubne cakline. Tako je, prema istraživanju provedenom 2017. godine u Mjanmaru dokazano da što je piće kiseliije, to negativnije djeluje na zubnu caklinu. Temeljom toga zajednicu bi trebalo što jasnije informirati o mogućim rizicima oštećenja oralnog zdravlja uslijed česte ili produljene konzumacije bezalkoholnih osvježavajućih pića te usmjeriti istraživanja na pronalaženje načina zaštite zubne cakline od kiseline koja potječe iz pića. Jedan od načina prikazan je 2011. godine u istraživanju Barbosa i sur., koji su dopunili bezalkoholna pića ekstraktom zelenog čaja i time smanjili demineralizaciju cakline uslijed konzumacije bezalkoholnih osvježavajućih pića. Time su, osim poboljšanja samog proizvoda, doveli i do inovacije u prehrambenoj industriji, proizvodnjom obogaćenog pića. Predmet istraživanja je i natrijev benzoat, konzervans koji se najviše koristi u

proizvodnji gaziranih pića, ledenih čajeva i voćnih sokova, a njegova toksičnost, prema istraživanju Bruna i sur. iz 2018. ovisi o vrsti, dozi i izloženosti. Neke od detektiranih nuspojava na natrijev benzoat su: urtikarija, astma i ekcem. Također, kod odraslih osoba srednje dobi konzumacija bezalkoholnih pića povezana je s većom učestalošću i incidencijom višestrukih metaboličkih čimbenika rizika (Dhingra i sur., 2007). Negativni učinak može se manifestirati i uslijed primjene limenki obloženih smolom koja sadrži bisfenol A, a može izazvati preuranjeni pubertet i reproduktivne abnormalnosti. U novije vrijeme istražuje se i učinak osvježavajućih bezalkoholnih pića na trudnoću, međutim, konzumacija osvježavajućih bezalkoholnih pića nije povezana s vjerojatnošću živog rođenja (Setti i sur., 2018). Jedan od vodećih problema predstavlja 80% povećan rizik oboljevanja od dijabetesa tipa 2. Unos šećerom zaslađenih napitaka koji sadrže saharozu, fruktozni ili kukuruzni sirup može biti povezan s povećanjem učestalosti dijabetesa tipa 2, no nije znanstveno dokazano da li je jedini razlog tomu sadržaj šećera ili učinak imaju i načina življenja, prehrambene navike, ponašanje te nedostatak fizičke aktivnosti (Greenwood i sur., 2014). Temeljem toga, jedan od vodećih ciljeva prehrambene industrije je smanjenje količine dodanog šećera. Osim korištenja nadomjesnih šećera (ne-nutritivnih zaslađivača, šećernih alkohola i vlakana) i različitih aroma, proučavaju se različite strukturalne inovacije u hrani (modifikacija distribucije saharoze, serumsko otpuštanje, mehanika prijeloma) kojima se nastoji smanjiti količina šećera bez značajnih promjena u senzorici gotovog proizvoda (Hutchings i sur. 2018). Takav cilj jeste opravdan, ali jednako tako i vrlo zahtjevan, budući da može negativno utjecati na percepciju potrošača (Oliveira i sur. 2018), a samim time dovesti do smanjenja prodaje istih. Prema istraživanju Oliveira i suradnika iz 2018. moguće je smanjiti količinu dodanog šećera 5-8% bez utjecaja na osjetilnu percepciju potrošača. Istraživanje Hodgea i suradnika iz 2018. pridonosi opravdanosti smanjenja unosa šećerno zaslađenih bezalkoholnih pića, budući da se omjer rizika od kancerogenih oboljenja povezanih s pretilošću (npr. rak debelog crijeva) i šećerom zaslađenih bezalkoholnih pića povećavao s povećanjem učestalosti potrošnje, dok omjer rizika za umjetno zaslađena bezalkoholna pića nije bio povezan s potrošnjom. S druge strane, nova studija otkrila je povezanost konzumacije umjetno zaslađenih bezalkoholnih pića s demencijom i moždanim udarima. Istraživanje je bazirano na pićima koja su sadržavala saharin, ciklomat, aspartam ili sukralozu, a nisu sadržavala steviju, prirodni zaslađivač. Prirodno zaslađeni napitci nisu bili povezani s moždanim udarom ili demencijom, stoga je možda idealno vrijeme da se tržište ugleda na ono japansko gdje stevia već zauzima 40% tržišta sladila (Pase i sur., 2017).

Bezalkoholna osvježavajuća pića, sama po sebi, ne sadrže nutritivno vrijedne komponente koje bi pridonijele zdravlju potrošača. Stoga se, sukladno tržišnoj potražnji, danas nastoje kreirati tzv. funkcionalna pića. Funkcionalna pića mogu se definirati kao proizvod koji potrošaču, osim svoje primarne funkcije - hidratacije ljudskog organizma, nudi i dodatne benefite koji su najčešće direktno povezani s pozitivnim utjecajem na ljudsko zdravlje (Ashurst, 2005). Dije se na: pića obogaćena različitim nutrijentima (vitaminima, mineralima, biljnim vlaknima, aminokiselinama, fitokemikalijama), sportska (izotonična, hipotonična i hipertonična), energetska, nutraceutička, pića na bazi biljnih ekstrakata te ostala funkcionalna pića. Najzastupljenija skupina funkcionalnih pića su pića obogaćena različitim nutrijentima, najčešće vitaminima A, C i E ili nekim drugim funkcionalnim sastojcima. U Republici Hrvatskoj dominira proizvodnja ACE pića i izotoničnih napitaka dok se preostala funkcionalna pića osiguravaju uvozom.

U cilju proizvodnje obogaćenih i funkcionalnih pića iskoristiti se mogu i biljni ekstrakti.

2.2 BILJNI EKSTRAKTI

Biljni ekstrakti mogu se definirati kao sastojci dobiveni različitim postupcima ekstrakcije iz svježeg ili sušenog bilja ili dijelova biljaka kao što su: lišće, cvjetovi, sjemenke, korijen i kora (Vinatoru, 2001). Biljni ekstrakti dobivaju se tako što se usitnjene dijelove biljke, uglavnom suhe, dovodi u kontakt s otapalom za ekstrakciju u odgovarajućem uređaju (ekstraktor). U sljedećoj fazi procesa nastaje međuproizvod (miscella, eluat) koji se odvaja od ostatka biljne droge. Ako se u procesu ekstrakcije koriste tekuća otapala (etanol ili smjesa etanola i vode, masna ulja i sl.) nakon filtracije se dobiva tekući ekstrakt, a kao rezultat procesa ekstrakcije može se dobiti i suhi ekstrakt ako se od faze miscelle nastavi proces uparivanja u vakuum uparivaču (Savić, 2014). Također, u tekućem ekstraktu (*Extracta fluida*) odnos biljnog materijala i otapala je 1:1, a u suhom ekstraktu (*Extracta sicca*) suhi dio iznosi najmanje 95%.

Za tematiku ovog rada osobito su važni tekući biljni ekstrakti koji se dobivaju potapanjem biljaka u otapalo (npr. voda, alkohol (glicerol, etanol), smjese etanola, vode i/ili glicerola) kako bi se iz biljke izolirali aktivni sastojci, a uklonile balastne tvari poput celuloze. Tekući biljni ekstrakti dijele se na: infuzije, dekokte, macerate, glicerinske ekstrakte, perkolate i digeste. Infuzije se najčešće priređuju od biljnih dijelova kao što je list, cvijet ili cijeli nadzemni dio zeljaste biljke tako da se voda zagrije do vrenja, zatim se u nju stavi osušena i/ili usitnjena biljka i ostavi stajati pokrivena 5 do 15 minuta. Talog se odvoji od tekućeg dijela, a aktivne tvari iz biljke bivaju ekstrahirane vrućom vodom. Iako se nerijetko za pojam infuzije upotrebljuje pojam čaj, važno je naglasiti kako

je čaj napitak koji se dobiva namakanjem listova biljke čajevca (*Camellia sinensis*) u vrućoj vodi, dok je biljna infuzija napitak koji se sprema na isti način, ali se dobiva iz neke druge biljke (Cabrera i sur., 2006). U prehrambenoj industriji najčešće se za proizvodnju funkcionalnih pića primjenjuju upravo infuzije. Razlog tome leži u ekonomskoj isplativosti po samog proizvođača, ali i u činjenici da se ovi tipovi biljnih ekstrakata najmanje obrađuju. Benefite hladnih i toplih infuza valja dodatno istražiti, budući da istraživanje Damiani i suradnika iz 2014. navodi kako infuzija hladnog bijelog čaja ima veći antioksidacijski kapacitet nego ona toplo pripremljenog. Također, sve je više dokaza da učestala konzumacija infuzija ima antikancerogeno djelovanje, što je povezano s antioksidacijskom aktivnošću sastojaka infuzije. Infuzijama se pripisuju antimikrobna svojstva (Friedman i sur., 2005), kao i pomoć u regulaciji tjelesne težine (Kao i sur., 2000). Istinitost teze svjedoče Kinezi, koji su poznati kao veliki ljubitelji čaja, ali i kao nacija koja ima vrlo nisku stopu pretilosti. Pokazalo se da tradicionalni zeleni čaj utječe na nivo inzulina, snižava loš kolesterol i ubrzava metabolizam pomažući organizmu da brže sagorijeva masnoće te djeluje umirujuće na receptore u mozgu što rezultira smanjenjem apetita (Khan, 2007).

