

# Optimizacija ekstrakcije polifenola iz lista masline i procjena antimikrobne aktivnosti

---

Han, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:898199>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



# **OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE POLIFENOLA IZ LISTA MASLINE I PROCJENA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**

DIPLOMSKI RAD

Luka Han

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Agroekologija - Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

# **OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE POLIFENOLA IZ LISTA MASLINE I PROCJENA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**

DIPLOMSKI RAD

Luka Han

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## **IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Luka Han**, JMBAG 0178100138, rođen 12.09.1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

### **OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE POLIFENOLA IZ LISTA MASLINE I PROCJENA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta*



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## IZVJEŠĆE

### O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Luke Han**, JMBAG 0178100138, naslova

#### **OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE POLIFENOLA IZ LISTA MASLINE I PROCJENA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka mentor \_\_\_\_\_
2. Izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković član \_\_\_\_\_
3. Doc. dr. sc. Martina Grdiša član \_\_\_\_\_

## Zahvala

*Ovime zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na mentorstvu, iskazanom povjerenju, podršci i strpljivosti tijekom izrade rada.*

*Veliko hvala mag. ing. agr. Irini Tanuwidjaja na stručnim savjetima, izdvojenom vremenu, podršci i ugodnoj atmosferi rada u laboratoriju.*

*Zahvaljujem se svim članovima Zavoda za Mikrobiologiju na ustupljenom vremenu, strpljenju i vrijednim savjetima.*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Marku Vinceković i ostalim djelatnicima sa Zavoda za Kemiju na iskazanom povjerenju i pomoći oko izrade diplomskog rada.*

*Ujedno, zahvalio bih se Zavodu za Hranidbu Životinja te Zavodu za Fitopatologiju na vremenu i pristupu laboratorijskoj opremi.*

*Na kraju, neizrecivo hvala mojoj obitelji i svim bliskim ljudima oko mene koji su me podržavali kako usponima tako i u padovima te učinili ove godine još vrjednijima.*

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteza, opći i specifični ciljevi.....	2
2. Pregled literature.....	3
2.1. Maslina.....	3
2.2. Plodovi i prerada plodova masline.....	4
2.3. Listovi masline.....	6
2.4. Antioksidacijska svojstva listova masline.....	8
2.5. Antimikrobna svojstva listova masline.....	10
2.6. Ultrazvučna ekstrakcija.....	11
3. Materijali i metode.....	13
3.1. Osnovne kemikalije.....	13
3.2. Antibiotici.....	13
3.3. Laboratorijski pribor i oprema.....	13
3.4. Otopine i puferi.....	14
3.4.1. Fiziološka otopina (0,85% NaCl).....	14
3.4.2. Puferirana peptonska voda.....	14
3.4.3. McFarland standard (0,5).....	15
3.5. Selektivni mediji za obogaćivanje i hranjive podloge za izolaciju bakterija i gljiva...15	
3.5.1. PCA (engl. <i>Plate Count Agar</i> ) čvrsta hranjiva podloga.....	16
3.5.2. DRBC (engl. <i>Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol</i> ) čvrsta hranjiva podloga.....	16
3.5.3. VRBG (engl. <i>Violet Red Bile Glucose</i> ) čvrsta hranjiva podloga.....	16
3.5.4. OCLA (engl. <i>Oxoid Chromogenic Listeria Agar</i> ) čvrsta hranjiva podloga.....	16
3.5.5. Muller-Kauffmann tetrationsat tekuća hranjiva podloga (MKTTn, engl. <i>Tetrathionate Broth Base</i> ) tekuća hranjiva podloga.....	16
3.5.6. RVS (engl. <i>Rappaport Vassiliadis Soy</i> ) tekuća hranjiva podloga.....	17
3.5.7. XLD (engl. <i>Xylose Lysine Desoxycholate</i> ) čvrsta hranjiva podloga.....	17
3.5.8. BHI (engl. <i>Broth heart infusion</i> ) čvrsta hranjiva podloga.....	17
3.5.9. BHI (engl. <i>Broth heart infusion</i> ) tekuća hranjiva podloga.....	17
3.5.10. Muller-Hinton (MH) čvrsta hranjiva podloga.....	17

3.5.11. Muller-Hinton (MH) tekuća hranjiva podloga .....	17
3.6. Uzorkovanje biološkog materijala (list masline) i priprema uzorka za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva.....	17
3.7. Metode ekstrakcije.....	18
3.7.1. Određivanje optimalnih uvjeta za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva .....	18
3.7.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz lista masline u optimalnim uvjetima .....	19
3.7.3. Ukoncentriravanje ekstrakata lista masline (modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija).....	19
3.7.4. Konvencionalna metoda ekstrakcije s vrućom destiliranom vodom .....	19
3.8. Određivanje biološki aktivnih spojeva u ekstraktima .....	19
3.8.1. Određivanje ukupnih polifenola .....	19
3.8.2. Određivanje ukupnih flavonoida .....	20
3.8.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	20
3.8.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	20
3.9. Određivanje mikrobiološke čistoće lista i ekstrakta lista masline .....	21
3.10. Uzgoj izolata za određivanje antimikrobne aktivnosti .....	22
3.11. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata masline dobivenih ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom.....	22
3.12. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakta lista masline dobivenog modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom .....	23
3.13. Statistička analiza.....	24
4. Rezultati .....	25
4.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih spojeva .....	25
4.1.1. Kinetika ekstrakcije .....	25
4.2. Modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih spojeva .....	27
4.3. Primjena konvencionalne ekstrakcije .....	27
4.4. Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline .....	28
4.5. Antimikrobna aktivnost ekstrakata lista masline.....	29
5. Rasprava.....	31
5.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološko aktivnih spojeva.....	31
5.2. Kinetika ekstrakcije polifenola .....	32



5.3. Modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih spojeva .....	33
5.4. Konvencionalna metoda ekstrakcije s vrućom vodom .....	34
5.5. Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline i antimikrobno djelovanje ekstrakata .....	34
6. Zaključci.....	37
7. Popis literature .....	38
Životopis.....	53

## Sažetak

Diplomskog rada studenta **Luke Han**, naslova

### **OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE POLIFENOLA IZ LISTA MASLINE I PROCJENA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**

Listovi masline predstavljaju bogat izvor biološki aktivnih spojeva, naročito polifenola, koji imaju potencijal primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Industrijska proizvodnja maslinovog ulja rezultira značajnim ostacima listova, stoga postoji velika potreba za iskorištenjem nusprodukata proizvodnje. Ultrazvučna ekstrakcija je učinkovita i ekonomski pristupačna metoda za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Stoga je cilj ovog rada bio optimizirati ekstrakciju polifenola iz lista masline ultrazvučnom ekstrakcijom te procjeniti antimikrobnu aktivnost i mikrobiološku čistoću ekstrakata. Zbog visoke specifičnosti, optimalni uvjeti ekstrakcije određeni su eksperimentalno, ispitivanjem promjenjivih varijabli. Promjenjive vrijednosti amplitude ( $A=75\%$ ), mase (6 g/l) i vremena ( $t=3$  minute) pokazale su se kao najoptimalnije. Međutim, ovako dobiveni ekstrakti lista masline nisu pokazali antimikrobno djelovanje. Modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom dobiven je ekstrakt lista masline s višim koncentracijama ukupnih polifenola koji je antimikrobno djelovao na bakterije *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Listeria innocua* (ATCC 33090) pri koncentracijama 600 i 200  $\mu\text{g}$  ukupnih polifenola, prikazujući pritom do 37,0% efikasnosti konvencionalnih antibiotika koji se koriste u suzbijanju infekcija uzrokovanih Gram negativnim, odnosno do 32,6% efikasnosti antibiotika za suzbijanje infekcija Gram pozitivnim bakterijama. Također, u ovom istraživanju je utvrđeno da aerobne mezofilne i sporogene bakterije, bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae* te plijesni i kvasci čine prirodnu mikrobiotu lista masline. Sve metode ekstrakcije korištene u ovom radu su djelovale bakteriocidno na bakterije obitelji *Enterobacteriaceae*, odnosno fungicidno na plijesni i kvasce. Međutim, aerobne mezofilne i sporogene bakterije detektirane su u svim ekstraktima, neovisno o primijenjenoj metodi ekstrakcije.

**Ključne riječi:** list masline, ekstrakcija, polifenoli, mikrobiološka čistoća, antimikrobna aktivnost

## Summary

Of the master's thesis – student **Luka Han**, entitled

### **OPTIMIZATION OF POLYPHENOL EXTRACTION FROM OLIVE LEAF AND ESTIMATION OF EXTRACTS ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

Olive leaves represent a rich source of bioactive compounds, specially polyphenols that have the potential of application in the food and pharmaceutical industries. Industrial production of olive oil results in significant leaf residues, therefore there is a great interest to exploit the byproducts of production. Ultrasonic extraction is an effective and economically accessible method for extraction of biologically active compounds from plant material. Therefore, the aim of this study was to optimize the extraction of polyphenols from olive leaves by ultrasonic extraction and to assess antimicrobial activity and microbiological purity of extracts. Due to its high specificity, optimal extraction conditions were determined experimentally by examining different variables. Obtained values of amplitude (A=75%), mass (6 g/l) and time (t=3 min) were shown to be the most optimal. However, olive leaf extracts thus obtained did not show any antimicrobial activity. Modified sonication assisted extraction gave an olive leaf extract with higher concentrations of total polyphenols that showed antimicrobial activity with the bacteria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Listeria innocua* (ATCC 33090). Antimicrobial effect was obtained at concentrations 600 and 200 µg of total polyphenols, showing up to 37.0% efficiency of conventional antibiotics used in combating infections caused by Gram negative, and up to 32.6 % of the effectiveness of antibiotics to combat infections caused by Gram positive bacteria. Also, it was determined that aerobic mesophilic and sporogenic bacteria, bacteria from the *Enterobacteriaceae* family and fungi (mold and yeasts), form the natural microbiota of olive leaf. All extraction methods, sonication assisted, modified by ultrasound assisted and conventional extraction had bactericidal impact on the bacteria of the *Enterobacteriaceae* family and fungicidal impact on mold and yeast. On the other hand, neither conventional nor ultrasonic extractions affected the number of aerobic sporogenic bacteria.

**Keywords:** olive leaf, extraction, polyphenols, microbiological purity, antimicrobial activity

## 1. Uvod

Industrijska proizvodnja maslina rezultira s puno ostataka i nusprodukata. Listovi masline čine 10% masline koji ulaze u proizvodni proces (Şahin i Bilgin 2017.). Proizvođači često plaćaju naknadu za rješavanje ostataka ili ih spale s ostalim nusproduktima. Porastom ekološke svijesti i potražnjom za alternativnim izvorima vrijednih biološki aktivnih spojeva, raste interes za iskorištenjem takvih ostataka.

Listovi masline obiluju biološki aktivnim spojevima poput polifenola, masnih kiselina, pigmenata (klorofili i karotenoidi), tokoferola, fitosterola, skvalena, volatilnih i aromatičnih spojeva (Roselló-Soto i sur. 2015.). Do sada, najviše su istraženi polifenoli za koje je dokazano da djeluju antioksidacijsko, antimikrobno, protuupalno i antikancerogeno te da mogu sniziti kolesterol i zaštititi krvožilni sustav i organizam od kroničnih bolesti (Özcan i Matthäus 2017.). Polifenoli se sintetiziraju u biljci kao sekundarni metaboliti pod utjecajem okolišnih faktora poput visokih i niskih temperatura, UV zračenja, suše i raznih patogena (Vogel i sur. 2015.). Polifenoli su prisutni u svim dijelovima biljke, no njihova koncentracija i biokemijska svojstva variraju između različitih organa biljke (Yoon 2018.).

Glavni polifenoli prisutni u listovima masline su oleuropein, hidroksitirozol, verbaskozid, apigenin-7-glukozid i luteolin-7-glukozid (Goldsmith i sur. 2014.). Razni procesi obrade maslinovog lišća (npr. ekstrakcija i sušenje) znatno utječu na dostupnost i sadržaj polifenola (Vogel i sur. 2015.). Ultrazvučna ekstrakcija pokazala se kao jedna od zanimljivijih i učinkovitijih metoda koja omogućava ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz vegetativnih dijelova biljke (Vilkhu i sur. 2008.). Jednostavnost, učinkovitost i niski troškovi čine ju vrijednom alternativom drugim metodama ekstrakcije. Mehanički učinak ultrazvuka inducira transport molekula iz biljne stanice u suspenziju, zbog kavitacijskog efekta ultrazvučnog vala na strukturu stanice (Chemat i sur. 2016.). Ultrazvučna ekstrakcija biološki aktivnih spojeva ovisi o raznim parametrima, fizičkim (amplituda, frekvencija, snaga ultrazvučnog vala, temperatura suspenzije), kemijskim (viskozitet, polarnost i molekulska masa otapala) i biološkim (vrsta biljke, biljno tkivo i okolišni uvjeti rasta biljke) (Chemat i sur. 2016.).

Primjena ekstrakta listova masline prvenstveno je koncentrirana na njihova antioksidacijska i antimikrobna svojstva. Najviše biološki aktivnih spojeva s antioksidacijskom aktivnošću nalaze se u listovima masline naspram drugih organa masline (Özcan i Matthäus 2017.). Oksidativni stres uzrokuju slobodni radikali i reaktivne čestice kisika i dušika koje se stvaraju kao nusprodukti metaboličkih staničnih procesa (Gorzynik-Debicka i sur. 2018.). Polifenoli, poput oleuropeina, su vrijedni antioksidansi koji mogu neutralizirati slobodne radikale i reaktivne čestice te spriječiti oksidaciju membranskih lipida, proteina i oštećenja DNA stanice (Yoon i sur. 2018.). Prehrambena industrija koncentrirana je na iskorištenje polifenola u sprječavanju oksidacije lipida kod obrade i skladištenja hrane (Şahin i Bilgin 2017.). Zadnjih godina radi se na biorazgradivim polimerima u koje je moguće inkorporirati

biljne polifenole poput oleuropeina u svrhu produženja roka trajanja i stabilnosti svježih namirnica (Rosa i sur. 2019.). Polifenoli prisutni u ekstraktu pokazali su antimikrobno djelovanje protiv bakterija, virusa i gljivica (Benavente-Garcí i sur. 2000.). Tijekom povijesti čaj od listova masline koristio se za liječenje raznih virusnih i bakterijskih infekcija (Şahin i Bilgin 2017.). Stoga, ekstrakt lista masline ima veliki potencijal primjene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao dodatak prehrani za prevenciju bolesti ili u samom liječenju.