Najčešća bezalkoholna pića na bazi biljnih ekstrakata, na hrvatskom tržištu, su ledeni čajevi. Ledeni čajevi specifičnog su okusa i boje, ovisno o vrsti dodanog biljnog ekstrakta (crni, bijeli ili zeleni čaj). Infuz koji je primijenjen za izradu pića može uzrokovati manje ili veće senzoričke promjene tako da njegov intenzivni okus maskira željeni okus proizvoda, no budući da se biljni ekstrakti dodaju u pića u relativno malom udjelu, njihov dodatak najčešće ne uzrokuje problem u okusu i boji konačnog proizvoda (Ashurst, 2005). Isto tako, moguće je ledeni čaj obogatiti dodatkom arome (npr. breskva, limun). Mogućnosti svakako postoje, no velikim dijelom ovise i o tržištu na koje se određeno piće plasira. Hrvatski potrošači preferiraju ledene čajeve koji su poboljšani određenim dodatcima, dok se primjerice u Japanu pije hladna verzija zelenog čaja bez ikakvih poboljšivača okusa. Osim navedenih biljnih ekstrakata, primijeniti se može i ekstrakt lista masline kojeg karakterizira gorčina. Idejno rješenje za spomenutu gorčinu može biti upravo tema ovog završnog rada, odnosno da se ekstraktu lista masline dodana određena količina voćnog soka, na taj način senzorička svojstva bi se poboljšala jer bi se negativnost okusa ekstrakta lista masline (gorčina) ublažila dodatkom koncentriranog voćnog soka, a u drugu ruku povećala bi se i nutritivna vrijednost napitka.

2.3 MASLINA

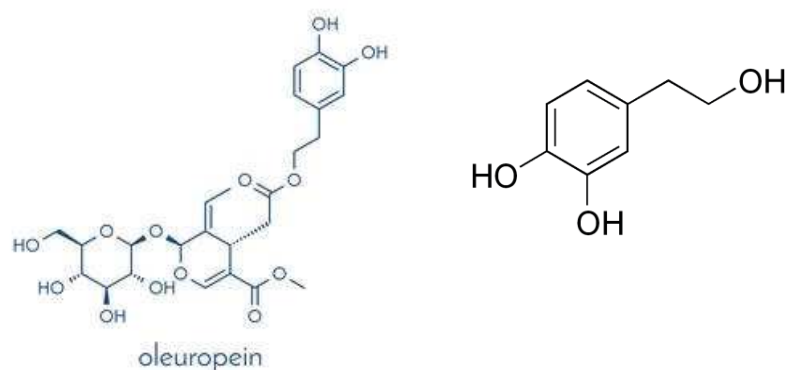
Jedna od najpoznatijih i najčešće kultiviranih biljaka Mediterana je maslina (*Olea europea* L.) (slika 2). U prilog tomu ide i činjenica da se od uzgojnih 8 milijuna hektara diljem cijelog svijeta, 98% nalazi na Mediteranskom području (Abaza i sur., 2015). Maslina pripada porodici Oleaceae. Danas se najčešće primjenjuju listovi i plodovi koje karakterizira gorak okus.



Slika 2. Maslina (Anonymous 2)

Kemijski sastav lista masline, varira ovisno o nizu čimbenika kao što su: podrijetlo, uvjeti skladištenja, udio vlage, klimatski uvjeti te stupanj kontaminacije tla (Delgado-Pertíñez i sur., 2000). Najvažnije komponente lista masline su fenolni spojevi ili polifenoli koji se definiraju kao sekundarni biljni metaboliti. No, treba napomenuti kako koncentracija fenola u listovima maslina varira ovisno o sorti masline, starosti biljke, količini padalina te o tome da li su listići sakupljeni sa strane koja je izloženija suncu ili one koja je manje izložena suncu budući da je koncentracija fenola gotovo trostruko viša na osunčanoj strani i sl. (Xie i sur. 2015)

Pritom, karakteristična skupina fenolnih spojeva za porodicu Oleaceae su sekoiridoidi (Talhaouia i sur., 2015). Najznačajniji predstavnik te skupine je oleuropein (slika 3), koji prisutan u visokim koncentracijama, u neprerađenim listovima i plodovima maslina dovodi do karakterističnog gorkog okusa. Razgradnjom oleuropeina nastaje hidroksitirosol, koji se karakterizira visokim antioksidacijskim kapacitetom (Erbay i Icier, 2010.), a prema istraživanjima Abaza i sur. iz 2015. te Jimeneza i sur. iz 2016. znanstveno su dokazana njegova antikancerogena, antidijabetička i kardioprotektivna svojstva.



Slika 3. Kemijska struktura oleuropeina i hidroksitirosola (Anonymous 3)

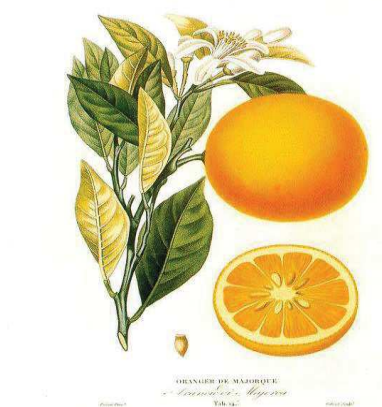
Od ostalih fenolnih spojeva valja spomenuti: flavone, flavonole, te supstituirane fenole. U sastavu lista masline nalaze se i komponente poput: hemiceluloznih vlakana arabinoznog tipa (Garcia-Maraver i sur., 2013), poliola od kojih dominira manitol u koncentraciji od 3 % (Guinda i sur., 2015). Aminokiselinski sastav uključuje alanin, arginin, glicin, leucin, prolin i valin (Martín - García i sur., 2003). Mineralni sastav uključuje visoke koncentracije fosfora, kalija i kloru u mladim listovima, dok je u starijim listovima pronađena visoka koncentracija magnezija. Prema istraživanju Alcázar - Romána i sur. iz 2014. razina cinka i kroma veća je u mladim listovima, dok u starijim prevladavaju bakar i nikal. Dnevnom uzimanjem 50 g osušenih listova maslina, temeljem istraživanja Cavalheira i sur. iz 2015. moguće je zadovoljiti 100% preporučenog dnevnog unosa navedenih minerala (Cavalheiro i sur., 2015).

Od davnih vremena ljudi diljem svijeta upotrebljavali su plod masline i njezino lišće kako bi liječili ili prevenirali niz različitih zdravstvenih oboljenja. Listići masline koristili su se kao osvježivači daha, dok se infuzija lista masline koristila kao narodni lijek za infekcije urinarnog sustava, suzbijanje vrućice, malarije, probavnih smetnji (Marić, 2017). U 2015. Abaza i sur. dokazali su da fenolni spojevi iz lišća masline mogu prevenirati, odnosno smanjiti rizik i ozbiljnost nekih kroničnih oboljenja na temelju provedenih eksperimenata na ljudima i životinjama. Ranije spomenuti oleuropein zahvaljujući antioksidacijskim svojstvima prevenira kardiovaskularne bolesti štiteći membrane od lipidne oksidacije (Somova i sur., 2003; Ferreira i sur., 2007), uzrokuje vazodilataciju (Singh i sur., 2008), brani stanice od oksidacijskog stresa uzrokovanog vodikovim peroksidima što je vrlo korisno u tretmanu dijabetesa tipa II (Cavalheiro i sur., 2015), dok hidroksitirozol djeluje slično kao i oleuropein (Somova i sur., 2003). Osim antihipertenzivnog, kardioprotektivnog i antioksidacijskog učinka koji su iskorišteni u farmaceutskoj industriji, sve

češća je primjena lišća masline u kozmetičke svrhe (Navarro i sur., 2016) budući da su uočena antimikrobna, antivirusna, antitumorska i antiupalna svojstva (Al-Attar i Alsalmi, 2017).

2.4 NARANČA

Slatka naranča (*Citrus sinensis* L.) (slika 4) je suptropska biljka iz porodice Rutaceae, roda Citrus. Smatra se kako potječe iz Azije kao i većina drugih citrusa. Danas se najviše uzgaja u područjima s tropskom i suptropskom klimom koja je najpogodnija za rast i razvoj drva naranče (Šajina, 2013). Duži niz godina najdominantnijim proizvođačem naranči smatra se Brazil pri čemu je 94% proizvodnje locirano u državi Sao Paulo. Prema novijim statističkim podacima, prognozira se kako će Brazil zabilježiti pad proizvodnje svježih naranči za oko 23% uslijed nepovoljnih vremenskih uvjeta, te oko 30% manju proizvodnju narančinog soka (USDA, 2018).