U ovom radu ekstrahirani su biološki aktivne tvari iz lista masline pomoću tri različite metode, konvencionalnom ekstrakcijom, ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom i modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom. Istovremeno, ispitana je mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata masline te antimikrobni utjecaja ekstrakata masline na 5 patogenih vrsta (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*) i potencijalne probiotičke i tehnološki važne autohtone sojeve izolirane iz spontano fermentiranih kobasica (*Lactobacillus sakei* i *Enterococcus durans*) i sira (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*). Nadalje, ispitano je djelovanje ekstrakta lista masline u odnosu na konvencionalne antibiotike koji se koriste u liječenju infekcija izazvanih Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama.

### **1.1. Hipoteza, opći i specifični ciljevi**

Listovi masline obiluju raznim biološki aktivnim spojevima koji su pokazali antioksidacijski i antimikrobni potencijal. Primjena spojeva iziskuje njihovu ekstrakciju. Ultrazvučna ekstrakcija pokazala se kao učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda. Zbog velike specifičnosti metode, potrebno je eksperimentalno odrediti optimalne uvjete ekstrakcije.

Stoga, hipoteza ovog rada je da različitim metodama ekstrakcije je moguće ekstrahirati biološki aktivne spojeve, posebice polifenole, iz listova masline u koncentraciji dostatnoj za antimikrobno djelovanje, te da različite metode ekstrakcije utječu na mikrobnu čistoću ekstrakata.

Specifični ciljevi rada:

- Eksperimentalno utvrditi optimalne uvjete za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju
- Ekstrahirati biološki aktivne spojeve iz lista masline pomoću 3 različite metode ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija i modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija)
- Ispitati mikrobiološku čistoću lista i ekstrakata lista masline
- Odrediti antimikrobnu aktivnost ekstrakata lista masline i usporediti ju s obzirom na konvencionalne antibiotike

## 2. Pregled literature

### 2.1. Maslina

Maslina predstavlja jednu od najstarijih poljoprivrednih kultura. Porijeklo vuče još iz doba tercijara (prije 1 milijun godina) kada su postojale divlje masline, predci današnjih maslina, a čiji fosili su otkriveni u Italiji (Boskou 1996.). Drugi autori smatraju da predci današnje masline postoje znatno duže, čemu u prilog govore fosili stari oko 20 milijuna iz doba oligocena pronađeni u blizini grada Livorno u Italiji (Therios 2009.). Najstariji fosilni ostaci maslinovih listova pronađeni su u Grčkoj na otoku Santorini i stari su između 50 000 i 60 000 godina (Valavanis 2004.). Istraživanje koje su proveli Goren-Inbar i sur. (2004.) pokazuje da se maslina u početku koristila primarno za ogrjev. Naime, oni su otkrili fosilne ostatke izgaranja različitih biljaka na području današnjeg Izraela među kojima su pronašli fosile divlje masline čija se starost procjenjuje na oko 790 000 godina. Tadašnji čovjek, *Homo erectus* koristio je maslinu isključivo za potrebe ogrjeva kao drvo visoke gustoće i dobre kalorijske vrijednosti. Različiti autori spominju različita područja iz kojih se maslina širila u svijet. Neki spominju donji Egipat, neki Mezopotamiju i područje koje okružuje, a drugi Anatoliju (Breton i sur. 2012.). Postupnim udomaćivanjem i širenjem u razne krajeve svijeta, maslina poprima današnji izgled. Ljudi su selekcionirali one sorte koje su nosile poželjna svojstva poput veličine ploda, otpornosti na patogene, veličina stabljike, omjer listova naspram plodova i slično. Ozbiljnija kultivacija masline započela je oko 8. i 7. st. pr.n.e. kada se maslina počela uzgajati sistematski (Fiorino i Nizzi Griffi 1992.). Kasnije su Rimljani otkrili maslinu u grčkim kolonijama u Italiji što je utjecalo na njeno širenje kroz cijelo Rimsko Carstvo (Boskou 1996.). Iako Rimljani nisu bili veliki ljubitelji masline i maslinovog ulja, proširili su je kroz čitavo carstvo od Grčke pa do Egipta kao novi izvor energije i zdravlja (Chazau-Gillig 1994.). Nakon pada Rimskog Carstva ponovno dolazi do širenja masline i njezine kultivacije u području Mediterana. Do kraja 15. st. maslina se proširila i u novootkriveni svijet te se počela uzgajati u klimatskim područjima sličnim Mediteranu, poput Argentine, Čilea i Kalifornije (Kapellakis 2008.).

Glavni i primarni proizvod biljke masline je maslinovo ulje koje se dobije prešanjem ploda. Iako se sam plod konzumira, maslinovo ulje je pridonijelo popularnosti masline i njenom širenju u svijetu.

Maslina je otporna biljka te može preživjeti na raznim geografsko-klimatskim područjima, ali ako se želi postići puni potencijal biljke potrebna je odgovarajuća klima i briga. Danas se maslina uzgaja u zemljama kao što je Španjolska, Italija, Grčka, Tunis, Turska, Portugal, Maroko, Sirija, Alžir, Egipat, Izrael, Libija, Jordan, Libanon, Cipar, Hrvatska, Slovenija, Argentina, Čile, Peru, Meksiko i SAD (Boskou 2009.). Prema podacima Međunarodnog savjeta za maslinu (engl. *International olive council*, IOC) svjetska proizvodnja maslinovog ulja za sezonu 2018./2019. iznosila je 3 217 500 tona, od čega je na zemlje članice EU otpalo

70,35% proizvodnje. Svjetska proizvodnja maslina za konzumaciju („stolnih“ maslina) za istu sezonu iznosila je 2 569 000 tona, od čega na EU otpada 0,03% proizvodnje. Podatak iz 2011. govori da Mediteranske zemlje zauzimaju 97% ukupnog uzgoja maslina na približno 10 milijuna hektara. Više od 800 milijuna maslina se uzgajalo u svijetu 2011. od čega 90% otpada na proizvodnju maslinovog ulja (Uylaşer i Yildiz 2014.).

## 2.2. Plodovi i prerada plodova masline

Iako plod masline i maslinovo ulje potječu iz istog izvora, oni predstavljaju dva različita sustava. Tehnologija proizvodnje, najprikladnije sorte, vrijeme berbe, rezidba i mnoge druge karakteristike su izuzetno bitne pri odluci koje tržište uzgoja masline se nastoji pokriti. Pri uzgoju „stolnih“ maslina berba počinje sredinom jeseni kada su masline još uvijek tvrde i krenu mijenjat boju iz zelene u žutu. U suprotnosti, masline koje se uzgajaju za preradu u ulje beru se u kasnu jesen ili tijekom zime kada boja ploda prelazi u tamnije nijanse zbog redukcije klorofila i povećanja količine antocijana te tada plod masline dostiže maksimalnu količinu ulja (Haralampidis i sur. 1998.).

Plod masline odlikuje se niskim sadržajem šećera (2,6-6%) naspram drugih plodova voća (12% i više) i visokim sadržajem ulja (12-30%) što ovisi o vegetacijskom periodu i sorti masline (Uylaşer i Yildiz 2014.). Plod masline obiluje masnim kiselinama, pogotovo jednostruko nezasićenim masnim kiselinama. Samo maslinovo ulje pretežno se sastoji od triacilglicerola (98-99%). Triacilgliceroli su široka skupina estera glicerola i raznih masnih kiselina. Dominantna masna kiselina u maslinovom ulju je oleinska sa udjelom od čak 83%. Uz nju u ulju se nalaze još palmitinska, linoleinska, stearinska i palmitoleinska kiselina (Gorzynik-Debicka i sur. 2018.). Također, prisutni su brojni lipofilni i amfifilni spojevi poput fitosterola, skvalena, tokoferola, fenolnih spojeva, terpena i drugih (Boskou 2009.).

Svježa maslina ima posebno izraženu gorčinu i kao takva nije za konzumaciju. Svojtvena gorčina dolazi od spojeva koji spadaju u skupinu fenola, točnije grupu sekoiridoida koji biljci služe kao zaštita od patogena, insekata i biljojeda (Soler – Rivas 2000.). Spojevi koji spadaju u grupu sekoiridoida, a koje nalazimo u maslini, su oleuropein, demetiloleuropein i ligstrozid, dok su nuzenid i nuzenid oleozid prisutni u liofiliziranim maslinama i sjemenkama masline (Gutierrez-Rosales i sur. 2010.; Gutierrez-Rosales 2012.; Cecchi i sur. 2018.). Sekoiridoidi prisutni u plodu podložni su hidrolizi koju kataliziraju  $\beta$ -glukozidaza i katalaza tijekom sazrijevanja i procesiranja ploda te pritom nastaju novi spojevi poput aglikon oleuropeina, aglikon ligstrozida, olekantana, oleacina, hidroksitirozola i tirozola (Cecchi i sur. 2018.). Prilikom prerade ploda masline u ulje, sam udio gorkih spojeva poput polifenola ovisi i o načinu prešanja, odnosno mljevenja. Korištenjem metalne preše, ulja imaju gorči okus i veći sadržaj polifenola, dok mljevenje tradicionalnim kamenom smanjuje gorčinu ulja i udio polifenola (Di Giovacchino 2002.).

Uz već spomenute fenolne spojeve u plodu masline nalazimo i druge fenolne spojeve kao što su tirozol, hidrokstitirozol i oleanolna kiselina (Uylaşer i Yildiz 2014.). Boskou i sur. (2006.) pronašli su 13 razliĉitih spojeva polifenola u plodovima masline te su utvrdili da konzumacija 5-10 maslina dnevno zadovoljava dnevne potrebe za polifenolima. Fenolni spojevi postoje u obliku fenolnih kiselina ili alkohola, oleuropein derivata, lignana i flavonoida u koncentraciji od 50 do 1000 mg/kg (Gorzynik-Debicka i sur. 2018.). U konaĉnici sama koncentracija biološki aktivnih spojeva ovisit će o tehnološkom procesu obrade masline u ulje, sorti, navodnjavanju i stupnju zrelosti same masline (Uylaşer i Yildiz 2014.). Tirozol, hidrokstitirozol i njihovi sekoiridoidni derivati (aglikon oleuropeina, aglikon ligostrozida, oleokantal i oleuropein) ĉine oko 90% svih fenolnih spojeva djeviĉanskog maslinovog ulja (Covas i sur. 2006.).

Dosadašnja istraţivanja nastojala su pronaći rješenje autoimunih, krvoţilnih, ţivĉanih, kancerogenih oboljenja istraţujući biljne metabolite i njihovu primjenu. Brojna znanstvena istraţivanja koja su orijentirana na pronalaţenje lijekova ili dodataka prehrani, bave se maslinom i njenim produktima jer obiluju razliĉitim fenolnim spojevima i masnim kiselinama. Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti, što znaĉi da ih biljka aktivno proizvodi kao reakciju na podraţaje iz okoline (Del-Rio i sur. 2013.). Polifenoli mogu usporiti ili u odreĉenim sluĉajevima potpuno zaustaviti kancerogena, krvoţilna, ţivĉana oboljenja kao i razne virusne, bakterijske i gljiviĉne infekcije (Gorzynik-Debicka i sur. 2018.). Fenolni i polifenolni spojevi posjeduju antioksidacijsku aktivnost i kao takvi mogu neutralizirati slobodne radikale i reaktivne ĉestice kisika. Antioksidacijsko djelovanje polifenola smanjuje rizik od kroniĉnih krvoţilnih bolesti, kancerogenih oboljenja i upalnih procesa (Uylaşer i Yildiz 2014.). Takva aktivnost fenolnih spojeva moguća je zbog 3,4-dihidroksi grupe vezane na aromatski prsten što utjeĉe na polarnost samog spoja i u konaĉnici na antioksidacijsku aktivnost (Morello i sur. 2005.). Ujedno, sama kvaliteta antioksidansa ovisi o redoks potencijalu koji omogućuje spoju da djeluje kao reducens, donor vodika i neutralizator kisikovih ĉestica (Ben Othman i sur. 2008.). Meso ploda masline sadrţi 2-3% fenolnih spojeva u obliku glukozida i estera, a djeviĉansko maslinovo ulje sadrţi oko 500 mg/l polifenola (Gorzynik-Debicka i sur. 2018.). Maslinovo ulje pokazuje veću antioksidacijsku aktivnost prema hidrosilnoj grupi slobodnih radikala nego ulja dobivena iz sjemenki drugih biljaka, a ekstra djeviĉansko maslinovo ulje ima jaĉi uĉinak nego rafinirano maslinovo ulje zbog veće koncentracije antioksidansa (Owen i sur. 2000.). Znanstvena istraţivanja koja su se bavila pozitivnim antioksidacijskim uĉincima polifenola u maslinovom ulju, prouĉavala su i njihov uĉinak na lipoproteine niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*, LDL) i DNA oksidaciju, glavne faktore razvoja ateroskleroze i tumora. Fenolni spojevi iz maslinovog ulja utjeĉu na smanjenje oksidacije LDL kod zdravih muškaraca i ljudi s koronarnim bolestima srca (Covas i sur. 2006.; Fito i sur. 2007.). Uzimanjem 50 g maslinovog ulja dnevno s višim vrijednostima polifenola rezultiralo je u otprilike 30% manje DNA oštećenja kod ţena u post menopauzi (Salvini i sur. 2006.). Sanchez-Rodriguez i sur. (2019.) pokazali su da maslinovo ulje obogaćeno triterpenima pokazuje jaĉi antioksidacijski uĉinak i da smanjuje DNA oksidaciju u



odnosu na obično maslinovo ulje. Masne kiseline predstavljaju značajan udio u maslinovom ulju. Linoleinska masna kiselina nalazi se u maslinovom ulju u sadržaju od 0,61% do 9,09% te pripada grupi  $\omega$ -3 masnih kiselina koje su često povezane s manjim rizikom oboljenja krvožilnog sustava (Uylaşer i Yildiz 2014.; Scoditti i sur. 2014.). Abbeddou i sur. (2011.) pokazali su da ishrana ovaca pasmine Awassi listovima masline utječe na povećanje koncentracije  $\omega$ -3 masnih kiselina i konjugirane linoleinske kiseline u mlijeku ovaca. Također, masne kiseline prisutne u ulju djeluju sinergistički s fitokemikalijama poput polifenola u sprječavanju oboljevanja organizma (Fortes 2005.).

### 2.3. Listovi masline

Proces branja i obrade plodova masline u ulje intenzivan je i zahtjevan posao u kojem osim samih plodova jako puno listova i grana završi u mlinu ili jednostavno na tlu. Točnije, listovi zauzimaju 10% od ukupne količine maslina koje ulaze u mlin (Şahin i Bilgin 2017.). Proces proizvodnje maslinovog ulja sastoji se od nekoliko faza: prešanje plodova diskontinuiranom prešom (Dias i sur. 2004.), tiješnjenje i dvofazno ili trofazno centrifugiranje (Rahmanian i sur. 2014.). Sami proces prešanja i dobivanja maslinovog ulja ostavlja iza sebe puno nusproizvoda i ostataka poput otpadne vode, paste ploda masline, nusproizvode skladištenja i filtera „kolač“ (ostaci lišća i granja od berbe) (Frankel i sur. 2013.). Zbog sve većeg interesa za alternativnim izvorima biološki aktivnih spojeva i ekološke osviještenosti, zadnjih godina ti nusproizvodi dobivaju na značaju. Ostaci i nusproizvodi proizvodnje maslinovog ulja predstavljaju bogat izvor visoko vrijednih nutritivnih spojeva poput polifenola, masnih kiselina, pigmenata (klorofili i karotenoidi), tokoferola, fitosterola, skvalena, volatilnih i aromatičnih spojeva (Roselló-Soto i sur. 2015.). Navedeni spojevi sintetiziraju se u biljci kao obrambeni mehanizmi od patogena, zaštita od UV zračenja, insekata te kao takvi imaju izražena antioksidacijska svojstva. Također, zaslužni su i za niz pozitivnih učinaka na ljudski organizam kao što je redukcija hipertenzije, prevencija krvožilnih bolesti, potiskivanje i prevencija raznih kancerogenih oboljenja te virusnih i bakterijskih infekcija (Şahin i Bilgin 2017.). Stoga se razvio veliki interes za iskorištavanjem tih spojeva u raznim industrijskim granama kao što je prehrambena, farmaceutska i kozmetička industrija (El i Karakaya 2009.; Zakaria i Mustapa 2016.).

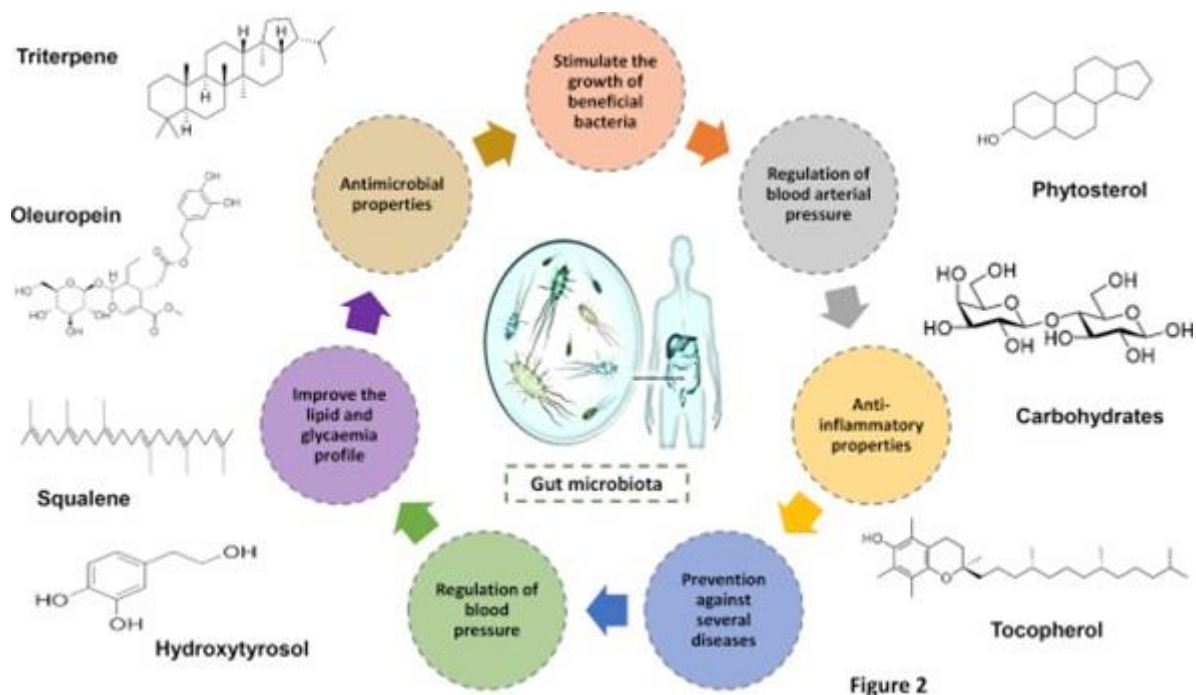
Iscjeljujuća i zdravstvena svojstva maslinovog lista poznata su u narodu od davnina. U starom Egiptu listovi masline su korišteni u ceremoniji mumificiranja te su bili simbol božanske moći (Şahin i Bilgin 2017.). Jedno od prvih uspješnih ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz listova masline bilo je jednostavno pravljenje čaja. Zapisani su terapijski učinci čaja od listova masline protiv običnih prehlada, suhog kašlja, vrućice ili upala mokraćnog mjehura. Nadalje, ekstrakt maslinovog lista bio je koristan u tretiranju bolesti poput malarije, gripe, raznih virusnih oboljenja, proljeva, zubnih i slušnih problema te infekcija operacijskih zahvata (Şahin i Bilgin 2017.). Današnja uporaba ekstrakta lista masline koncentrirana je na industrijsku upotrebu jer u proizvodnji maslinovog ulja jako puno

ostataka otpada na listove (25 kilograma listova i grana godišnje po stablu) (Herrero i sur. 2011.).

Najviše istražena grupa spojeva prisutnih u listovima masline su fenoli. U listovima masline u najvećoj koncentraciji nađeni su slijedeći fenolni spojevi: fenolne kiseline, fenolni alkoholi (tirozol i hidroksitirozol), flavonoidi (luteolin 7-O-glukozid, rutin, apigenin 7-O-glukozid, luteolin 4-O-glukozid) i sekoiridoidi (oleuropein) (Bouaziz i Sayadi 2005.; Japón-Luján i Luque de Castro 2007.). Zastupljenost kemijskih spojeva u listovima masline ovisi o porijeklu, sorti, uvjetima skladištenja, vremenskim uvjetima prije skladištenja, postotku vlage i kontaminaciji blatom (Martín-García i Molina-Alcaide 2008.). Proces nakon branja, poput sušenja, utječu na zastupljenost i raspored nutritivnih komponenti u ekstraktu listova masline (Ahmad-Qasem i sur. 2013.). Studija koju su proveli Martín-García i Molina-Alcaide (2008.) pokazala je da dehidratacija listova liofilizacijom, sušenjem na zraku ili u pećnici utječe na smanjenje nutritivne vrijednosti ekstrakta. Ujedno i godišnje doba utječe na razinu polifenola, listovi prikupljeni u listopadu imali su manji sadržaj oleuropeina nego listovi prikupljeni u ožujku (Ranalli i sur. 2006.). Oleuropein je najzastupljeniji polifenol u listovima masline, dapače ima ga više nego u maslinovom ulju. Zastupljenost oleuropeina u ulju varira između 0,005 i 0,12%, a u listovima između 1 i 14% (Japon-Lujan i sur. 2006.). Oleuropein je sekundarni metabolit i sintetizira se kao odgovor biljke na prilagodbu okolišnim faktorima (npr. niske i visoke temperature, suša, patogeni) (Yoon 2018.).

Hidroksitirozol je drugi najzastupljeniji polifenol u listovima masline, a ujedno i prekursor u nastajanju oleuropeina (Makris i sur. 2007.). Tijekom faze sazrijevanja listova i plodova smanjuje se koncentracija oleuropeina, a povećava koncentracija hidroksitirozola jer je hidroksitirozol glavni produkt degradacije oleuropeina (Tan i sur. 2003.). Pozitivna svojstva hidroksitirozola na ljudsko zdravlje pripisuju se njegovoj sposobnosti da neutralizira slobodne radikale i reaktivne čestice kisika i dušika i da aktivira razne endogene antioksidacijske sustave u tijelu (Gorzynik-Debicka i sur. 2018.). Hidroksitirozol štiti od redukcije mitohondrijske DNA sintetaze, regulira aktivnost kritičnih transkripcijskih faktora (Nrf1 i Tfam) i stimulira biosintezu mitohondrija što smanjuje rizik razvoja šećerne bolesti tipa 2 (Hao i sur. 2010.). Također je dokazano da hidroksitirozol i oleuropein inhibiraju rast i induciraju apoptozu tumorskih stanica (Acquaviva i sur. 2012.; Elamin i sur. 2013.). Ishrana koja uključuje visoki unos hidroksitirozola (50 mg/kg/dan kroz 17 tjedana) djeluje antiupalno što se može pripisati redukciji ekspresije faktora nekroze tumora, interleukina IL-6 i cikloosigenaze u jetri (Boss i sur. 2016.; Cao i sur. 2014.). Corona i sur. (2006.) pokazali su da hidroksitirozol i tirozol mogu, dok oleuropein ne može proći membranu tankog crijeva kod pokusnih miševa te dospjeti u debelo crijevo. Određene bakterije prirodne mikrobiote ljudskog probavnog sustava, posebno *Lactobacillus planatarum*, mogu razgraditi oleuropein do hidroksitirozola te na taj način on postaje dostupan za usvajanje u tankom crijevu (Landete i sur., 2008.). Santos i sur. (2012.) *in vivo* eksperimentom potvrdili su da rodovi bakterija *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus* utječu na hidrolizu oleuropeina do hidroksitirozola.

Flavonoidi su jedni od najobilnijih grupa polifenola u listovima masline (Heimler i sur. 1992.; Khaliq i sur. 2015.). Mogu biti prisutni u formi aglikona (kvercetin, apigenin, luteolin diosmetin) ili u formi glikozilata (kvercetin-7-O-rutinozid, luteolin-7-O-rutinozid, luteolin-7-O-glukozid, luteolin-5-O-glukozid) (Laguerre i sur. 2009.). Mogu inhibirati ili potpuno suzbiti razne sojeve bakterija i patogenih protozoa te inhibiraju reverznu transkriptazu i proteaze (Rahmanian i sur. 2015.). Flavonoidi pokazuju 2,5 puta veću antioksidacijsku vrijednost nego vitamini C i E (Braun i Cohen 2015.). Luteolin i apigenin pokazali su antitumorska svojstva (Pratheeshkumar i sur. 2012.; Seo i sur. 2012.). Apigenin koji je prisutan u vrlo niskim koncentracijama unutar lista, povezan s antiupalnim, antitumorskim i antioksidacijskim procesima (Shukla i sur. 2010.). Iako su prisutni u različitim koncentracijama, flavonoidi i drugi biološki aktivni spojevi djeluju sinergistično te ostvaruju bolji učinak kada djeluju zajedno (Lee i Lee 2010.). Neka od pozitivnih svojstava ekstrakata lista masline na ljudski organizam prikazana su na Slici 1.



Slika 1. Pozitivna svojstva ekstrakata lista masline na ljudski organizam (Žugčić i sur. 2018.)

## 2.4. Antioksidacijska svojstva listova masline

Polifenoli kao biološki aktivni spojevi najviše su istraživani u kontekstu njihovih antioksidacijskih potencijala. Listovi masline obiluju raznim biološki aktivnim spojevima među kojima su polifenoli poput tirozola, oleuropeina, hidroksitirozola, rutina i verbaskozida s antioksidacijskim djelovanjem prisutni u velikim količinama (Rahmanian i sur. 2015.). Ti spojevi esencijalni su za biljku te sudjeluju u metaboličkim procesima i reproduktivnom ciklusu kao i u zaštiti od nepovoljnih uvjeta i patogena. S druge strane predstavljaju značajan

izvor antioksidansa koji sprječavaju oksidativni stres stanice i smanjuju rizik od raznih kroničnih bolesti (Vauzour i sur. 2010.). Zbog navedenih razloga tijekom godina razvio se veliki interes za uvođenjem i iskorištavanjem antioksidansa u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Lee i sur. 2009.; El i Karakaya 2009.). Jedan oblik primjene je u prehrambenoj industriji gdje se mogu koristiti kao molekule koje sprječavaju oksidaciju lipida kod obrade i skladištenja hrane. Slobodni radikali, UV svjetlo, toplina, enzimi, mikroorganizmi, metali i metaloproteini mogu inducirati lipidnu oksidaciju (Şahin i Bilgin 2017.). Dodavanje ekstrakta lista masline mastima i uljima u zadnje vrijeme sve se više istražuje, te predstavljaju alternativno rješenje sintetičkim antioksidansima koji mogu imati toksični učinak (Lorenzo i sur. 2018.; Franco i sur. 2018.). Dodatak ekstrakta lista masline uljima poboljšalo je njegov antioksidacijski kapacitet i oksidativnu stabilnost u usporedbi s uljem bez dodanog ekstrakta (Salta i sur. 2007.; Paiva-Martins i sur. 2007.). Slično prijašnjem istraživanju, Lalas i sur. (2011.) iskoristili su ekstrakt maslinovog lista za obogaćivanje stolnih maslina antioksidansima. Zabilježili su povećanje koncentracije oleuropeina za 457% i koncentracije hidroksitirozola za 109%, što znatno utječe na njihovu oksidativnu stabilnost i nutritivnu vrijednost. Istražen je i antioksidacijski utjecaj inkapsuliranih ekstrakata listova masline na sojino ulje. Inkapsulirani ekstrakti su zbog polimerne ovojnice postepeno otpuštali fenolne spojeve i pokazali veći antioksidacijski utjecaj na sojino ulje nego neinkapsulirani ekstrakt (Mohammadi i sur. 2016.). Zanimljivo istraživanje proveli su Da Rosa i sur. (2019.) u kojem su razmotrili mogućnost inkorporacije ekstrakta lista masline unutar biorazgradivog filma za čuvanje hrane od karagenana. Biorazgradivi film obogaćen ekstraktom lista masline pokazao je antioksidacijski potencijal i veću nutritivnu vrijednost čuvanja hrane. Hayes i sur. (2011.) su testirali antioksidacijski potencijal četiri komercijalna dostupna produkta: ekstrakt lista masline, sezamol, elagična kiselina i lutein. Dobili su slijedeće rezultate poredane od najvećeg antioksidacijskog potencijala prema manjem: elagična kiselina > sezamol > ekstrakt lista masline > lutein za sve testove antimikrobne aktivnosti (ABTS, DPPH, FRAP, ORAC i  $\beta$  – karoten linoleinska kiselina test). Testiran je i utjecaj ekstrakta lista masline s povišenom razinom hidroksitirozola na maslac, životinjsku mast i ulje jetre bakalara (De Leonardis i sur. 2008.). Antioksidacijski učinak ekstrakta lista masline povećao je oksidativnu stabilnost kod sva tri oblika životinjske masti. Ujedno, u istoj studiji pokazali su neškodljivo djelovanje ekstrakta na bakterije *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbruechii* ssp. *bulgaricus* što upućuje na zaključak da je moguće nutritivno obogatiti mlijeko i druge mliječne proizvode antioksidansima iz ekstrakta. Ishrana životinja listovima masline ili hrane obogaćene antioksidansima iz lista masline može utjecati na oksidaciju lipida i mikrobno kvarenje mesa. Botsoglou i sur. (2010.) hranili su purice hranom suplementiranom listovima masline i  $\alpha$ -tokoferil acetatom. Primijetili su da takva puretina signifikantno manje ( $p < 0,05$ ) podliježe lipidnoj oksidaciji i može se duže skladištiti naspram klasične ishrane bez dodatka. Također, purice hranjene dodatkom listova masline imale su meso koje je duže odolijevalo mikrobnom kvarenju bakterijama mliječne kiseline, *Enterobacteriaceae* i psihotrofnim bakterijama. Antioksidansi prisutni u ekstraktu mogu neutralizirati slobodne radikale koji uzrokuju oksidativni stres u ljudskom organizmu (Vogel i