Slika 4. Naranča (Anonymous 4)

Plod naranče je ukusan i sočan, sastavljen od kore (flavedo), parenhimskog mezokarpa (albedo), sjemenke te sočnog mesa koje sadrži tzv. vrećice sa sokom. Karakterizira ga slatki, ugodni okus i fina aroma koja je iznimno cijenjena kod potrošača. Najčešće se jede svjež, prerađuje u narančin sok ili neke druge proizvode prehrambene industrije (npr. marmelada). Primijeniti se može u aromaterapiji i industriji parfema budući da prešanjem kore nastaje eterično narančino ulje, ono pokazuje antibakterijsku i antifungalnu aktivnost te se smatra efikasnim protiv gram pozitivnih bakterija (Franco-Vega i sur., 2016), također, najefektivnije je protiv plijesni *Aspergillus niger* (Viuda-Martos i sur., 2008) usporedno s ostalim eteričnim uljima citrusa.

Naranča se smatra bogatim izvorom antioksidanasa, kao što su askorbinska kiselina i fenolni spojevi. Askorbinska kiselina (vitamin C) je glavni prisutni vitamin u soku naranče, a slijede ga niacin, tiamin i vitamin B6; fenolni spojevi doprinose antioksidacijskom potencijalu ploda i njegovom okusu (Roussos, 2016) te se smatra kako antioksidativna aktivnost *C. sinensis* (L.) ovisi o količini fenolnih spojeva (Franco-Vega i sur., 2016). Među glavnim fenolnim spojevima koji se nalaze u soku naranče izdvajaju se hesperidin i narirutin, a zatim naringin (Gattuso i sur., 2007). Roussos, 2016. navodi kako je limunska kiselina dominantna organska kiselina u soku, ali su također detektirane i jabučna te jantarna kiselina, u najvećoj koncentraciji od ugljikohidrata zastupljena je saharoza, a slijede je fruktoza i glukoza (u jednoj litri soka naranče nalazi se oko 80 grama šećera). Isti izvor navodi kako je narančin sok odličan izvor aminokiselina, jedna od glavnih aminokiselina je prolin, zatim slijede asparagin, arginin i serin. Slatka naranča bogata je karotenoidima (uglavnom violaxantin, β -kriptoksantin, β -citaurin i lutein), a u nekoliko sorti likopen je glavni pigment (Roussos, 2016). Obojenost crvene naranče potječe od antocijana (Mondello, 2000). Najzastupljeniji mineral u soku naranče je kalij, nakon čega slijede dušik, fosfor i kalcij (Roussos, 2016). Svakako valja istaknuti i pektin kojeg najviše ima u albedu.

Najpoznatiji proizvod naranče je narančin sok (slika 5). Industrijska proizvodnja narančina soka započinje prihvatom sirovine te pranjem (grubo i fino) i probiranjem. Nakon toga slijedi sortiranje po veličini. Ekstrakcija se može provoditi na dva tipa ekstraktora: FMC ekstraktoru i Brown ekstraktoru. FMC ekstraktori rade na principu izdvajanja soka iz cijelih plodova i istovremenog uklanjanja kore, a Brown ekstraktori rade na principu rezanja plodova na polovice te izdvajanja soka iz svake polovice zasebno. Sok se potom odvodi na daljnju obradu, tj. fino usitnjavanje čestica na sitima sa rotacijskim elementima, nakon čega slijedi pasiranje i HTST pasterizacija kako bi se inaktivirali pektolitički enzimi. Provedba HTST pasterizacije (85-93°C, 30 sekundi) pokazala se kao bolji odabir od uobičajene pasterizacije budući da tako pasteriziran sok zadržava veće količine askorbinske kiseline za vrijeme skladištenja i ima bolja senzorska svojstva (Polydera i sur., 2003). Koncentrirani voćni sok naranče proizvodi se od voćnog soka naranče fizičkim izdvajanjem određene količine vode.



Slika 5. Narančin sok (Anonymous 5)

U prilog velikoj svjetskoj proizvodnji naranči ide činjenica da naranče i narančin sok imaju pozitivan učinak na zdravlje potrošača. Prema istraživanju Miyagia i sur. iz 2000. konzumacija nekoncentriranog narančinog soka povezana je sa smanjenjem razvoja tumora crijeva induciranih azoksimetanom (AOM) kod muških štakora za 22%. Za opaženo smanjenje tumorske mase, najvjerojatnije su odgovorni: hesperidin, drugi flavonoidi, limonin 17- β -D-glukopiranozid i drugi limonoidni glukozidi.

Za obogaćivanje osvježavajućih bezalkoholnih pića osim soka naranče, može se primjeniti i kora naranče. Kora slatke naranče bogat je izvor fenolnih spojeva koji imaju antidijabetička, antioksidacijska svojstva, učinkoviti su u borbi protiv gastrointestinalnih bolesti te predstavljaju potencijalnu zaštitu protiv različitih vrsta kancerogenih i kardiovaskularnih bolesti (Selmi i sur., 2017). Prema istraživanju Sathiyabama i sur. (2018.) ekstrakt dobiven primjenom metanola iz kore *C. sinensis* L. snižava razinu glukoze u krvi štakora s dijabetesom potičući signalizaciju inzulinskog receptora.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Sirovine za pripremu napitka

Za izradu eksperimentalnog dijela završnog rada korišteno je lišće masline prikupljeno u masliniku u Ravnim Kotarima u Republici Hrvatskoj. Listići masline predstavljaju mješavinu nekoliko sorti: sorta Orkula (90%), sorta Leccina (5%), dok ostatak predstavljaju sorte Marokanka i Garbunčela. Navedena sirovina transportirana je, nakon berbe, u kartonskim kutijama do laboratorija na

Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu nakon čega su listići raspoređeni u tankom sloju po stolovima i ostavljeni nekoliko dana da se osuše na sobnoj temperaturi. Koncentrirani sok naranče nabavljen je u suradnji s tvrtkom Stanić Beverages d.o.o. Hrvatska.

3.1.2 Priprema napitka lista masline

Za potrebe eksperimentalnog rada pripremljeno je 2500 mL napitka, pri čemu je omjer listića masline i vode bio 4 g u 100 mL. Lišće masline odvažuje se uporabom tehničke vage. Vaganju prethodi priprema lišća masline tako da se ono opere, procijedi i usitni na dužinu od otprilike 1 cm. Nakon toga, listići masline stavljaju su u destiliranu vodu koja je prethodno zagrijana do vrenja, kuhaju 3 minute, a potom i odstoje 10 minuta. Pripremljeni napitak procijedi se preko cjedila kako bi se uklonili listići masline i profiltrira pomoću filter papira.

3.1.3 Priprema napitka lista masline i koncentriranog soka naranče

Nakon što se pripremljeni napitak lista masline ohladio na sobnoj temperaturi, iskorišten je za pripremu napitka od lista masline i koncentriranog soka naranče. Pripremljena su 4 napitka volumena 250 mL tako da je pripremljeni napitak lista masline pomiješan s različitim volumenima koncentriranog soka naranče. Pri tome je u 100 mL pripremljenog napitka od lista masline dodano 2, 4, 6 ili 8 mL koncentriranog soka naranče.

3.1.4 Priprema napitka lista masline i koncentriranog soka naranče uz dodatak saharoze

Na prethodno opisani način pripremljena su još 4 napitka, volumena 250 mL, kao mješavina pripremljenog napitka od lista masline i koncentriranog soka naranče uz dodatak saharoze. Koncentrirani sok naranče i saharoza dodani su tako da je volumen dodanog koncentriranog soka naranče dvostruko umanjen te je dodana saharoza kako bi se postiglo da je topljiva suha tvar tako pripremljenog napitka sa saharozom jednaka topljivoj suhoj tvari istog napitka bez saharoze. Tako pripremljeni napitci pohranjeni su u prethodno oprane i osušene staklenke te su skladišteni u hladnjaku sve do provedbe analize.

U tablici 1 naveden je popis uzoraka s pripadajućim oznakama koje su korištene prilikom pisanja završnog rada. Slika 6 prikazuje priređene napitke od lista masline, koncentriranog soka naranče i saharoze.

Tablica 1. Popis uzoraka s pripadajućim oznakama

OZNAKA	UZORCI
Č	Napitak lista masline
K	Koncentrirani sok naranče
PRIPREMA NAPITAKA	
N1	98 mL napitka lista masline + 2 mL koncentriranog soka naranče
N2	96 mL napitka lista masline + 4 mL koncentriranog soka naranče
N3	94 mL napitka lista masline + 6 mL koncentriranog soka naranče
N4	92 mL napitka lista masline + 8 mL koncentriranog soka naranče
N5	98,5 mL napitka lista masline + 1 mL koncentriranog soka naranče + 0,55 g saharoze
N6	96,9 mL napitka lista masline + 2 mL koncentriranog soka naranče + 1,10 g saharoze
N7	95,3 mL napitka lista masline + 3 mL koncentriranog soka naranče + 1,70 g saharoze
N8	93,8 mL napitka lista masline + 4 mL koncentriranog soka naranče + 2,20 g saharoze



Slika 6. Napitci od lista masline, koncentriranog soka naranče i saharoze (vlastita fotografija)

3.2 Otapala i reagensi

1. Destilirana voda
2. Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka)
3. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

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

4. 100 %-tni metanol (Avantor Performance Materials, Poljska)
5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal; Sigma-Aldrich, Njemačka)
6. 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

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

3.3 Aparatura i pribor

Aparatura

1. Tehnička vaga K7 (E. Mettler, Zürich)
2. Analitička vaga AX224 (Ohaus Corporation, SAD)
3. Digitalni refraktometar (ATAGO, PAL, Japan)
4. SevenEasy pH-metar (Mettler Toledo, Švicarska)
5. Vortex MS2 (IKA, SAD)
6. Spektrofotometar UV – 1600 PC (VWR, SAD)
7. Vodena kupelj od rotavapora B 490 (Buchi Labortechnik AG, Švicarska)
8. Spectrophotometer CM-5, Chroma meter CR-5 (Konica Minolta)

Pribor

1. Menzure volumena 50 mL i 100 mL
2. Filter papir
3. Stakleni lijevak
4. Stakleni štapić
5. Odmjerna tikvica od 100 mL

6. Staklene kivete
7. Plastična ladica za vaganje
8. Metalna špatula
9. Staklene epruvete
10. Metalni stalak za epruvete
11. Mikropipete, volumena 200 i 1000 μL
12. Laboratorijske čaše

3.4 Metode rada

Tijekom izrade eksperimentalnog rada, korištene su sljedeće metode:

1. Metoda za određivanje topljive suhe tvari
2. Metoda za određivanje pH vrijednosti
3. Metoda CIELAB za određivanje boje
4. Metoda za određivanje senzorskih svojstava
5. Metoda za određivanje koncentracije ukupnih fenola
6. Metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Sve analize osim senzorske provedene su na dva paralelna uzorka i rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija.