sur. 2015.). Reaktivne čestice kisika i dušika konstantno se proizvode u tijelu te su neophodne za produkciju energije, staničnu signalizaciju, funkcioniranje imunološkog sustava i dr. Njihovo stvaranje kontrolirano je enzimima poput superoksidaza dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza, ali ako se stvori višak reaktivnih čestica može doći do oksidativnog oštećenja stanica (Vogel i sur. 2015.). Takvo oštećenje povezano je s povećanim rizikom oboljenja od kroničnih bolesti krvožilnog sustava i raka (Dimitrios 2006.). Neutralizacija slobodnih radikala oleuropeinom pripisuje se njegovoj sposobnosti da helira metalne ione (Cu i Fe) koji kataliziraju stvaranja slobodnih radikala (Andrikopoulo i sur. 2002.). Nadalje, oleuropein ima sposobnost inhibicije nekoliko enzima važnih u upalnim procesima poput lipooksigenaze bez oštećenja ciklooksigenaznog puta (Visioli i sur. 2002.). Oleuropein i hidroksitirozol pokazali su neutralizirajuće djelovanje prema anionima superoksida te inhibiraju neutrofile i radikale hipoklorične kiseline (Chimi i sur. 1991.; Gordon i sur. 2001.). Antioksidacijska aktivnost oleuropeina povezana je prisutnošću hidroksitirozola u njegovoj strukturi. Polifenoli u ekstraktu lista masline djeluju sinergistički pri neutralizaciji slobodnih radikala te pokazuju jači antioksidacijski učinak od vitamina C i E (Benavente i sur. 2000.).

## 2.5. Antimikrobna svojstva listova masline

Ekstrakti listova masline pokazuju antimikrobno djelovanje na brojne bakterije, viruse, kvasce i druge uzročnike gljivičnih infekcija (Benavente-García i sur. 2000.). Spomenuti ekstrakti su se koristili u liječenju bakterijskih infekcija kao što su bronhitis i tonzilitis, vaginalnih gljivičnih infekcija te infekcija uzrokovanih herpes simpleks virusom (Sudjana i sur. 2009.). *In vitro* tirozol se pokazao najboljim u liječenju gljivičnih infekcija, dok su ga po sposobnosti inhibicije gljivica slijedili katehin i oleuropein (Şahin i Bilgin 2017.). Bisignano i sur. (1999.) pokazali su da oleuropein i hidroksitirozol inhibiraju ili odgađaju rast bakterija koje uzrokuju infekcije probavila i dišnih sustava (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio alginolyticus*). Također, oba spoja pokazala su antimikrobnu (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *S. typhi*, *Vibrio cholerae*, *V. parahemolyticus* i *Micrococcus* sp.), antiprotozoalnu i antiviralnu aktivnost (Sudjana i sur. 2009.). Duda-Chodak i sur. (2008.) dokazali su snažno antimikrobno djelovanje ligostrozida protiv širokog spektra Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Ovisno o metodi ekstrakcije različiti spojevi će biti prisutni u ekstraktu te će ekstrakti pokazivati različiti antimikrobni potencijal (Benavente García i sur. 2000.). Thielmann i sur. (2017.) su pokazali da inhibicija rasta Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija ovisi o vrsti spojeva ekstrahiranih iz listova masline. Antimikrobni učinak ovisi o samom obliku spoja, pa je tako aglikon oleuropeina pokazao jači antibakterijski učinak nego glikozid oleuropeina (Rao i sur. 2002.). Ekstrakt lista masline ima i antifungalno djelovanje na široki spektar gljiva, a posebice je koristan u liječenju *Candida* vrsta koje mogu uzrokovati probavne i dišne smetnje (Pereira i sur. 2007.).

Najučinkovitiji ekstrakti lista masline su oni koji su napravljeni od svježe ubranih listova koji sadrže široki spektar prirodnih fenola i omogućuju sinergistički utjecaj spojeva osiguravajući tako maksimalnu iskoristivost (Pereira i sur. 2007.; Lee i sur. 2009.). Antimikrobni utjecaj vodenog ekstrakta lista masline ispitan je na bakterije *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i gljive *C. albicans* i *C. neoformans*. Ekstrakt je djelovao antimikrobno na sve ispitivane mikroorganizme, gdje je najosjetljiviji mikroorganizam inhibiran već pri koncentraciji od 1 mg/ml (Pereira i sur. 2007.). Prema Molan i sur. (2009.) ekstrakt lista masline može djelovati i kao prebiotik zbog svojih visokih količina polifenola koji utječu na zastupljenost određenih bakterija u probavnom sustavu, promovira rast korisnih bakterija kao što su *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp., te inhibira rast štetnih poput klostridija. Sudjana i sur. (2009.) testirali su inhibitorni učinak ekstrakta lista masline na 122 različita mikroorganizma. Najizraženija inhibicija detektirana je kod vrsta *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* i *S. aureus*, uključujući i meticilin rezistentan *S. aureus* (MRSA). Na rast 79 vrsti mikroorganizama ekstrakt nije značajno utjecao. Druga studija pokazala je da ekstrakt najviše inhibira vrste *S. typhimurium* PTCC 1639 i *K. pneumoniae* PTCC 1053 s promjerom zone inhibicije rasta od 11,5 mm i 10 mm (Aliabadi i sur. 2012.). Liu i sur. (2017.) su pokazali da koncentracija od 62,5 mg/ml ekstrakta lista masline skoro potpuno inhibira rast patogenih bakterija (*Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 i *S. enteritidis*). Ujedno, ekstrakt je reducirao pokretljivost *L. monocytogenes* što se očituje u nedostatku flagela te je inhibirao stvaranje biofilma kod *L. monocytogenes* i *S. enteritidis*. Ekstrakt lista masline djeluje antimikrobno na neke bakterije roda *Klebsiella* i *Pseudomonas*, koje su stekle rezistenciju na određene antibiotike (Neu 1992.).

## 2.6. Ultrazvučna ekstrakcija

Zadnjih godina raste interes za novim i ekološkim čistim metodama ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz raznih biljnih materijala. Konvencionalne metode poput Soxhlet ekstrakcije dugotrajne su i koriste organske molekule koje uglavnom imaju negativni utjecaj na okoliš (Barba i sur. 2016.; Putnik i sur. 2018.). Industrijska potreba za učinkovitijim metodama s kojima je moguće skratiti vrijeme ekstrakcije, reducirati potrošnju energije i ekstrahirati veću količinu biološki aktivnih tvari, dovela je do razvoja novih metoda (Rombaut i sur. 2014.). Udio i zastupljenost nutritivno vrijednih spojeva ovisi o biljnom tkivu (grane, lišće, usplode ploda, sjemenke, pasta ploda, otpadna voda). S druge strane ovisit će i o metodi ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz ostataka proizvodnje maslinovog ulja (Roselló-Soto i sur., 2015). Kako bi se razvijale nove metode potrebna je suradnja različitih znanstvenih disciplina. Neke od novih metoda su: ultrazvučna i mikrovalna ekstrakcija, elektrotehnologije (pulsirajuće električno polje i izboji visokih voltaža), sub- i super kritična fluidna ekstrakcija, mehanička ekstrakcija (automatska preša), ne termalna plazma (Žugčić i sur. 2018.; Roselló-Soto i sur., 2015.). Nove metode su jednostavne, ponovljive i skraćuju proces ekstrakcije. Svaka biljka je jedinka za sebe te za maksimalnu ekstrakciju biološki

aktivnih spojeva potrebno je odrediti optimalne uvjete. Uvjeti poput termičke stabilnosti biološki aktivnih spojeva, tehnologija, vrijeme i temperatura ekstrakcije, pH i vrsta otapala koja se koristi za ekstrakciju presudni su za uspješnost ekstrakcije (Putnik i sur. 2017.; Roselló-Soto i sur. 2015.). Ahmad-Qasem i sur. (2013.) objavili su studiju koja je istraživala utjecaj temperature i načina sušenja biljnog materijala na konačnu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva. Testirali su dvije različite metode sušenja listova masline, jedna s vrućim zrakom (120 °C), a druga s niskim temperaturama. Objavili su da sušenje na vrućem zraku bolje utječe na sadržaj polifenola posebice oleuropeina, dok kod sušenja na niskim temperaturama to nije slučaj. Zaključili su da kraće vrijeme sušenja na vrućem zraku ima ulogu održavanja sadržaja polifenola u listovima masline za razliku od dugog sušenja na niskim temperaturama. Nove tehnologije koriste „GRAS“ (engl. generally recognized as safe) otapala poput vode, CO<sub>2</sub> i etanola (Žugčić i sur. 2018.). Znanstvena studija koju su objavili Yateem i sur. (2014.) pokazala je ovisnost određenih uvjeta na krajnju količinu biološki aktivnih spojeva. Studijom je dokazano da čista otapala (100% voda, 100% etanol, 100% metanol) su manje učinkovitija kod ekstrakcije oleuropeina za razliku od mješavine otapala (etanol/voda, metanol/voda, voda/acetanitril). Ujedno, studija je pokazala da viši pH otapala utječe na smanjenu ekstrakciju oleuropeina, dok je najviša ekstrakcija primijećena kod pH 3. Ultrazvučna (UZV) ekstrakcija ima kavitacijski učinak tako što povisuje temperaturu otapala i strujanje čestica iz biljne stanice disrupcijom stanične stijenke (vibracije ultrazvuka oslabljuju staničnu stijenku i membranu te proširuju pore stanice zbog čega je veća difuzija i osmoza biološki aktivnih spojeva) (Roselló-Soto i sur. 2015.). Kavitacijski učinak ovisi o frekvenciji i intenzitetu ekstrakcije, svojstvima medija/otapala (viskozitet i površinska napetost) te o uvjetima u sustavu (temperatura i tlak) (Giacometti i sur. 2018.). UZV ekstrakcija obuhvaća široki spektar dostupnosti instrumenata, no današnja znanost koristi uglavnom ultrazvučne sonde i kupelji (Roselló-Soto i sur. 2015.). UZV kupelji se češće koriste, no UZV sonde daju učinkovitiji kavitacijski efekt na način da lokaliziraju UZV energiju (Khemakhem i sur. 2017.). Bolja penetracija otapala u stanicu, viša učinkovitost i ponovljivost metode, ekstrakcija termolabilnih molekula, niska potrošnja otapala i emulgatora te ekološki čišća i jeftinija naspram konvencionalnih metoda neke su od karakteristika koje UZV ekstrakciju čine prioritarnom metodom (Roselló-Soto i sur. 2015.).

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Osnovne kemikalije

- Folin – Ciocalteau reagens (Sigma – Aldrich, Njemačka)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (GramMol, Hrvatska)
- Natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_2$ ) (GramMol, Hrvatska)
- Aluminijev klorid ( $\text{AlCl}_3$ ) (GramMol, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ) (GramMol, Hrvatska)
- $\alpha$ ,  $\alpha$ -difenil-  $\beta$ -pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) (GramMol, Hrvatska)
- Monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (VWR, SAD)
- Dinatrijev fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Kemika, Hrvatska)
- Barijev klorid ( $\text{BaCl}_2$ ) (Kemig, Hrvatska)
- Sulfatna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Kemig, Hrvatska)

#### 3.2. Antibiotici

- Ciprofloksacin (5  $\mu\text{g}$ ) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)
- Eritromicin (15  $\mu\text{g}$ ) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)
- Tetraciklin (30  $\mu\text{g}$ ) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)
- Ampicilin-sulbaktam (10/10  $\mu\text{g}$ ) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)
- Ampicilin (2  $\mu\text{g}$ ) (BBL™ Sensi-Disc™, Francuska)

#### 3.3. Laboratorijski pribor i oprema

- Analitička vaga (Precisa, Švicarska)



- Ultrazvučna (UZV) sonda (Hielscher Ultrasonics, Njemačka)
- Spektrofotometar UV – 1700 (Shimadzu, Japan)
- Optički čitač mikrotitarskih ploča (EL800, BioTek Instruments,VT, SAD)
- Filter papir Whatman 40 (8 µm) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Rotacijski evaporator (Heidolph, Njemačka)
- Liofilizator Alpha 1 - 2 (Christ, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Njemačka)
- Homogenizirajuća treskalica (Biosan, Latvija)
- Celulozni diskovi (Bio-Rad, Francuska)
- Membranski filter (0,22 µm) (VWR, SAD)
- Inkubator s tresilicom (Orbital Shaker-Incubator ES-20) (Biosan, Latvija)
- Mikrotitarske ploče (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Homogenizator Stomacher 400 Circulator (Seward, Engleska)
- Vodena kupelj (Nüve, Turska)
- Software Design – Expert (Stat-Ease Inc., SAD)

### **3.4. Otopine i puferi**

#### **3.4.1. Fiziološka otopina (0,85% NaCl)**

Fiziološka otopina (0,85% NaCl) pripravljena je otapanjem 8,5 g NaCl (GramMol, Hrvatska) u 1000 ml destilirane vode te je zatim sterilizirana pri 121 °C kroz 15 minuta.

#### **3.4.2. Puferirana peptonska voda**

Puferirana peptonska voda pripravljena je otapanjem 10 g peptona (Biolife, Italija), 5 g NaCl (GramMol, Hrvatska), 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (VWR, SAD) i 3,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kemika, Hrvatska) u 1000 ml destilirane vode. Ovako dobivena otopina je potom sterilizirana pri 121 °C kroz 15 minuta.

### 3.4.3. McFarland standard (0,5)

McFarland standard (0,5) pripremljen je miješanjem 0,05 ml 1,175% BaCl<sub>2</sub> (Kemig, Hrvatska) i 9,95 ml 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kemig, Hrvatska). Turbiditet ovako pripremljene odgovara brojnosti bakterija od 1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml.