3.4.1 Metoda za određivanje topljive suhe tvari

Princip određivanja:

Topljiva suha tvar ispitivanih uzoraka određena je primjenom ručnog digitalnog refraktometra (ATAGO, PAL, Japan).

Postupak određivanja:

Određivanje topljive suhe tvari temeljilo se na direktnom očitavanju topljive suhe tvari digitalnim refraktometrom. Prije početka mjerenja digitalni refraktometar potrebno je destiliranom vodom izbaždariti na nulu. Nakon toga, dio uzorka nanosi se na optičko okno te se pritiskom tipke „start“ na refraktometru očitava vrijednost topljive suhe tvari izražena u stupnjevima Brix-a ($^{\circ}\text{Brix}$).

3.4.2 Metoda za određivanje pH vrijednosti

Princip određivanja:

pH vrijednost ispitivanih uzoraka određena je primjenom pH-metra (Mettler Toledo, Švicarska) tako da se kombinirana elektroda uranja u uzorak na temelju čega se očitavala vrijednost na uređaju.

Postupak određivanja:

Postupku određivanja prethodi baždarenje pH-metra tako da se elektroda pH-metra ispiri destiliranom vodom i lagano suši staničevinom, nakon toga slijedi uranjanje kombinirane elektrode u laboratorijsku čašu s ispitivanim uzorkom. Sadržaj u laboratorijskoj čaši dobro se promiješa te se očita pH vrijednost. Nakon svakog mjerenja kombiniranu elektrodu potrebno je isprati destiliranom vodom, a mjerenje pH vrijednosti za svaki ispitivani uzorak ponoviti u dva slijeda.

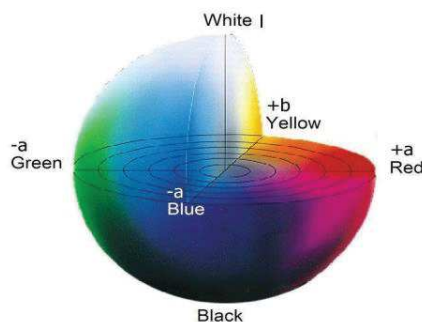
3.4.3 Metoda CIELAB za određivanje boje

Princip određivanja:

CIELAB sustav za prikaz boje (slika 7) trodimenzionalni je prostor boja temeljen na objektivnom vrednovanju boja te je najbliži vizualnoj percepciji.

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^** označava svjetlinu boje ili luminaciju iskazanu vrijednostima od 0 do 100 (0=crno, 100=bijelo). *Parametar a^** iskazuje spektar od crvene (pozitivne vrijednosti) do zelene (negativne vrijednosti) boje. Veća pozitivna vrijednost parametra a^* podrazumijeva crveniju boju. *Parametar b^** ukazuje na spektar nijansi između žute i plave boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra (McGuire, 1992).



Slika 7. CIELAB sustav boja (Anderson, 2016.)

Postupak određivanja:

Pripremljenom napitku lista masline i koncentriranog soka naranče uz dodatak saharoze, određivale su se L^* , a^* , b^* , H° i C vrijednosti CIELAB metodom (CIE, 1976). Prije mjerenja kolorimetar je baždaren bijelom i crnom pločicom isporučenima s instrumentom. Mjerenje je započeto postavljanjem kivete s pripremljenim napitkom u posebno predviđeno mjesto u uređaju, uređaj izvršava mjerenje, a na zaslonu računala ispisuju se vrijednosti parametara L , a^* i b^* na temelju kojih je moguće izračunati vrijednost za H° ili ton boje, odnosno C ili zasićenost boje. Iz parametara a^* i b^* izračunavaju se vrijednosti za H° prema formuli (1) te C prema formuli (2).

$$H^\circ = \arctg (b^*/a^*) \quad (1)$$

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

3.4.4 Metoda za određivanje senzorskih svojstava

Princip određivanja:

Za određivanje pojedinih senzorskih svojstava pripremljenog napitka provedena je kvantitativna deskriptivna analiza (QDA). U navedenoj metodi panelisti identificiraju i kvantitativno određuju osjetilna svojstva proizvoda i svojstva sastojaka kako bi se na temelju njih donijela odluka o kakvoći samog proizvoda.

Postupak određivanja:

Senzorsko ispitivanje u ovom eksperimentalnom radu provodila je grupa od 10 panelista koju je činilo 9 žena i 1 muškarac. U svrhu kvantitativnog izražavanja intenziteta senzorskih svojstava

pripremljenog napitka, korištena je skala od 1 do 10 (1=neizraženo svojstvo, 10=maksimalno izraženo svojstvo) te je svaki od ispitivača ocjenom obilježavao intenzitet svakog pojedinog senzorskog svojstva za svaki od uzoraka na ocjenjivačkom listiću (slika 8), izrađenom za tu svrhu. Uzorci su bili ponuđeni u označenim plastičnim prozirnim čašama te prethodno temperirani na sobnu temperaturu. Ocijenjena su sljedeća senzorska svojstva i korišteni su sljedeći opisni pojmovi: boja (intenzitet), miris (na list masline, na naranču, strani), okus (slatko, kiselo, gorko, na list masline, na naranču, harmonični, strani) i aroma (na list masline, na naranču, strana). Rezultati senzorske analize najjednostavnije se prikazuju grafički u obliku „paukove mreže”.

Ocjenjivač:					Datum:									
Uzorak	BOJA	MIRIS			OKUS						AROMA			
	intenzitet	Na list masline	Na naranču	Strani	Slatko	Kiselo	Gorko	Na list masline	Na naranču	Harmonični	Strani	Na list masline	Na naranču	Strana
0														
N1														
N2														
N3														
N4														
N5														
N6														
N7														
N8														

Skala: 0-10 (0-neizraženo svojstvo; 10-max. izraženo svojstvo)

Slika 8. Ocjenjivački listić korišten za senzorsku analizu pripremljenih napitaka

3.4.5 Metoda za određivanje koncentracije ukupnih fenola

Princip određivanja:

Određivanje ukupne koncentracije fenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji između Folin-Ciocalteu reagensa i reducirajućeg reagensa, polifenola. Folin-Ciocalteu reagens smjesa je dviju kiselina – fosfowolframove i fosfomolibdenske, koje se reduciraju u wolframov oksid i molibden oksid. Uz to, fenolne tvari koje su prisutne oksidiraju. Nastaje plavo obojeni kompleks koji je intenzivniji što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

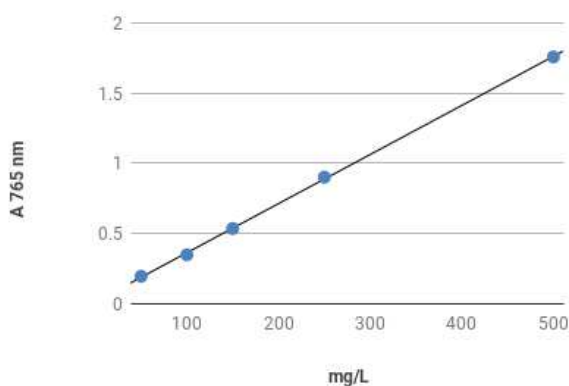
Postupak određivanja:

U svrhu određivanja koncentracije ukupnih fenola, pripremljeni uzorci prethodno su razrijeđeni tako da su uzorci N3 i N4 razrijeđeni 5 puta, a uzorci koncentriranog soka naranče 30 puta. Svi ostali uzorci, uključujući uzorak Č nisu bili razrijeđeni.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvage se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te 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 nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za slijepu probu uzima se 100 μ L destilirane vode.. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 9). Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 9. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Račun:

Iz dobivenih apsorbancija pri izradi baždarnog pravca u Excelu izračuna se jednadžba pravca prema formuli (3):

$$y=0,0035x \quad (3)$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)

Izračunata koncentracije galne kiseline (x) ovisno o uzorku množi se s faktorom razrijeđenja te se dobivena vrijednost dijeli s 1000 kako bi se dobila vrijednost ukupnih fenola u mg/mL.

3.4.6 Metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip određivanja:

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH radikala temelji se na sposobnosti antioksidansa da reducira slobodni radikal, tj. da dođe do sparivanja nesparenog elektrona u reakciji DPPH radikala s fenolima (fenoli iz napitka lista masline) te dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu, što se na spektrofotometru bilježi kao pad apsorbancije pri 517 nm (Prior i sur., 2005).

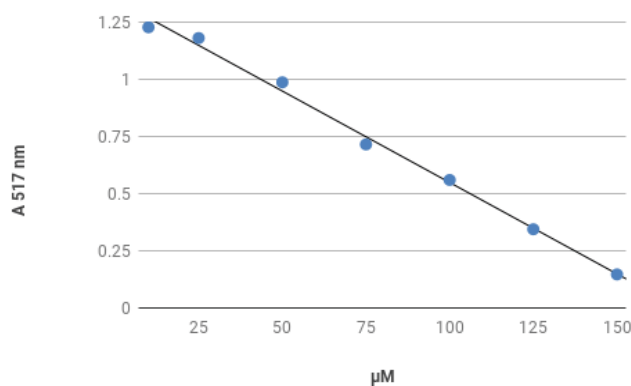
Postupak određivanja:

U svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta, pripremljeni uzorci prethodno su razrijeđeni tako da su uzorci N1, N2, N5, N6, N7 i N8 razrijeđeni 5 puta, uzorci N3 i N4 10 puta, a uzorci koncentriranog soka naranče 20 puta. Uzorak Č nije bio razrijeđen.

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakata te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 ml 100% 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. Ukoliko su izmjerene apsorbancije manje od 0,1 ekstrakta uzoraka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1mM otopina Troloxa (6-hidroksi- 2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaže 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od 1mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 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% 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. Baždarni pravac za otopinu troloxa prikazan je na slici 10.



Slika 10. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Troloxa.

Račun:

Iz dobivenih apsorbancija pri izradi baždarnog pravca u Excelu izračuna se jednadžba prema formuli (4):

$$y = -0,008x + 1,3476 \quad (4)$$

pri čemu je:

y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

x – ekvivalent Troloxa (TAE) (μM)

Izračunata vrijednost za ekvivalent Troloxa (x) množi se s faktorom razrjeđenja ovisno o uzorku te dijeli s 1000 kako bi se dobila vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u $\mu\text{mol/mL}$.

4 REZULTATI I RASPRAVA

Na temelju provedenog eksperimentalnog dijela dobiveni su rezultati prikazani tabelarno i grafički. Rezultati mjerenja topljive suhe tvari i pH vrijednosti pripremljenog napitka lista masline (Č), koncentriranog soka naranče (K) i napitaka dobivenih miješanjem napitka lista masline i koncentriranog soka naranče bez dodatka saharoze (N1-N4), odnosno napitaka dobivenih miješanjem napitka lista masline i koncentriranog soka naranče s dodatkom saharoze (N5-N8) prikazani su u tablici 2 (rezultati mjerenja topljive suhe tvari), odnosno tablici 3 (rezultati mjerenja pH vrijednosti). Tablica 4 prikazuje dobivene parametre boje. Ocjenjivanje senzorskih svojstava pripremljenih napitaka (N1-N8) prikazano je grafički u obliku „paukove mreže“ na slici 11. Rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola za pripremljene napitke (N1-N8), prikazani su na slici 12. Koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta napitka lista masline (Č) i koncentriranog sok naranče (K) prikazani su u tablici 5. Rezultati antioksidacijskog kapaciteta za pripremljene napitke (N1-N8) nalaze se na slici 13.

Tablica 2. Rezultati mjerenja topljive suhe tvari

UZORCI	Topljiva suha tvar (%)
Č	0,25±0,1
K	55,7±0,0
N1	1,4±0,0
N2	2,5±0,0
N3	3,8±0,0
N4	4,7±0,0
N5	1,5±0,0
N6	2,6±0,0
N7	3,8±0,0
N8	4,7±0,0

Vrijednost topljive suhe tvari u napitku lista masline iznosi 0,25 %. Tako niska vrijednost suhe tvari usporedno s ostalim uzorcima je opravdana budući da su ugljikohidrati u biljnim ekstraktima zastupljeni u niskim udjelima (Kapo, 2017). No, treba napomenuti kako udio suhe tvari značajno ovisi i o primijenjenoj metodi ekstrakcije, tako je u radu Kapo (2017) udio topljive suhe tvari u ekstraktu lista masline iznosio 0,6 %. Razlog tomu je priprema biljnog ekstrakta kuhanjem na

povratnom hladilu 30 min što je značajno duži i iscrpniji postupak no kuhanje 3 min i stajanje 10 min za pripremu napitka u ovome radu.

Vrijednost topljive suhe tvari u koncentriranom soku naranče iznosi 55,7 % što je približno podacima u literaturi (Scott i Morgan, 1959). Raspon topljive suhe tvari (%) u pripremljenim napitcima (N1-N8) iznosi od 1,4 do 4,7 %. Također, vidljivo je kako napitci N1-N4 usporedno s napitcima N5-N8 imaju jednake ili približno jednake vrijednosti topljive suhe tvari, što je očekivano s obzirom da su napitci sa saharozom pripremani tako da imaju topljivu suhu tvar jednaku onoj u napitku bez saharoze.

Tablica 3. Rezultati mjerenja pH vrijednosti

UZORCI	pH
Č	5,64±0,00
K	3,92±0,00
N1	4,34±0,00
N2	4,22±0,00
N3	4,15±0,00
N4	4,13±0,00
N5	4,42±0,00
N6	4,30±0,00
N7	4,21±0,00
N8	4,20±0,00

pH vrijednost izmjerena u napitku lista masline iznosi 5,64 što je slično vrijednosti izmjerenoj u radu Kapo (2017) gdje je iznosila 5,35. Vidljivo je kako napitak lista masline ima najvišu pH vrijednost usporedno s ostalim uzorcima, a razlog tomu je niski udio organskih kiselina u biljnoj vrsti iz koje je ekstrakt pripremljen (Haciseferogullari i sur., 2007).

Koncentriranom soku naranče izmjerena je pH vrijednost 3,92 što je za nekoliko jedinica viša vrijednost no ona izmjerena u radu Obasi i sur. (2017) mjerena na isti način (3,4). Postotak ukupnih kiselina u naranči iznosi 0,67 što ukazuje da se pH vrijednost naranče (3,74) poklapa s niskim sadržajem ukupnih kiselina (Dobričević i sur., 2016). U soku naranče dominantna je limunska kiselina, a detektirane su jabučna te jantarna kiselina (Roussos, 2016). Promatrajući napitke pripremljene bez dodatka saharoze (N1-N4) uočljivo je kako pH vrijednost pripremljenog napitka lista masline i koncentriranog soka naranče pada kako se dodaje sve veći volumen

koncentriranog soka naranče. Tako je u napitku N4 u kojem je dodano 8 mL koncentriranog soka naranče na 100 mL napitka lista masline izmjerena najniža pH vrijednost.

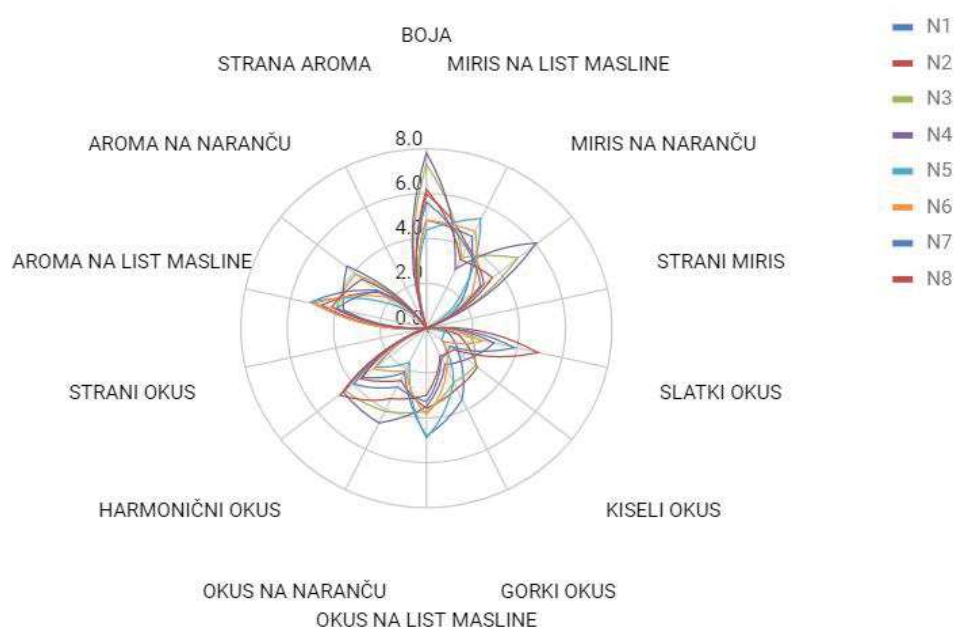
Promatrajući napitke pripremljene s dodatkom saharoze (N5-N8) vidljivo je da je najniža pH vrijednost izmjerena u napitku s najvećim dodanim volumenom koncentriranog soka naranče (N8). Također, napitci u koje je dodana saharoza (N5-N8) imaju nešto višu pH vrijednosti nego napitci u koje nije dodana saharoza (N1-N8), a razlog je manje udio koncentriranog soka naranče.