### 3.5. Selektivni mediji za obogaćivanje i hranjive podloge za izolaciju bakterija i gljiva

Za određivanje mikrobiološke čistoće polaznog materijala za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva (prah lista masline) i samih ekstrakata, te za određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata korištene su različite hranjive podloge. Pregled korištenih podloga, metoda i pripadajuće ciljane skupine mikroorganizama prikazane su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Pregled podloga i metoda za određivanje mikrobiološke čistoće lista i ekstrakta masline, uzgoj biomase i određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata.

Podloga	Namjena	Mikroorganizmi	Metoda
PCA čvrsta hranjiva podloga (engl. <i>Plate Count Agar</i> )	Izolacija, određivanje brojnosti	Aerobne mezofilne bakterije (AMB), aerobne sporogene bakterije (ASB)	ISO 4833-2
DRBC čvrsta hranjiva podloga (engl. <i>Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol</i> )	Izolacija, određivanje brojnosti	Kvasci, plijesni	ISO 21527-2
VRBG čvrsta hranjiva podloga (engl. <i>Violet Red Glucose Bile</i> )	Izolacija, određivanje brojnosti	<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-2
OCLA čvrsta hranjiva podloga (engl. <i>Oxoid Chromogenic Listeria Agar</i> )	Izolacija, određivanje brojnosti	<i>Listeria</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2
Muller-Kauffmann tetrationsat tekuća hranjiva podloga (MKTn) (engl. <i>Muller-Kauffmann Tetrathionate Broth Base</i> )	Obogaćivanje, izolacija	<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6597-1
RVS tekuća hranjiva podloga (engl. <i>Rappaport Vassiliadis Soy</i> )	Obogaćivanje, izolacija	<i>Salmonella</i> spp. s iznimkom <i>S. typhi</i> i <i>S. paratyphi</i>	ISO 6597-1
XLD čvrsta hranjiva podloga (engl. <i>Xylose Lysine Desoxycholate</i> )	Izolacija, određivanje brojnosti	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.	ISO 6597-1
BHI čvrsta i tekuća hranjiva podloga (engl. <i>Brain Heart Infusion</i> )	Uzgoj izolata za ispitivanje antimikrobne aktivnosti	Autohtoni korisni izolati, potencijalni patogeni i patogeni iz hrane	Poglavlje 3.10.
Müller-Hinton čvrsta i tekuća hranjiva podloga	Antimikrobna aktivnost	Autohtoni korisni izolati, potencijalni patogeni i	CLSI M02-A12

### **3.5.1. PCA (engl. *Plate Count Agar*) čvrsta hranjiva podloga**

PCA čvrsta hranjiva podloga (BD Difco, SAD) pripravljena je otapanjem 23,5 g PCA podloge u 1000 ml destilirane vode. Smjesa je zatim zagrijana do temperature ključanja uz neprestano miješanje kako bi se podloga potpuno otopila u vodi. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C u vremenu od 15 minuta.

### **3.5.2. DRBC (engl. *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*) čvrsta hranjiva podloga**

DRBC čvrsta hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripravljena je otapanjem 15,5 g DRBC podloge u 500 ml destilirane vode. Smjesa je potom zagrijana kako bi se podloga potpuno otopila. Otopini je dodana bočica kloramfenikola u koncentraciji 0,1 g/l (Biolife, Italija) te je sterilizirana u autoklavu na 121 °C u vremenu od 15 minuta.

### **3.5.3. VRBG (engl. *Violet Red Bile Glucose*) čvrsta hranjiva podloga**

VRBG čvrsta hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripravljena je otapanjem 41,5 g podloge u 1000 ml destilirane vode uz zagrijavanje i neprestano miješanje do potpunog otapanja. Podloga je potom ohlađena do 45-50 °C i izlijana u sterilne Petrijeve zdjelice.

### **3.5.4. OCLA (engl. *Oxoid Chromogenic Listeria Agar*) čvrsta hranjiva podloga**

OCLA čvrsta hranjiva podloga (Oxoid, Velika Britanija) dobivena je otapanjem 34,5 g u 480 ml destilirane vode. Otopina je sterilizirana pri 121 °C kroz 15 minuta. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena na 50 °C i dodane su joj bočica *Chromogenic Listeria Selective Supplement* (SR0226E, Oxoid, Velika Britanija) i bočica *OCLA Differential Supplement* (SR0244E, Oxoid, Velika Britanija).

### **3.5.5. Muller-Kauffmann tetratonat tekuća hranjiva podloga (MKTTn, engl. *Tetrathionate Broth Base*) tekuća hranjiva podloga**

MKTTn tekuća hranjiva podloga (Biolab, Italija) je selektivni medij koji se koristi za obogaćivanje vrsta roda *Salmonella*. Dobivena je otapanjem 45 g podloge u 500 ml destilirane vode. Ovako dobivena otopina se zatim zagrije do ključanja uz neprestano miješanje. Potom je podloga ohlađena na 50 °C i dodane su joj bočica novobiocina (20 mg, Biolab, Italija), 5 ml Brilliant Green otopine (Biolab, Italija) i bočica jod-jodidne otopine (3 g I<sub>2</sub> + 2,5 g KI, Biolab, Italija).

### **3.5.6. RVS (engl. *Rappaport Vassiliadis Soy*) tekuća hranjiva podloga**

RVS tekuća hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripravljena je otapanjem 26,6 g podloge u 1000 ml destilirane vode. Ovako dobivena otopina je zagrijana do potpunog otapanja podloge i sterilizirana pri 115 °C u tijekom 15 minuta.

### **3.5.7. XLD (engl. *Xylose Lysine Desoxycholate*) čvrsta hranjiva podloga**

XLD čvrsta hranjiva podloga (Biolab, Italija) pripravljena je otapanjem 57 g podloge u 1000 ml destilirane vode. Medij je zatim zagrijan do temperature ključanja uz neprestano miješanje. Podloga je potom ohlađena i izlijana u sterilne Petrijeve zdjelice. Medij nije potrebno sterilizirati.

### **3.5.8. BHI (engl. *Broth heart infusion*) čvrsta hranjiva podloga**

BHI čvrsta hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripravljena je otapanjem 37 g BHI bujona u 1000 ml destilirane vode uz dodatak 15 g agara (Biolife, Italija). Otopina je sterilizirana u autoklavu na 121 °C kroz 15 minuta.

### **3.5.9. BHI (engl. *Broth heart infusion*) tekuća hranjiva podloga**

BHI tekuća hranjiva podloga (Biolife, Italija) je pripravljena otapanjem 37 g BHI bujona u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

### **3.5.10. Muller-Hinton (MH) čvrsta hranjiva podloga**

MH čvrsta hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripravljena je otapanjem 22 g podloge i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1000 ml destilirane vode te zagrijana uz neprestano miješanje i potom je sterilizirana pri 121 °C kroz 15 minuta.

### **3.5.11. Muller-Hinton (MH) tekuća hranjiva podloga**

MH tekuća hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripravljena je otapanjem 22 g podloge u 1000 ml destilirane vode. Otopina je zagrijana uz neprestano miješanje, nakon čega je sterilizirana 121 °C kroz 10 minuta.

## **3.6. Uzorkovanje biološkog materijala (list masline) i priprema uzorka za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva**

Listovi masline prikupljeni su u maslinicima Zadarskog zaleđa, u području Ravnih Kotara. Korištena je metoda nasumičnog branja s više različitih stabala. Prikupljeni su s tri različite sorte masline u različitim omjerima: 70% Orkula, 15% Leccino i 15% Lastovka. Listovi su bili različite morfologije i fiziološkog stanja te različitog stadija rasta. Listovi su osušeni i skladišteni u papirnatim vrećama. Neposredno prije analiza, listovi su usitnjeni u

laboratorijskom mlinu (30 sekundi) te su prosijani kroz sito promjera 450  $\mu\text{m}$ . Pripremljeni uzorak praha lista masline je dalje korišten za pripremu ekstrakata.

### 3.7. Metode ekstrakcije

#### 3.7.1. Određivanje optimalnih uvjeta za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva

Prethodno samljeveni i prosijani suhi uzorak (prah lista masline) odvagano je na analitičkoj vagi (Precisa, Švicarska) i prelijevano s 100 ml destilirane vode. Optimalni uvjeti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (UPE) za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz praha suhog lista masline određeni su eksperimentalno uz pomoć programa DesignExpert v7.0.0. (Stat-Ease Inc., SAD) kroz tri varijabilna parametra (Tablica 2). Vrijeme (min) je ispitano na 1, 2 i 3 minute, masa praha lista masline (g) je ispitana pri 2, 4 i 6 g/l otapala (destilirana voda) i amplituda (A%) rada ultrazvučne sonde koja je ispitana pri 25, 50 i 75%.

Tablica 2. Eksperimentalni dizajn određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije

Broj uzorka	Sekvenca	Vrijeme (min)	g praha lista masline/l otapala	Amplituda (%)
6	1	1,00	4,00	75,00
16	2	2,00	4,00	50,00
7	3	3,00	4,00	25,00
1	4	2,00	2,00	25,00
15	5	2,00	4,00	50,00
11	6	3,00	2,00	50,00
8	7	3,00	4,00	75,00
12	8	3,00	6,00	50,00
10	9	1,00	6,00	50,00
13	10	2,00	4,00	50,00
4	11	2,00	6,00	75,00
3	12	2,00	6,00	25,00
5	13	1,00	4,00	25,00
2	14	2,00	2,00	75,00
14	15	2,00	4,00	50,00
9	16	1,00	2,00	50,00
17	17	2,00	4,00	50,00

Nakon provedene ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, uzorci su odmah profiltrirani kroz muslin (kako bi se uklonile veće čestice), a zatim kroz Whatman No.4 filter papir. Dobiveni ekstrakti su prebačeni u odmjernu tikvicu i dopunjeni otapalom (destilirana voda) do oznake. Takvi ekstrakti koristili su se za daljnje kemijske analize.

### **3.7.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz lista masline u optimalnim uvjetima**

Ekstrakt je pripremljen pri optimalnim uvjetima ( $\gamma=6$  g/l,  $A=75\%$ ,  $t=3$  min) dobivenim prema DesignExpert statističkom alatu. 0,6 g praha lista masline dodano je u 100 ml destilirane vode i podvrgnuto ultrazvukom potpomognutoj ekstrakciji. Suspenzija je filtrirana kroz muslim, a zatim kroz Whatman No.4 filter papir. Tako pripremljeni ekstrakt je korišten za daljnje analize određivanja biološki aktivnih spojeva i antimikrobne aktivnosti.

### **3.7.3. Ukoncentriravanje ekstrakata lista masline (modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija)**

Odvagano je 4 g suhog uzorka i suspendirano u 100 ml destilirane vode. Suspenzija je zatim podvrgnuta ultrazvučnoj ekstrakciji u trajanju od 6 minuta i amplitude 100%. Nakon obavljenog rada ultrazvučne sonde (Hielscher Ultrasonics, Njemačka) suspenzija je filtrirana kroz muslim, a zatim kroz Whatman No.4 filter papir. Otapalo iz dobivenog ekstrakta se otpari na rotacijskom vakuum uparivaču do suhog te se liofilizira. 1 g liofiliziranog uzorka se suspendira u 5 ml sterilne destilirane vode. Suspenzija se homogenizira u ultrazvučnoj kupelji (Elma, Njemačka). Suspenzija se filtrira kroz sinter lijevak te koristi za daljnje analize.

### **3.7.4. Konvencionalna metoda ekstrakcije s vrućom destiliranom vodom**

Odvagano je 2 g praha lista masline i preliveno s 18 ml kipuće destilirane vode (100 °C). Ovako pripremljena otopina ostavljena je da stoji 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga suspenzija je pažljivo uklonjena i korištena u daljnjim analizama.

## **3.8. Određivanje biološki aktivnih spojeva u ekstraktima**

### **3.8.1. Određivanje ukupnih polifenola**

Ukupni polifenoli određeni su Folin-Ciocalteuovom metodom. Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, Njemačka) je otopina koja se tijekom reakcije reducira elektronima koji potječu od oksidacije polifenola prisutnih u uzorku. Metoda se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji, odnosno promjenom boje iz žute u plavu koja se detektira UV/VIS spektrofotometrom. Reakcija formira plavi kromofor koji potječe od fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline (Agbor i sur., 2014), a maksimum apsorbancije kromofora ovisi o alkaličnosti otopine i koncentraciji polifenola (Blainski i sur., 2013). Intenzitet plavog obojenja je proporcionalan koncentraciji polifenola u uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

U staklenu epruvetu je otpipetirano 100  $\mu$ l ekstrakta, 7,9 ml destilirane vode, 500  $\mu$ l Folin-Ciocalteu reagensa (1:2 H<sub>2</sub>O) i 1,5 ml 20% -tne otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Slijepa proba je pripremljena na isti način kao i ispitivani uzorci samo se umjesto uzorka dodaje isti volumen destilirane vode. Vrijednosti se očitavaju na UV – 1700 spektrofotometru (Shimadzu, Japan) pri valnoj duljini od 765 nm. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih

vrijednosti koncentracija galne kiseline, izradi se baždarni pravac prema čijoj se jednadžbi pravca izračunava koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima za izmjerene vrijednosti apsorbancija. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline po litri uzorka (mg EGK/l).

### **3.8.2. Određivanje ukupnih flavonoida**

Ukupni flavonoidi su određeni spektrofotometrijski. U staklenu epruvetu dodano je redom 1 ml ekstrakta, 6,4 ml destilirane vode te 300  $\mu$ l NaNO<sub>2</sub>, te je smjesa vorteksirana. Nakon 5 minuta dodano 300  $\mu$ l AlCl<sub>3</sub>, smjesa je vorteksirana i ostavljena da stoji 6 minuta. Na kraju su dodana 2 ml 1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH, sve zajedno je vorteksirano te je apsorbancija očitana na spektrofotometru pri valnoj duljini od 360 nm. Usporedno se napravljena slijepa proba u koju umjesto uzorka ide isti volumen destilirane vode. Rezultati su dobiveni uspoređivanjem kalibracijske krivulje kvercetina (0-100  $\mu$ g/ml), a izraženi su kao mg ekvivalenta kvercetina po litri uzorka (mg EK/l) (Aryal i sur., 2019).

### **3.8.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom**

Metoda se zasniva na korištenju slobodnog radikala  $\alpha$ ,  $\alpha$ -difetil-  $\beta$ -pikrilhidrazil (DPPH) koji je stabilan u svom izvornom stanju (Kedare i Singh, 2011). Slobodni radikal DPPH sa svojim ne sparenim elektronom na dušiku daje maksimalnu apsorpciju pri 517 nm valne duljine što se očituje u ljubičastoj boji otopine. Antioksidansi u uzorku djeluju kao donori vodika te na taj način DPPH prelazi u reducirani oblik (DPPH-H) što utječe na smanjenje apsorpcije i promjenu boje u žutu (Shekhar i Anju, 2014).

U epruvetu je dodano 100  $\mu$ l uzorka i 3,9 ml 0,094 mmol/dm<sup>3</sup> otopine DPPH nakon čega je suspenzija vorteksirana i ostavljena 30 minuta u mraku. Tijekom tog perioda slobodni radikal (DPPH) se reducira te se ovisno o koncentraciji antioksidansa u uzorku mijenja boja iz ljubičaste u žutu. Na isti način pripremljena je i slijepa proba kojoj je umjesto ekstrakta dodan metanol. Promjena apsorbancije DPPH radikala izračunata je oduzimanjem apsorbancije slijepa probe od apsorbancije ekstrakta. Na temelju izmjerenih vrijednosti i poznatih koncentracija standarda Trolox izrađen je baždarni dijagram te je pomoću jednadžbe baždarnog pravca izračunata koncentracija. Rezultati su izraženi kao mmol ekvivalenta Trolox-a (ET) po litri ekstrakta (mmol ET/l).

### **3.8.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom**

ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je stabilni kation radikal, plavo zeleni kromofor koji ima maksimalnu apsorpciju pri 734 nm valne duljine. Metoda mjeri sposobnost antioksidansa da djeluju kao donori elektrona ili atoma vodika te reduciraju ABTS što smanjuje njegovu apsorpciju valne duljine (Zhong i Shahidi, 2015).

U epruvetu je dodano 40  $\mu$ l ekstrakta i 40 ml ABTS<sup>+</sup> radikala, nakon čega je suspenzija vorteksirana i ostavljena 6 minuta u mraku nakon čega je izmjerena apsorpcija na

spektrofotometru (Shimadzu, Japan) pri valnoj duljini 734 nm. Usporedno je napravljena slijepa proba u koju je umjesto ekstrakta dodana destilirana voda. Na temelju izmjerenih vrijednosti i poznatih koncentracija standarda Trolox-a izradi se baždarni dijagram te se pomoću jednadžbe baždarnog pravca računa koncentracija. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta Trolox-a (ET) po litri ekstrakta (mmol ET/l).

### 3.9. Određivanje mikrobiološke čistoće lista i ekstrakta lista masline

Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline određena je kako je propisano Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10, 153/11) i Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2011.). Određen je ukupan broj aerobnih mezofilnih (AMB) i aerobnih sporogenih (ASB) bakterija (ISO 4833-2:2013), bakterija obitelji *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2017) bakterija rodova *Listeria* (ISO 11290-2:2017) i *Salmonella* (ISO 65971:2017) te plijesni i kvasaca (ISO 21527-2:2008).

Prah lista masline (1 g) ili ekstrakt lista masline (1 ml) pomiješani su s 9 ml puferirane peptonske vode te su homogenizirani (Seward, Stomacher 400 Circulator, Engleska) tijekom 30 sekundi. Ova suspenzija je korištena je za određivanje brojnosti svih navedenih skupina, s izuzetkom ASB. Za određivanje brojnosti ASB dio suspenzije inkubiran u vodenoj kupelji (Nüve, Turska) pri 80 °C tijekom 10 min kako bi se uništile prisutne vegetativne bakterijske stanice (Postollec i sur., 2012).

Dobivene suspenzije su potom decimalno serijski razrijeđene u puferiranoj peptonskoj vodi u rasponu od  $10^{-1}$  do  $10^{-4}$ . Odgovarajuća razrijeđenja su nacijepljena u dva ponavljanja, u volumenu od 0,1 ml na krute PCA (AMB, ASB), DRBC (plijesni i kvasci) i OCLA (*Listeria* spp.) podloge.

Brojnosti enterobakterija određena je u duplikatima, gdje je 1 ml odgovarajućeg razrijeđenja preliven VRBG agarom.

Kako bi se potvrdila odnosno isključila prisutnost bakterija roda *Salmonella* na listu ili u ekstraktima lista maslina potrebno je dobivene suspenzije obogatiti u RVS i MKTTn tekućoj hranjivoj podlozi. U 10 ml RVS tekuće hranjive podloge dodan je 0,1 ml suspenzije, a u 10 ml MKTTn tekuće hranjive podloge 1 ml suspenzije. RVS je inkubirana pri 41,5 °C kroz 24 h, a MKTTn pri 37 °C kroz 24 sata. Obogaćeni uzorci su nakon inkubacije sterilnom ezom direktno nacijepljeni na XLD ploče i inkubirani 24 sata pri 37 °C. Brojnost bakterija roda *Salmonella* određena je izravnim nacijepljivanjem 0,1 ml odgovarajućeg razrijeđenja na XLD ploče u duplikatima.

Ploče su inkubirane prema zahtjevima kulture, AMB i ASB (aerobno, 30 °C/72 h) plijesni i kvasci (25 °C/2-5 dana), *Listeria* spp. (aerobno, 37 °C/24 h), enterobakterije (anaerobno, 37 °C kroz 24 h) i *Salmonella* spp. (anaerobno, 37 °C/24 h).



Nakon inkubacije, izbrojane su pojedinačne kolonije i izračunat je broj mikroorganizama koji formiraju kolonije (engl. *Colony Forming Units*) prema formuli:

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{nacijepjeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrijeđenja}$$

Brojnost svih mikroorganizama izražena je kao CFU/g praha lista masline ili CFU/ml ekstrakta lista masline.

### **3.10. Uzgoj izolata za određivanje antimikrobne aktivnosti**

U ovom istraživanju korišteni su autohtoni sojevi izolirani iz tradicionalnih, spontano fermentiranih kobasica od mesa divljači (*Lb. sakei* LS0296 i *E. durans* ED004) i tradicionalnog istarskog sira (*Lc. lactis* LL8307). Korišteni izolati su identificirani i detaljno sigurnosno i tehnološki okarakterizirani molekularno-biološkim metodama u okviru prijašnjih istraživanja (Mrkonjić Fuka i sur. 2013; Mrkonjić Fuka i sur. 2020.). Uz korisne izolate korišteni su i potencijalno patogene Gram pozitivne (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231), *Listeria innocua* (ATCC 33090) i *Bacillus cereus* (DSM 6791)) te Gram negativne (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221)) bakterije. Svi izolati su dio kolekcije Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i pohranjeni su u glicerolu pri 20 °C do korištenja u mikrobiološkim analizama.

Kako bi se uzgojila potrebna biomasa izolati su pročišćeni do monokulture metodom iscrpljenja na krutoj BHI podlozi (Biolife, Italija) te inkubirani su pri uvjetima optimalnim za rast svake kulture. *E. durans* ED004, *Lc. lactis* LL8307, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus* i *Escherichia coli* inkubirani su aerobno pri 30 °C tijekom 24 h, a *S. enterica* subsp. *enterica* i *Lb. sakei* LS0296 anaerobno pri 30 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije, po jedna kolonija za svaki izolat je sterilno precijepljena u 2 ml tekuće BHI podloge i inkubirana na temperaturi od 30 °C preko noći i precijepljena na krute BHI podloge. Nakon inkubacije, nasumično odabrane kolonije za svaki izolat su obojane po gramu i mikroskopskim pregledom svaka vrsta je morfološki okarakterizirana. Ovako pripremljene kolonije predstavljaju pročišćene monokulture korištene u daljnjim analizama.

### **3.11. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata masline dobivenih ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom**

Uspješnost ekstrakcije biološki aktivnih spojeva u optimalnim uvjetima (Poglavlje 3.7.2.) provjerena je vizualnim određivanjem antimikrobnog djelovanja na korisne, Gram pozitivne i Gram negativne potencijalne patogene (poglavlje 3.10.) biomase 10<sup>6</sup> CFU/ml u

mikrotitarskim pločama (Sigma-Aldrich, Njemačka). Izolati za ispitivanje antimikrobne aktivnosti su uzgojeni kao što je opisano u Poglavlju 3.10. Za svaki izolat nekoliko kolonija sterilno je prebačeno u 10 ml fiziološke otopine (0,85% NaCl) do postizanja zamućenja koje odgovara zamućenju 0,5 McFarland standarda (odgovara broju stanica  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml). Ovako dobivene suspenzije svakog izolata razrijeđene su u 0,85% fiziološkoj otopini u omjeru 1:10 kako bi se pripremila biomasa od  $10^6$ . Ispitano je djelovanje 7 različitih koncentracija ekstrakta maslinovog lista koje su varirale u rasponu 3,9-250  $\mu\text{g/ml}$ . Raspon koncentracija postignut je metodom dvostruke serijske mikrodilucije u Müller-Hinton tekućoj hranjivoj podlozi. Svaki bunar je u ukupnom volumenu od 100  $\mu\text{l}$  sadržavao ekstrakt lista masline testirane koncentracije i odgovarajući izolat biomase  $10^6$  CFU/ml. Za kontrolu bakterijskog rasta svakog izolata, biomasa  $10^6$  dodana je u ukupan volumen Müller-Hinton tekuće podloge od 100  $\mu\text{l}$ , bez dodatka ekstrakta lista masline. Mikrotitarska ploča je inkubirana 24 sata pri 37 °C uz stalno miješanje pri 90 okretaja/min (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Latvija). Rast izolata je detektiran vizualno, zamućenje podloge smatra se indikatorom rasta i izostankom antimikrobnog djelovanja ispitivanog ekstrakta.

### **3.12. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakta lista masline dobivenog modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom**

Ekstrakti dobiveni modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom rezultirali su tamno smeđe obojenim ekstraktima čija se antimikrobna aktivnost nije mogla utvrditi kako je opisano u Poglavlju 3.11. Stoga, njihova antimikrobna aktivnost testirana je disk difuzijskom metodom.

Na sterilne celulozne diskove (Bio-Rad, Francuska) nanešen je ekstrakt masline do postizanja koncentracija: 50  $\mu\text{g/disk}$ , 200  $\mu\text{g/disk}$  i 600  $\mu\text{g/disk}$ . Diskovi su potom inkubirani pri 30 °C tijekom 30 min kako bi se olakšala difuzija ekstrakta u celulozne diskove.

Ispitivane kulture uzgojene su kao što je opisano u Poglavlju 3.10. i suspendirane su u 0,85% fiziološkoj otopini do turbiditeta koji odgovara 0,5 Mc Farland standarda. Kulture su potom sterilnim vatenim štapićem razmazane na Müller-Hinton agaru na koji se polažu prethodno pripremljeni celulozni diskovi.

U svrhu određivanja % antimikrobnog djelovanja ekstrakta lista masline u odnosu na konvencionalne antibiotike, testirani izolati pripremljene su na isti način, s time da su umjesto celuloznih diskova s ekstraktom masline korišteni konvencionalni antibiotici, eritromicin (15  $\mu\text{g}$ , BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) i tetraciklin (30  $\mu\text{g}$ , BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) za Gram pozitivne i ampicilin-sulbaktam (10/10  $\mu\text{g}$ , BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) i ciprofloksacin (5  $\mu\text{g}$ , BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) za Gram negativne izolate.

Testiranje je provedeno u dva ponavljanja. Podloge su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije izmjereni su radijusi zone inhibije rasta oko diskova i izraženi su kao srednje vrijednosti u mm.

### **3.13. Statistička analiza**

Za testiranje značajnih razlika u mikrobiološkoj čistoći lista i ekstrakata lista masline korištena je jednofaktorska analiza varijance ANOVA (engl. *One-Way ANOVA*) i *post-hoc* Tukey HSD test za višestruko uspoređivanje srednjih vrijednosti. Razlike se smatraju statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ . Sve statističke analize napravljene su u računalnom programu Microsoft Excel 2016 pomoću dodatka Analysis ToolPak.

## 4. Rezultati

### 4.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih spojeva

Proces optimizacije ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (UPE) uključivao je izmjere sadržaja ukupnih polifenola (UPF), ukupnih flavonoida (UF) te antioksidacijske aktivnosti (ABTS i DPPH). Obradom izmjerenih vrijednosti biološki aktivnih spojeva pri zadanim uvjetima (DesignExpert) i na temelju maksimalnih vrijednost određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije ( $\gamma=6\text{g/l}$ ,  $A=75\%$ ,  $t=3\text{ min}$ ). Prema dobivenim optimalnim uvjetima za UPE pripremljen je ekstrakt te su određeni biološki aktivni spojevi i antioksidacijska aktivnost. Izmjerene eksperimentalne i očekivane (DesignExpert) vrijednosti biološki aktivnih spojeva su prikazani u Tablici 3.

**Tablica 3.** Izmjerene i očekivane vrijednosti biološki aktivnih spojeva kod optimalnih uvjeta ekstrakcije ( $\gamma=6\text{ g/l}$ ,  $A=75\%$ ,  $t=3\text{ min}$ )

Biološki aktivni spojevi	UPF <sup>a</sup> (mg GAE/l)	UF <sup>b</sup> (mg QE/l)	ABTS <sup>c</sup> (mmol ET/l)	DPPH <sup>c</sup> (mmol ET/l)
Očekivane vrijednosti <sup>d</sup>	296,22	330,88	0,97	0,84
Izmjerene vrijednosti	292,99	314,32	1,02	0,90
Relativna pogreška (%)	1,09	5,00	4,96	7,08

<sup>a</sup> UPF-ukupni polifenoli, <sup>b</sup> UF-ukupni flavonoidi <sup>c</sup> ABTS i DPPH-antioksidansi

<sup>d</sup> Očekivane vrijednosti su pretpostavljene vrijednosti software-a DesignExpert, a eksperimentalno dobivene vrijednosti (prosjeck nekoliko ponovljenih mjerenja) biološki aktivnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata.

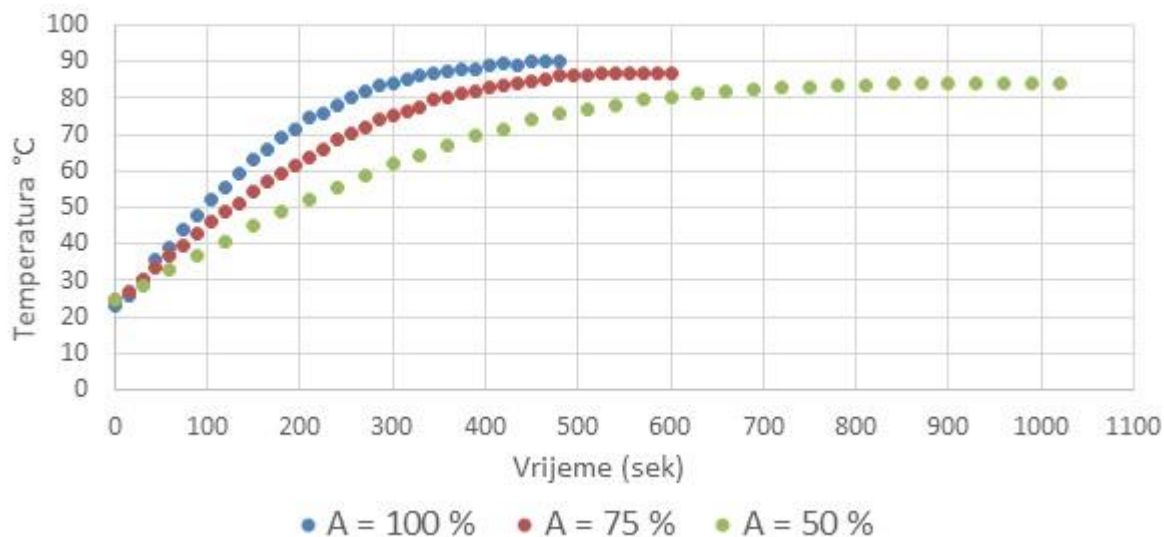
Dobiveni eksperimentalni rezultati su u skladu s predviđenim (DesignExpert) rezultatima te pogreške nisu značajne.