Tablica 4. Vrijednosti parametara dobivenih određivanjem boje CIELAB metodom

UZORCI	L*	a*	b*	H°	C
Č	97,34±0,01	-1,78±0,01	11,39±0,01	98,87±0,01	11,52±0,01
K	21,87±0,06	31,25±0,00	37,71±0,00	50,35±0,0	48,97±0,00
N1	92,05±0,00	-1,19±0,00	26,50±0,01	92,58±0,01	26,53±0,01
N2	88,02±0,01	-0,18±0,01	36,19±0,01	90,29±0,03	36,19±0,01
N3	84,74±0,00	0,95±0,00	43,84±0,00	88,76±0,00	43,85±0,00
N4	80,67±0,01	2,56±0,01	50,83±0,00	87,12±0,02	50,90±0,01
N5	94,72±0,00	-1,71±0,01	19,62±0,00	94,98±0,04	19,69±0,00
N6	91,94±0,00	-1,20±0,00	26,65±0,01	92,58±0,00	26,68±0,01
N7	90,35±0,00	-0,87±0,01	31,21±0,01	91,60±0,03	31,23±0,01
N8	88,72±0,00	-0,38±0,01	35,23±0,01	90,62±0,03	35,23±0,01

Parametar L* pokazuje svjetlinu boje, a iz dobivenih rezultata vidljivo je kako napitak lista masline ima najvišu vrijednost parametra L*, odnosno najsvjetlije je obojen, dok je koncentrirani sok naranče najtamniji (21,87). Za napitke (N1-N8) vrijednosti se kreću u rasponu od 80,67 (N4) do 94,72 (N5). U uzorak N4 dodan je najveći volumen koncentriranog soka naranče, stoga je taj uzorak najtamniji. Po svjetlini, L*, i udjelu koncentriranog soka prati ga N8, dok su primjerice u uzorke N1, posebno N5 dodani najmanji volumeni koncentriranog soka, pa su ti napitci i najsvjetliji, posebice N5. Parametar a* poprima pozitivne vrijednosti za crvene boje i negativne vrijednosti za zelene boje, na temelju toga, jasno je kako će uzorak Č imati negativnu vrijednost zbog prisustva klorofila, a uzorak K pozitivnu vrijednost zbog prisustva karotenoida. Raspon za ostale uzorke (N1-N8) iznosi od -1,71 (N5) do 2,56 (N4). Parametar b* ukazuje na spektar nijansi između žute i plave boje, što je njegova vrijednost veća, izraženija je žuta boja spektra. Raspon

vrijednosti kreće se od 11,39 (Č) do 50,83 (N4) što je i za očekivati budući da uzorak N4 sadrži najveću dodanu količinu koncentriranog soka naranče koji je bogat karotenoidima. Vrijednosti vizualnog doživljaja boje (H°) kreću se od 98,87 (Č) do 50,35 (K) što je u skladu s definiranim vrijednostima parametra H° , tj. oko 90° žuta boja (McGuire, 1992). Parametar C označava čistoću ili zasićenost boja, a raspon vrijednosti se kreće od 11,52 (Č) do 50,90 (N4). Niža vrijednost podrazumijeva slabiju zasićenost boje. Budući da pripremljeni napitci (N1-N8) poprimaju manje ili više narančastu boju, prema istraživanju Fernández-Vázquez i sur. (2011.) bili bi dobro prihvaćeni od strane potrošača koji više preferiraju tu boju napitka nego crvenu, odnosno žutu.



Slika 11. Rezultati senzorske analize napitaka lista masline i koncentriranog soka naranče

Rezultati senzorske analize prikazani su grafički u obliku „paukove mreže” na slici 11.

Intenzitet određenog obilježja (ocjena) najniži je u centru, a povećava se prema obodu polarnog dijagrama. Dijagram ima 14 krakova i svaki od njih predstavlja jedno senzorsko obilježje, a linije između krakova predstavljaju intenzitet promjena odnosno ocjenu (Vahčić i sur., 2000).

Intenzitet boje pripremljenih napitaka određen je u rasponu od 4,4 (N5) do 7,8 (N4) što navodi na zaključak da napitci poprimaju intenzivnije obojenje dodatkom većeg volumena koncentriranog soka naranče. Promatrajući dobivene rezultate za senzorsko svojstvo „miris” vidimo kako je panelistima miris na list masline najizraženiji u napitku N5 (5,4), a na naranču u napitku N4 (6,1).

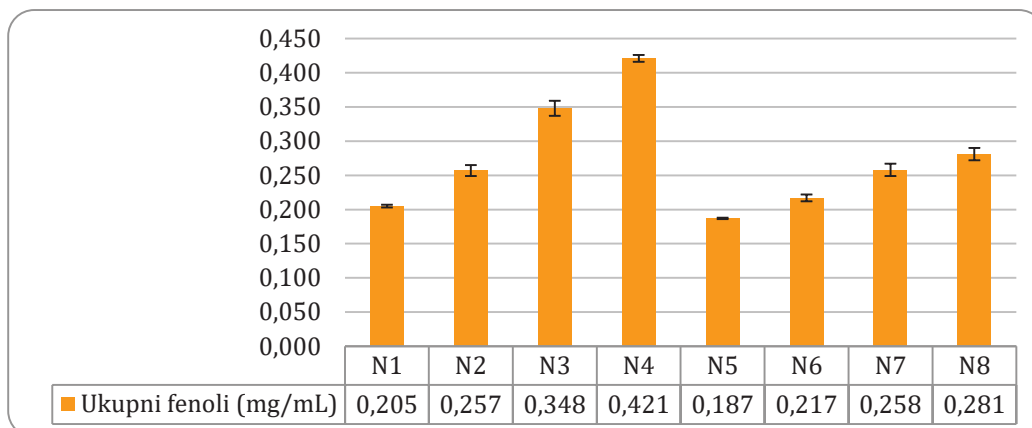
Općenito gledajući, raspon vrijednosti za miris na list masline kreće se od 2,9 (N4) do 5,4 (N5), a za miris na naranču od 1,5 (N5) do 6,1 (N4).

Kao najsladi napitak ocijenjen je N8 (dodana najveća količina saharoze), kao najkiseliji N2 (rezultat nije očekivan, budući da napitak N2 ima u pola manji volumen dodanog soka no N4 za koji je očekivano da je najkiseliji), kao najgorči N1, a na temelju raspona vrijednosti od 1,4 (N8) do 3,6 (N1) vidljivo je kako dodatkom koncentriranog soka naranče, ali i saharoze, opada intenzitet gorkog okusa pripremljenih napitaka. Raspon vrijednosti za senzorsko svojstvo „okus na list masline“ kreće se od 3,0 (N8) do 4,9 (N5). Očekivano je kako će uzorak N1 imati najizraženiji okus na list masline, no neznatna su odstupanja između uzorka N1 i N5. Najintenzivniji okus na naranču ima napitak N4 budući da je u njega dodan najveći volumen koncentriranog soka.

Najharmoničniji napitak je N8 (4,8) u koji je dodan najveći volumen koncentriranog soka i saharoze, no uz neznatnu razliku slijedi ga N4 (4,6), napitak iste suhe tvari, ali bez saharoze, što nutritivno gledano predstavlja prednost nad napitkom N8. Najmanje harmoničan je napitak N5 (2,8). Uslijed dodatka veće koncentracije soka naranče smanjivala se izraženost arome na list masline, a rasla je izraženost arome na naranču. U pripremljenim napitcima, aroma na list masline određena je u rasponu od 3,7 (N4) do 5,1 (N1), a aroma na naranču u rasponu od 1,5 (N5) do 4,4 (N4). Strana aroma nije zabilježena u pripremljenim napitcima.

Tablica 5. Koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet pripremljenog napitka lista masline i koncentriranog soka naranče

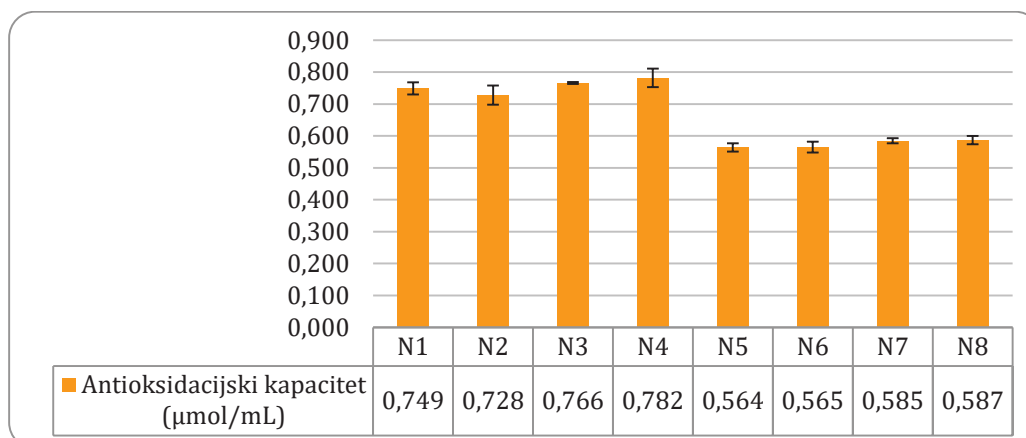
UZORAK	UKUPNI FENOLI [mg/mL]	ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET [μmol/mL]
Č	0,142±0,000	0,148±0,000
K	3,724±0,006	2.928±0,005



Slika 12. Koncentracija ukupnih fenola napitaka lista masline i koncentriranog soka naranče

Koncentracija ukupnih fenola najmanja je u napitku lista masline (Č) usporedno s pripremljenim uzorcima (N1-N8) za koje se raspon vrijednosti ukupnih fenola (izražen u mg/mL) kretao od 0,205 (N1) do 0,421 (N4) za pripremljene napitke bez dodatka saharoze, te od 0,187 (N5) do 0,281 (N8) za pripremljene napitke s dodatkom saharoze. Usporedno, koncentrirani sok naranče (K) puno je bogatiji fenolnim spojevima no napitak lista masline (Č). Zaključno, koncentracija ukupnih fenola povećava se s povećanjem volumena dodanog koncentriranog sok naranče u bazični napitak, tj. napitak N4 pokazuje najveću koncentraciju ukupnih fenola od svih napitaka budući da je u njega dodan najveći volumen koncentriranog soka naranče.

Uvidom u istraživanje Ivanković (2017) koncentracija ukupnih fenola u napitku lista masline prije skladištenja iznosila je 0,276 mg/mL što je gotovo dvostruko veća vrijednost od one dobivene u ovom radu. Budući da su korišteni listići i postupak pripreme napitka isti u oba rada, razlika u koncentraciji ukupnih fenola može biti posljedica korištenja jedne godine starijih listića. Temeljem brojnih radova na različitim supstratima, dokazano je kako skladištenje utječe na smanjenje koncentracije ukupnih fenola, u prilog tomu ide i činjenica da je nakon 12 tjedana skladištenja pri temperaturi od 8°C koncentracija ukupnih fenola u napitku lista masline iznosila 0,234 mg/mL (Ivanković, 2017). Koncentracija ukupnih fenola, izražena u mg/mL za koncentrirani sok naranče, prema provedenom ispitivanju iznosi 3,724. Navedena vrijednost je viša od one dobivene u radu Mastello i sur. 2012. 70,7 mg/100 mL, gdje je kao supstrat korišten smrznuti koncentrirani sok naranče, ali u obzir valja uzeti brojne čimbenike koji utječu na udio fenola poput: sorte, klimatskih uvjeta za vrijeme dozrijevanja, uvjeta prerade i smrzavanja te skladištenja i starosti koncentrata.



Slika 13. Antioksidacijski kapacitet napitaka lista masline i koncentriranog soka naranče

Antioksidacijski kapacitet najmanji je u napitku lista masline (Č) usporedno s pripremljenim uzorcima (N1-N8) za koje se raspon vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (izražen u $\mu\text{mol/mL}$) kretao od 0,728 (N2) do 0,782 (N4) za pripremljene napitke bez dodatka sahara, te od 0,564 (N5) do 0,587 (N8) za pripremljene napitke s dodatkom sahara. Usporedno, koncentrirani sok naranče (K) ima puno veći antioksidacijski kapacitet no napitak lista masline (Č). Uvidom u istraživanje Ivanković (2017) antioksidacijski kapacitet u napitku lista masline prije skladištenja iznosi 0,146 $\mu\text{mol/mL}$ što je gotovo identično rezultatu dobivenom u ovom radu (0,148 $\mu\text{mol/mL}$). Nakon 12 tjedana skladištenja pri temperaturi od 8°C antioksidacijski kapacitet istog napitka bio je gotovo isti, što dovodi do zaključka da skladištenje ne utječe značajno na promjenu antioksidacijskog kapaciteta (Ivanković, 2017). Ahmad-Quasem i sur. (2015.) također su u svojoj studiji došli do istog zaključka određivanjem antioksidacijskog kapaciteta fenola u ekstraktu lista masline (etanol-voda, 80:20) skladištenog 28 dana pri 4°C, pri čemu su mjerenja izvođena svakih 7 dana. Koncentrirani sok naranče ima najveći antioksidacijski kapacitet u odnosu na pripremljene napitke (N1-N8). Njegovim dodatkom raste antioksidacijski kapacitet iako se veća razlika uočava općenito između napitaka bez dodanog šećera (N1-N4) u odnosu na one s dodanim šećerom (N5-N8), a manja obzirom na povećanje udjela soka. Visok antioksidacijski kapacitet proizlazi iz kemijskog sastava sirovine iz koje se sok dobiva, naime naranča je bogata askorbinskom kiselinom (72,01 mg/100g; Dobričević i sur., 2016) ukupnim fenolima (113,95 mgGAE/100g; Dobričević i sur., 2016) i pigmentnim spojevima (β -karoten (μg %) 135,99; Dobričević i sur., 2016) koji djeluju kao antioksidansi, tj. sprječavaju štetno djelovanje slobodnih radikala u tijelu. Općenito,

antioksidacijski kapacitet u korelaciji je sa sadržajem fenola, vitamina i ostalih bioaktivnih spojeva (Zayova i sur., 2013).

5 ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog eksperimentalnog rada, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Baza za izradu napitaka bio je napitak lista masline, čija vrijednost topljive suhe tvari (%) iznosi $0,25 \pm 0,1$ i pH vrijednost $5,64 \pm 0,00$. Dodatkom koncentriranog soka naranče u napitak lista masline dolazi do linearnog povećanja topljive suhe tvari te je izmjereno maksimalno 4,7 %, kao i smanjenja pH vrijednost do najnižih 4,12 u napitku s najviše soka.
2. Napitak lista masline (Č) ima najvišu vrijednost parametra L^* , odnosno najsvjetlije je obojen, ima negativnu vrijednost parametra a^* , najmanju vrijednost parametra b^* , vizualni doživljaj boje (H°) oko 90° sukladno svojoj žućkastoj boji te najnižu vrijednost parametra C. S povećanjem volumena dodanog koncentriranog soka naranče, parametar a^* raste, ali samo u napitcima s najvećim udjelom koncentriranog soka naranče (N3 i N4) postaje pozitivan, također, parametar b^* (udio žute boje) i C (zasićenost boje) rastu dok se ton boje H° smanjuje, ali ostaje u žutom području.
3. Temeljem provedene senzorske analize pripremljenih napitaka, uočeno je kako napitci poprimaju intenzivnije obojenje dodatkom većeg volumena koncentriranog soka naranče. Također, dodatkom većeg volumena koncentriranog soka, ali i saharoze, smanjuje se miris na list masline, gorki okus, okus na list masline i aroma na list masline, a povećava se miris na naranču, slatki okus, okus na naranču i aroma na naranču. Najharmoničniji napitak bio je N8 u koji je dodan najveći volumen koncentriranog soka i saharoze, no uz neznatnu razliku slijedi ga N4, napitak iste suhe tvari, ali bez saharoze, što nutritivno gledano predstavlja prednost nad napitkom N8.
4. Koncentracija ukupnih fenola povećava se s povećanjem volumena dodanog koncentriranog soka naranče u bazični napitak (0,142 mg/mL), te je najveća vrijednost određena u napitku N4 (0,421 mg/mL) .

5. Antioksidacijski kapacitet se višestruko povećao u odnosu na bazični napitak (0,148 $\mu\text{mol/mL}$) i najveća vrijednost je određena u napitku s najviše dodanog soka N4 (0,782 $\mu\text{mol/mL}$).
6. S obzirom na udio fenolnih spojeva, opću prihvaćenost i antioksidacijski kapacitet pripremljenih napitaka može se zaključiti kako oni predstavljaju prihvatljiv pravac za kreiranje inovativnih i funkcionalnih napitaka.

6 LITERATURA

1. 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.
2. Ahmad-Qasem M. H., Ahmad-Qasem B. H., Barrajon-Catalan E., Micol V., Carcel J. A., Garcia-Perez J. V (2016) Drying and storage of olive leaf extracts. Influence on polyphenols stability. *Industrial Crops and Products* **79**: 232 – 239.
3. Al-Attar, A. M., Alsalmi, F. A. (2017) Effect of *Olea europaea* leaves extract on streptozotocin induced diabetes in male albino rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **17**, 1 - 37.
4. 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.
5. Anderson B. (2016). One RGB model, many RGB spaces. <<http://colorblindtools.blogspot.com/2016/11/one-rgb-model-many-rgb-spaces.html>> Pristupljeno 31. kolovoza 2018.
6. Anonymous 1, <<https://moodle.srce.hr/2016-2017/course/view.php?id=18174>> Pristupljeno 06. rujna 2018.
7. Anonymous 2, <<http://www.unoportal.net/2018/03/29/grancice-maslina-u-sluzbi-zdravlja/>>Pristupljeno 06. rujna 2018.
8. Anonymous 3, <<https://eu.fotolia.com/tag/oleuropein> ; <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxytyrosol>> Pristupljeno 06. rujna 2018.
9. Anonymous 4, <https://en.wikipedia.org/wiki/Orange_oil>Pristupljeno 06. rujna 2018.
10. Anonymous 5, <<http://www.adrenalin.hr/ostalo/zdravlje-prehrana/naranca-ujutro-zlato-u-podne-srebro-a-navecer-bronca/>> Pristupljeno 06. rujna 2018.