Prema dobivenim rezultatima udio ukupnih polifenola (UP) u ekstraktu je 292,99 mg EGK/l, odnosno prema iskorištenju 48,83 mg EGK/g praha lista masline. Sadržaj ukupnih flavonoida je 314,32 mg EK/l, odnosno 52,39 mg EK/g praha. Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti korištene su ABTS i DPPH metode čije izmjerene vrijednosti iznose 1,02 mmol ET/l za ABTS i 0,90 mmol ET/l za DPPH.

#### 4.1.1. Kinetika ekstrakcije

Prethodnom UPE određen je temperaturni profil tretiranja suspenzije (otapalo+prah maslinovog lista) ovisno o amplitudi. Sukladno, izmjeren je profil „otpuštanja“ ukupnih

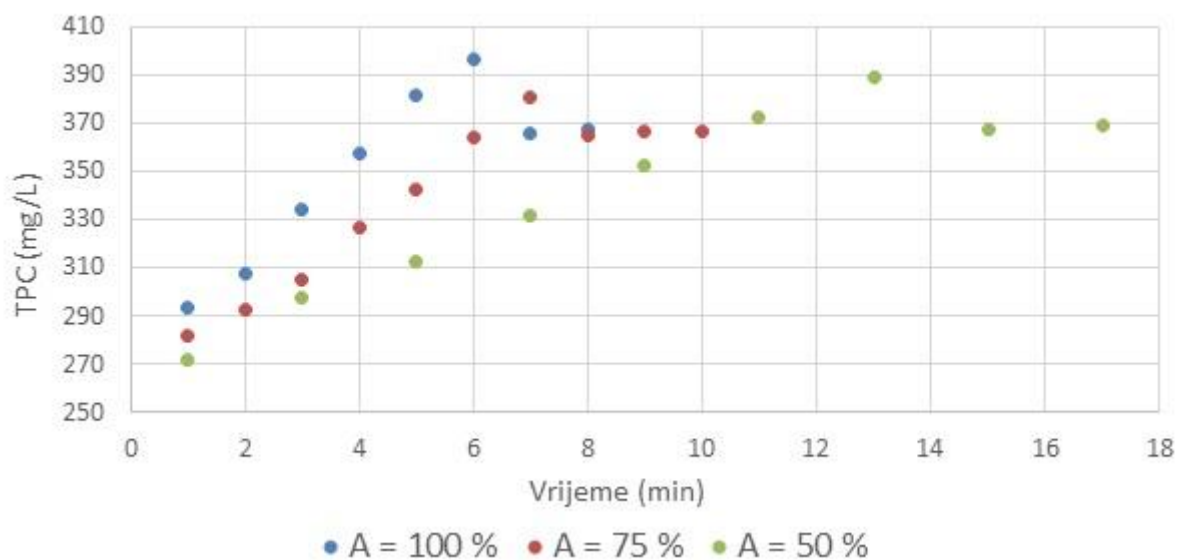
polifenola iz praha lista masline ovisno o amplitudi pri  $\gamma = 0,6 \text{ g/100 mL}$ . Rezultati su prikazani u Grafikonu 1. i 2.



\* $\gamma$  (prah lista masline) = 6 g/l

**Grafikon 1.** Temperaturni profil različitih amplituda rada UZV sonde

Uspoređen je učinak ekstrakcije pri tri različite amplitude na rast temperature u suspenziji. Najviša primijenjena amplituda (100%) rezultirala je povećanjem temperature (90 °C) već nakon 450 sekundi. Primjena niže amplitude rezultirala je i maksimalnom nižom temperaturom, a rezultati su uspoređeni sa profilom otpuštanja ukupnih polifenola.



\* $\gamma$  (prah lista masline) = 6 g/l

**Grafikon 2.** Ukupni polifenoli (UPF) u odnosu na amplitudu i vrijeme rada UZV sonde

Ukupni polifenoli prikazani su kao mg EGK/l. Sukladno temperaturnom profilu, viša amplituda rezultirala je relativno bržom ekstrakcijom ukupnih polifenola (6 min - 396,444 mg EGK/l), dok je maksimum ekstrakcije polifenola UPE pri nižoj amplitudi uočen značajno kasnije (13 min-389,143 mg EGK/l).

## 4.2. Modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih spojeva

U svrhu povećanja koncentracije biološki aktivnih spojeva koja se dobiva UPE, metoda ekstrakcije je modificirana. Na temelju predeksperimenta (Tablica 4.), odlučeno je koristiti početnu koncentraciju lista masline 40 g/l otapala u ekstrakciji.

**Tablica 4.** Eksperimentalno određivanje uvjeta ekstrakcije za dobivanje maksimalne koncentracije polifenola

Uvjeti	Koncentracija (g/l)	Srednja vrijednost eq. galna kiselina (mg/l)	Standardna devijacija
6 min/100A*	10	505,11	8,27
6 min/100A*	15	789,5	11,01
6 min/100A*	20	1030,89	6,57
6 min/100A*	30	1462,74	11,29
6 min / 100A*	40	1839,41	21,42
6 min/100A*, liofilizacija	40	23519,78	149,59

\* A-postotak amplitude (%)

Iz dobivenih rezultata jasno je vidljivo da veća početna masena koncentracija ( $\gamma$ ) rezultira ekstrakcijom većeg udjela ukupnih polifenola. Početna koncentracija od 40 g/l rezultirala je ekstrakcijom 1839,41 mg EGK/l pri uvjetima koji su u skladu s kinetikom ekstrakcije ukupnih polifenola (6 min i A=100%). Ekstrakt s najvećom koncentracijom ukupnih polifenola je proveden kroz proces rotacijske evaporacije, a zatim liofilizacije. Konačno dobiveni liofiliziran uzorak je otopljen u 5 ml destilirane vode te analiziran u smislu ukupnih polifenola. Usporedba rezultata mjerenja polifenola prikazani su u Tablici 4.

## 4.3. Primjena konvencionalne ekstrakcije

Ispitana je i učinkovitost, s obzirom na dobivene koncentracije biološki aktivnih spojeva, konvencionalne ekstrakcije (KE) s vrućom destiliranom vodom. Rezultati konvencionalne ekstrakcije (KE) su prikazani u Tablici 5. te su uspoređeni s ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (UPE).

**Tablica 5.** Usporedba sadržaja biološki aktivnih spojeva dobivenih konvencionalnom i ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom

	UPF <sup>a</sup> (mg GAE/g s.tv.)	UF <sup>b</sup> (mg QE/g s.tv.)	ABTS <sup>c</sup> (mmol TE/g s.tv.)	DPPH <sup>c</sup> (mmol TE/g s.tv.)
KE <sup>d</sup>	46,85	2,93	0,22	0,17
UPE <sup>e</sup>	48,83	52,39	0,17	0,15

<sup>a</sup> UPF-ukupni polifenoli, <sup>b</sup> UF-ukupni flavonoidi, <sup>c</sup> ABTS i DPPH-antioksidansi, <sup>d</sup> KE-konvencionalna ekstrakcija, <sup>e</sup> UPE-ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

Rezultati mjerenja biološki aktivnih spojeva konvencionalnom ekstrakcijom uspoređeni su s ultrazvukom potpomognutom ekstrakcija. Sadržaj ukupnih polifenola i oksidacijski kapacitet ekstrakta vrlo su slični kod obje metode, dok je sadržaj ukupnih flavonoida gotovo 20 puta manji u ekstraktu dobivenom KE.

#### 4.4. Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline

Mikrobiološka čistoća lista (LM) i ekstrakata lista masline dobivenih konvencionalnom (KE), ultrazvukom potpomognutom (UPE) i modificiranom ultrazvukom potpomognutom (MUPE) ekstrakcijom utvrđene su određivanjem ukupnog broja AMB, ASB, enterobakterija, bakterija rodova *Listeria* i *Salmonella* te plijesni i kvasaca (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline dobivenih različitim metodama ekstrakcije. Prikazane su srednje vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama s pripadajućim standardnim devijacijama.

Mikroorganizmi	List masline [CFU/g]	KE* [CFU/ml]	UPE** [CFU/ml]	MUPE*** [CFU/ml]
AMB	1,2x10 <sup>4</sup> ±1,8x10 <sup>3</sup> (a)	5,8x10 <sup>3</sup> ±2,1x10 <sup>2</sup> (b)	4,3x10 <sup>2</sup> ±1,1x10 <sup>2</sup> (c)	1,1x10 <sup>3</sup> ±2,1x10 <sup>2</sup> (d)
ASB	3,5x10 <sup>2</sup> ±2,1x10 <sup>2</sup> (a)	4,1x10 <sup>3</sup> ±7,1x10 <sup>1</sup> (b)	3,0x10 <sup>4</sup> ±2,8x10 <sup>4</sup> (c)	2,0x10 <sup>4</sup> ±1,4x10 <sup>4</sup> (d)
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,7x10 <sup>3</sup> ±1,4x10 <sup>2</sup> (a)	0,0±0,0 (b)	0,0±0,0 (b)	0,0±0,0 (b)
<i>Salmonella</i> spp.	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>Listeria</i> spp.	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Plijesni i kvasci	2,9x10 <sup>3</sup> ±2,1x10 <sup>2</sup> (a)	0,0±0,0 (b)	0,0±0,0 (b)	0,0±0,0 (b)

\*KE-konvencionalna ekstrakcija, \*\*UPE-ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, \*\*\*MUPE-modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

(a), (b), (c) i (d) u istom redu označavaju statistički značajne razlike u brojnosti ispitivane grupe mikroorganizama ovisno o upotrebnoj metodi ekstrakcije, na razini značajnosti  $p = 0,01$ .

AMB i ASB pronađene su i na listu masline i u svim ekstraktima. AMB najbrojnije su na listu masline (1,2x10<sup>4</sup>±1,8x10<sup>3</sup>) dok se njihova brojnost značajno smanjuje ovisno o metodi

ekstrakcije ( $p < 0,01$ ). Najviše AMB preživljava KE (48,9%), a najmanje UPE (3,6%). Nasuprot tome, ASB su do 2 log puta brojnije ( $p < 0,01$ ) u svim ekstraktima nego na listu masline.

Enterobakterije ( $1,7 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^2$  CFU/g) i plijesni i kvasci ( $2,9 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^2$  CFU/g) pronađeni su samo na listu masline. U oba slučaja, uvjeti pod kojima su ekstrahirani biološki aktivni spojevi, djelovali su bakteriocidno odnosno fungicidno. S druge strane, patogene bakterije rodova *Listeria* i *Salmonella* nisu detektirane na listu masline, kao ni u ekstraktima dobivenim različitim metodama.

#### 4.5. Antimikrobna aktivnost ekstrakata lista masline

Antimikrobno djelovanje ekstrakta lista masline dobivenog UPE ispitano je u rasponu koncentracija 3,9-250  $\mu\text{g/l}$ . Nijedna ispitana koncentracija nije djelovala bakteriostatski niti bakteriocidno na korisne, potencijalno patogene i patogene izolate.

Utvrđeno je da su svi ispitivani Gram pozitivni izolati osjetljivi na tetraciklin (30  $\mu\text{g}$ ) i eritromicin (15  $\mu\text{g}$ ), a Gram negativni na ciprofloksacin (5  $\mu\text{g}$ ) i ampicilin-sulbaktam (10/10  $\mu\text{g}$ ) prema BBL standardima (Tablica 7.).

Antimikrobno djelovanje ekstrakta lista masline dobivenog MUPE ispitano je u rasponu koncentracija 50-600  $\mu\text{g/disk}$ . Ekstrakt je pokazao antimikrobno djelovanje na izolat *S. enterica* subsp. *enterica* u koncentraciji 600  $\mu\text{g/disk}$  pri kojoj je pokazao 26,1% učinkovitosti ciprofloksacina i 37,0% učinkovitosti ampicillin-sulbaktama, dok je pri 200  $\mu\text{g/disk}$  pokazao 20,4% učinkovitosti ciprofloksacina i 29,0% učinkovitosti ampicillin-sulbaktama. Pri 600  $\mu\text{g/disk}$  djelovao je još antimikrobno na *E. coli* pokazujući 23,2% učinkovitosti ciprofloksacina i 33,0% učinkovitosti ampicillin-sulbaktama i *L. innocua* s 28,3% učinkovitosti tetraciklina i 32,6% učinkovitosti eritromicina. Općenito, najizraženiji antimikrobni učinak detektiran je pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, s time da je taj učinak najizraženiji na izolat *L. innocua* (Tablica 7).



**Tablica 7.** Antimikrobno djelovanje ekstrakta lista masline dobivenog modficiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti promjera zone inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama.

Izolati	Zona inhibicije rasta (mm)						
	UPF* (50 µg)	UPF* (200 µg)	UPF* (600 µg)	Tetraciklin (30 µg)	Eritromicin (15 µg)	Ciprofloksacin (5 µg)	Ampicilin-sulbaktam (10/10 µg)
<i>Lb. sakei</i> LS0296	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	44,0±1,4	40,5±0,7	n.p.	n.p.
<i>E. durans</i> ED004	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	35,5±0,7	42,5±0,7	n.p.	n.p.
<i>Lc. lactis</i> LL8307	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	23,5±0,7	25,5±0,7	n.p.	n.p.
<i>S. aureus</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,0±1,4	29,0±1,4	n.p.	n.p.
<i>B. cereus</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	34,5±0,7	17,5±0,7	n.p.	n.p.
<i>L. innocua</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	11,8±0,4	41,5±2,1	36,0±4,2	n.p.	n.p.
<i>E. coli</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	8,3±0,4	n.p.	n.p.	35,5±0,7	25,0±0,0
<i>S. enterica</i>	0,0±0,0	7,3±0,4	9,3±0,4	n.p.	n.p.	35,5±0,7	25,0±1,4

\*UPF= ukupni polifenoli

n.p= nije primjenjivo

## 5. Rasprava

### 5.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološko aktivnih spojeva

Mnoga istraživanja pokazuju antimikrobna i antioksidacijska svojstva ekstrakata lista masline, s obzirom na bogat sadržaj biološki aktivnih spojeva (Sudjana i sur. 2009.; Lee i Lee 2010.; Aliabadi i sur. 2012.; Liu i sur. 2017.). Do sada je razvijeno mnogo različitih metoda ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz lista masline, no ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UPE) se pokazala učinkovitom i isplativom (Roselló-Soto i sur. 2015.). Kroz ovaj rad određeni su optimalni uvjeti UPE uz pomoć programa DesignExpert v7.0.0.