11. Ashurst P. R. (2005) Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices, 2.izd., Blackwell Publishing, Hereford, UK.
12. Barbosa C., Kato M., Buzalaf M. (2011) Effect of supplementation of soft drinks with green tea extract on their erosive potential against dentine. *Australian Dental Journal* **56(3)**: 317 – 321.
13. Bruna G. O. L., Thais A. C. C., Lígia A. C. C. (2018) Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology* **17(10)**: 306 – 310.
14. Cabrera C., Artacho R., Giménez R. (2006) Beneficial effects of green tea—a review. *The Journal of the American College of Nutrition* **25 (2)**: 79 - 99.
15. CIE, Commission Internationale de l'Eclairage (1976) Official recommendations on uniform colour spaces, colour differences equations and metric colour terms. Paris: France.
16. Damiani E., Bacchetti T., Padella L., Tiano L., Carloni P. (2014). Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis* **33(1)**: 59 - 66.
17. 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.
18. Dhingra R., Sullivan L., Jacques P. F., Wang T. J., Fox C. S., Meigs J. B., Vasan R. S. (2007) Soft Drink Consumption and Risk of Developing Cardiometabolic Risk Factors and the Metabolic Syndrome in Middle-Aged Adults in the Community. *Circulation* **116(5)**: 480 – 488.
19. Dobričević N., Voća S., Žlabur J. Š., Galić A., Plišić S., Dunđer T. (2016) Uporaba komercijalnih sokovnika u pripremi svježih sokova. *J. Agric. Eng.* **10**: 455 - 459.
20. Erbay Z., Icier F. (2010) The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International* **26**: 319 - 334.
21. Fernández-Vázquez R., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez A. J., Heredia F. J., Vicario I. M. (2011) Visual and instrumental evaluation of orange juice color: a consumers' preference study. *Journal of sensory studies* **26(6)**: 436 – 444.
22. Ferreira I. C. F. R., Barros L., Soares M. E., Bastos M. L., Pereira J. A. (2007) Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry* **103**: 188 - 195.
23. Franco-Vega A., Reyes-Jurado F., Cardoso-Ugarte G. A., Sosa-Morales M. E., Palou E., López-Malo A. (2016) Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Oils. Essential Oils in Food Preservation, *Flavor and Safety*, 783 – 790.

24. Friedman M., Ki, S.Y., Lee S.J., Han G.P., Han J.S., Lee K.R., Kozukue N. (2005) Distribution of Catechins, Theaflavins, Caffeine and Theobromine in 77 Teas Consumed in the United States. *J. Food Sci.* **70**: 550 - 559.
25. 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.
26. Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U., Caristi C., 2007. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules* **12**: 1641 – 1673.
27. Greenwood D. C., Threapleton D. E., Evans C. E. L., Cleghorn C. L., Nykjaer C., Woodhead C., Burley V. J. (2014) Association between sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks and type 2 diabetes: systematic review and dose–response meta-analysis of prospective studies. *British Journal of Nutrition* **112(05)**: 725 – 734.
28. Guinda A., Castellano J. M., Santos-Lozano J. M., Delgado-Hervás T., Gutiérrez-Adán P., Rada M. (2015) Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *Food Science and Technology* **64**: 431 - 438.
29. Haciseferoğulları H., Gezer I., Özcan M. M., MuratAsma B. (2007) Post-harvest chemical and physical–mechanical properties of some apricot varieties cultivated in Turkey. *J. Food Eng.* **79**: 364 - 373.
30. Hodge A. M., Bassett J. K., Milne R. L., English D. R., Giles G. G. (2018) Consumption of sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks and risk of obesity-related cancers. *Public Health Nutrition* **21(09)**: 1618 – 1626.
31. Hutchings S. C., Low J. Y. Q., Keast R. S. J. (2018) Sugar reduction without compromising sensory perception. An impossible dream? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1 – 21.
32. Ivanković M. (2017) Stabilnost napitka od lista masline tijekom skladištenja pri sniženoj temperaturi. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
33. Jiménez P., García P., Bustamante A., Barriga A., Robert P. (2016) Thermal stability of oils added with avocado (*Persea americana* cv. Hass) or olive (*Olea europaea* cv. Arbequina) leaf extracts during the French potatoes frying. *Food Chem.* **221**: 123 - 129.
34. Kao Y.H., Hiipakka R.A., Liao S.S. (2000) Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* **141**: 980 - 987.

35. Kapo A. (2017) Primjena biljnih ekstrakata u proizvodnji funkcionalnih napitaka. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
36. Khan N., Mukhtar H. (2007) Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences* **81**: 519 - 533.
37. Marić M., (2017) Utjecaj pripreme i vremena stajanja na parametre boje i ukupne fenole napitka od lista masline. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
38. 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.
39. Mastello R. B., Bisconsin A. Jr., Barbosa E., Bonifácio M., Monteiro M. (2012) Total antioxidant activity and total phenolic compounds of orange juice. IX Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, Araraquara: Brazil
40. McGuire R. G. (1992) Reporting of objective colour measurements. *Horticultura Science* **27**(12): 1254 - 1255.
41. Miyagi Y., Om A. S., Chee K. M., Bennink, M. R. (2000) Inhibition of Azoxymethane-Induced Colon Cancer by Orange Juice. *Nutrition and Cancer* **36**(2): 224 – 229.
42. Mondello L., Cotroneo A., Errante G., Dugo G., Dugo P. (2000) Determination of anthocyanins in blood orange juices by HPLC analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **23**(1): 191 – 195.
43. Navarro M., Morales F. J. (2016) Evaluation of an olive leaf extract as a natural source of antiglycative compounds. *Food Res. Int.* **92**, 56-63.
44. Obasi B. C., Whong C. M. Z., Ameh J. B. (2017). Nutritional and sensory qualities of commercially and laboratory prepared orange juice. *African Journal of Food Science*, **11**(7): 189 – 199.
45. Oliveira D., Galhardo J., Ares G., Cunha L., Deliza R. (2018) Sugar reduction in fruit nectars: Impact on consumers' sensory and hedonic perception. *Food Research International* **107**: 371 - 377.
46. Pase M. P., Himali J. J., Jacques P. F., DeCarli C., Satizabal C. L., Aparicio H., Seshadri S. (2017). Sugary beverage intake and preclinical Alzheimer's disease in the community. *Alzheimer's & Dementia* **13**(9): 955 – 964.

47. Polydera A. ., Stoforos N., Taoukis P. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering* **60(1)**: 21 – 29.
48. Pravilnik o temeljnim zahtjevima za osvježavajuća bezalkoholna pića i soda-vodu (1997) *Narodne novine* **23** (NN 23/1997)
49. 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.
50. Roussos P. A. (2016). Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Nutritional Composition of Fruit Cultivars, 469 – 496.
51. Sathiyabama R. G., Rajiv Gandhi G., Denadai M., Sridharan G., Jothi G., Sasikumar P., Gurgel R. Q. (2018). Evidence of insulin-dependent signalling mechanisms produced by *Citrus sinensis* (L.) Osbeck fruit peel in an insulin resistant diabetic animal model. *Food and Chemical Toxicology* **116**: 86 – 99.
52. Savić Lj. (2014) Metode ekstrakcije biljnih materijala: usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida, Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd
53. Scott W. C., Morgan D. A. (1959) Materials balances in the concentration of orange juice. *Proceedings* **72**: 285 - 290.
54. Selmi S., Rtibi K., Grami D., Sebai H., Marzouki L., 2017. Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. *Lipids Health Dis.* **16**: 152.
55. Setti A. S., Braga D. P. de A. F., Halpern G., Figueira R. de C. S., Iaconelli A., Borges E. (2018) Is there an association between artificial sweetener consumption and assisted reproduction outcomes? *Reproductive BioMedicine Online* **36(2)**: 145 – 153.
56. 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.
57. 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.

58. 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.
59. Šajina M. (2013). <<https://nutricionizam.com/naranca/>> Pristupljeno 11. rujna 2018.
60. Talhaouia N., Taamallic A., Gomez-Caravaca A.M., Fernandez-Gutierrez A., Segura-Carretero A. (2015) Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* **77**: 92 - 108.
61. USDA (2018) Foreign Agricultural Service. USDA - United States Department of Agriculture, <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>> Pristupljeno 22. kolovoza 2018.
62. Vahčić N., Hruškar M., Marković K. (2000) Metoda kvantitativne deskriptivne analize u senzorskoj procjeni jogurta. *Mljekarstvo* **50(4)**: 279 - 296.
63. Vinatoru M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem* **8**: 303 - 313.
64. Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. (2008) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* **19(12)**: 1130 – 1138.
65. Xie P., Huang L., Zhang C., Zhang Y. (2015) Phenolic composition, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europea* L.) extracts and their structure - activity relationships. *Journal of Functional Foods* **16**: 460 - 471.
66. Zayova E., Stancheva I., Geneva M., Petrova M., Dimitrova L. (2013). Antioxidant activity of in vitro propagated *Stevia rebaudiana* Bertoni plants of different origins. *Turkish Journal of Biology* **37**: 106 - 113.

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.

Safa Ekić

ime i prezime studenta