Relativno na udjel biološki aktivnih spojeva (ukupni polifenoli i flavonoidi) te antioksidacijsku aktivnost ekstrakta određeni su optimalni uvjeti pri  $A=75\%$ ,  $\gamma=6$  g/l,  $t=3$  min. Rezultati su u korelaciji s prijašnjim istraživanjima gdje povećanjem amplitude dolazi i do bolje učinkovitosti ekstrakcije biološki aktivnih spojeva (Chemat i sur. 2017.). S obzirom na početnu masenu koncentraciju, optimalna je određena pri najvećoj ispitivanoj s obzirom na kvantifikaciju spojeva u ekstraktu. S druge strane, ako gledamo s obzirom na iskorištenje, ekstrakcija materijala niže masene koncentracije rezultirala je povećanjem istog. Niži udjel početne mase u odnosu na otapalo dovodi do povećanja koncentracijskog gradijenta, a samim time i do povećanog transporta molekula (difuzija i osmoza) (Şahin i Şamli 2013.). S obzirom na to da je cilj bio dobiti maksimalnu koncentraciju biološki aktivnih tvari u konačnom ekstraktu, visoki  $\gamma$  se pokazao optimalnim. Ahmad-Qasem i sur. (2013.) su dokazali da se povećanjem vremena ekstrakcije, povećava i koncentracija polifenola, a rast je konstantan kroz 15 minuta UZV ekstrakcije. Irakli i sur. (2018.) nisu primjetili značajnu razliku u promijeni sadržaja polifenola u ekstraktima kod 10, 30 i 60 minuta UZV. U spomenutom radu kao otapalo korišten je aceton, a nakon 30. minute zabilježen je značajan pad u koncentraciji polifenola. U ovom radu dobiveni rezultati UPE pri optimalnim uvjetima su u skladu s literaturom.

Rezultati za ukupne polifenole (UPF) iznose 292,99 mg EGK/l, odnosno prema iskorištenju, 48,83 mg EGK/g s.tv. Usporedbom dobivenih rezultata s literaturom uočen je relativno visok sadržaj polifenola, s obzirom da je kao otapalo korištena samo voda. Druga istraživanja pokazala su visoki raspon sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima i to 20,37 mg EGK/g (Şahin i Şamli 2013.), 66 mg EGK/g (Ahmad-Qasem i sur. 2013.) te 92,49 mg GAE/g (Dobrinčić i sur. 2020). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju su relativno visoki, s obzirom na to da su u prethodno spomenutim istraživanjima korištena organska otapala. Također, važno je napomenuti da se korištenjem mješavina organskih otapala kao ekstrakcijskog medija postiže veća efikasnost ekstrakcije u odnosu na čista otapala (Dent i sur. 2012.). Dokazano je da topljivost polifenolnih spojeva značajno ovisi o polarnosti otapala koje se koristi (Naczki i Shahidi 2006.). Veća molekulska masa otapala omogućuje lakšu ekstrakciju tvari koje su slične molekulske mase kao i samo otapalo (Mokrani i Madani, 2016.).

S obzirom na relativno visoki sadržaj ukupnih flavonoida (314,32 mg EK/l), iskorištenje od 52,39 mg/g s.tv. je zavidno. Hannachi i sur. (2019.) su uz pomoć ultrazvučne kupelji ekstrahirali biološki aktivne tvari iz lista masline te dobili vrijednosti za ukupne flavonoide od 0,42-2,39 g RE/ 100 g uzorka. U odnosu na ekstrakciju u ultrazvučnoj kupelji, UZV sonda pokazuje bolju efikasnost s obzirom na ekstrakciju ovih spojeva.

Antioksidacijska aktivnost mjerena je dvjema metodama, ABTS i DPPH. Dobiveni rezultati su 1,02 mmol TE/l za ABTS te 0,90 mmol ET/l za DPPH, odnosno prema iskorištenju 30,6 mg ET/g s.tv. za ABTS, 27 mg ET/g s.tv. za DPPH metodu. Ahmad – Qasem i sur. (2013.) su UPE nakon 15 min dobili 7,2 mg ET/g uzorka. S obzirom na značajno dulje vrijeme ekstrakcije, očekivan je i značajan porast u antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata (Şahin i Şamli 2013.). Irakli i sur. (2018.) su odredili antioksidacijsku aktivnost korištenjem različitih otapala te su najveću vrijednost dobili u 50% - tnom acetonu koja je iznosila oko 40 mg ET/g uzorka, a najmanju vrijednost dobili su u vodi i iznosila je oko 17 mg ET/g uzorka. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata značajno ovisi o temperaturi i o otapalu koje se koristi tijekom procesa ekstrakcije.

## 5.2. Kinetika ekstrakcije polifenola

Osim što sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu ovisi o početnoj masenoj koncentraciji, značajno ovisi i o uvjetima UPE, primarno amplitudi. Amplituda utječe na kavitaciju u suspenziji, odnosno veličina amplitudnog vala ultrazvuka je proporcionalna veličini mjehura koja se stvara u suspenziji pod utjecajem rada sonde (Suslick i Price 1999.). Amplituda je direktno povezana s ultrazvučnim intenzitetom rada sonde, a sami intenzitet utječe na povećanje temperature u suspenziji (Chemat i sur. 2017.). Dobiveni rezultati su prosječna vrijednost nekoliko uzastopnih mjerenja. Vrijednosti ukupnih polifenola su s vremenom trajanja tretmana linearne. Pri amplitudi od 100% te nakon 6 minuta ekstrakcije sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu je 396,444 mg EGK/l. Dobrinčić i sur. (2020.) su također dokazali da pri maksimalnoj amplitudi dolazi do najvećeg transfera mase biološki aktivnih tvari s obzirom na to da dolazi do značajnog oštećenja biljnih stanica. Nakon ekstrakcije od 6 minuta dolazi do pada vrijednosti ukupnih polifenola u ekstraktu, što se može objasniti kritičnom temperaturom polifenola, odnosno degradacijom uslijed povišene temperature (Irakli i sur. 2018.). Iz grafikona 1 je vidljivo je da se nakon 6 minuta ekstrakcije pri amplitudi od 100% u suspenziji postiže temperatura od 87,3 °C. Druga postignuta maksimalna vrijednost ukupnih polifenola je pri amplitudi od 50% nakon 13 minuta ekstrakcije i iznosi 389,143 mg EGK/l. Nakon 13. minute dolazi do značajnog pada udjela ukupnih polifenola u ekstraktu uslijed povećanja temperature (83,3 °C). Ekstrakcija pri 75%-tnoj amplitudi nakon 7 minuta doseže vrijednost ukupnih polifenola u ekstraktu od 380,889 mg EGK/l. Nakon 7. minute ekstrakcije dolazi do degradacije ukupnih polifenola uslijed povećanja temperature (83,5 °C) suspenzije. Kod amplitude od 50% konačna temperatura nakon koje je primijećen pad je viša za ~ 9 °C u odnosu na konačnu temperaturu kod UPE amplitude od 75%. Duže

izlaganje uzorka (prah lista masline) UPE u vremenu od 13 minuta pri amplitudi od 50% imalo je pozitivan učinak na ekstrakciju ukupnih polifenola, relativno UPE pri 75%-tnoj amplitudi. Duljim tretmanom suspenzije UPE dolazi do povećanja temperature suspenzije, no niža razina amplitude značajno sporije utječe na povećanje temperature sustava. Generalno, dulje vrijeme izlaganja UPE poboljšava učinkovitost ekstrakcije čime dolazi do raspadanja stanične stijenke biljnog materijala te se omogućuje difuzija biološki aktivnih spojeva (Irakli i sur. 2018.). Uzevši u obzir sve tri temperature nakon kojih je primijećen pad polifenola, može se utvrditi da je prosječna kritična temperatura degradacije polifenola 84,7 °C kod  $\gamma=6$  g/l. Irakli i sur. (2018.) su pokazali da je temperatura od 60°C uz aceton kao otapalo učinkovita za ekstrakciju oleuropeina, hidroksitirozola i flavonoida iz lista masline. Rostagno i sur. (2007.) dokazali su da se do degradacije fenolnih spojeva dolazi pri temperaturama višim od 60 °C. Teh i Birch (2014.) odredili su optimalnu temperaturu za ekstrakciju polifenola iz sjemenki konoplje u iznosu od 70 °C. Može se zaključiti da povećanje temperature suspenzije značajno utječe na fizikalno-kemijske parametre odgovorne za UPE (Ahmad-Qasem 2013.).

### **5.3. Modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih spojeva**

S obzirom na to da ekstrakt dobiven pri optimalnim uvjetima UPE nije pokazao antimikrobna svojstva, podvrgnut je ukoncentriravanju. Zahvaljujući rezultatima iz grafikona 2, odlučeno je provoditi UPE pri 100%-tnoj amplitudi u trajanju od 6 minuta. Ekstrakcija s  $\gamma=10$  g/l rezultirala je s relativnom najnižom koncentracijom ukupnih polifenola (505,11 mg EGK/l) u ekstraktu. Povećanjem masene koncentracije (40 g/l) došlo je i do značajnog povećanja udjela ukupnih polifenola u ekstraktu. U principu, s obzirom na iskorištenje ekstrakcije, smanjenjem mase u odnosu na volumen koncentracijski gradijent sustava bi trebao biti veći prema principima pasivnog transporta omogućujući veću difuziju biološki aktivnih spojeva (Şahin i Şamli 2013.). U slučaju kada je masena koncentracija vrlo visoka, dolazi do ekstrakcije visokog udjela polifenola relativno na sadržaj otapala. Povećanjem masene koncentracije osigurava se veća dostupna količina biološki aktivnih spojeva koji mogu difundirati u otapalo, no sustav se može dovesti do zasićenja (difuzija) i time negativno utjecati na ekstrakciju (Prasad i sur. 2009.). Hannachi i sur. (2019.) su također potvrdili da se povećanjem mase naspram volumena otapala dobiva i veća koncentracija ukupnih polifenola i flavonoida u suspenziji.

Dobiveni konačni ekstrakt pri uvjetima:  $\gamma=40$ g/l, A=100%, t=6 min, podvrgnut je postupku ukoncentriravanja. Uz pomoć rotacijskog evaporatora (Heidolph, Njemačka), pri uvjetima od 150-200 rpm i 70 °C (niža temperatura zbog moguće degradacije biološki aktivnih spojeva) uklanja se otapalo (voda) u ekstraktu. Dobiveni koncentrat podvrgnut je procesu liofilizacije. 1 g liofiliziranog ekstrakta otopljen je u 5 ml destilirane vode. Određeni su ukupni polifenoli u iznosu od 23519,78 mg GAE/l, odnosno 587,99 mg GAE/g s.tv. Orak i sur. (2012.)

ekstrahirali su biološki aktivne spojeve iz lista masline pomoću kipuće vode i magnetske miješalice te su ekstrakt podvrgnuli zamrzavanju na  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  i liofilizaciji. Rezultati ukupnih polifenola koje su dobili su znatno manji od rezultata u ovom radu te iznose  $102,69\text{ mg EGK/g s.tv.}$ . Delgado-Adámez i sur. (2016.) također su liofilizirali ekstrakt lista masline nakon prethodnog ekstrahiranja u vrućoj vodi i smrzavanja na  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Njihovi rezultati iznosili su  $3404\text{ mg}$  ekvivalenata kafeinske kiseline/l otapala. Ahmad-Qasem i sur. (2013.) u svom istraživanju primijetili su da niže temperature smrzavanja rezultiraju smanjenjem koncentracije polifenola. Isti autori navode da niže temperature smrzavanja,  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  utječu na stvaranje većih kristala vode što oštećuje stanične strukture te samim time bi trebalo osloboditi više polifenola u otopinu.

#### **5.4. Konvencionalna metoda ekstrakcije s vrućom vodom**

Provedena je i konvencionalna metoda ekstrakcije biološki aktivnih spojeva kipućom vodom. Izmjereni su ukupni polifenoli (UPF), ukupni flavonoidi (UF) te antioksidacijska aktivnost (ABTS i DPPH). Dobivene vrijednosti uspoređene su s vrijednostima UPE (Tablica 4). Ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost ne odstupaju značajno što pokazuje veću učinkovitost UZV u kojoj je korištena niža početna masena koncentracija. Iako je u ekstrakciji korištena vruća voda ( $100^{\circ}\text{C}$ ) polifenoli i antioksidansi nisu se degradirali. Razlog tome je veća koncentracija ekstrakta ( $2\text{ g}/18\text{ ml}$ ) koja je omogućila više polifenola u konačnoj suspenziji. Rostagno i sur. (2007.) primijetili su degradaciju polifenola pri temperaturama višim od  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Optimalnu temperaturu ekstrakcije potrebno je odrediti eksperimentalno jer ovisi o više parametara (Ahmad-Qasem, 2013.). Velika razlika zabilježena je u koncentraciji flavonoida, čija koncentracija drastično pada pri temperaturama višim od  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Chaaban i sur. 2017.).

#### **5.5. Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline i antimikrobno djelovanje ekstrakata**

U ovom istraživanju, ukupni polifenoli ekstrahirani su iz lista masline pomoću 3 različite metode, konvencionalnom, ultrazvukom potpomognutom i modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom. Kako bi se ispitalo utječe li metoda ekstrakcije na brojnost i strukturu bakterijskih zajednica prirodno prisutnih na listu masline ispitana je mikrobiološka čistoća polaznog materijala i ekstrakata lista masline.

U netretiranom prahu listova masline najbrojnije su aerobne mezofilne ( $1,2 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$ ) bakterije, kvasci i plijesni ( $2,9 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^2$ ) te bakterije obitelji Enterobacteriaceae ( $1,7 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^2$ ), dok su aerobne sporogene ( $3,5 \times 10^2 \pm 2,1 \times 10^2$ ) prisutne u 1-2 log puta manjem broju. Brojnost AMB i kvasaca i plijesni u ovom istraživanju je 1-2 log puta veća od brojnosti aerobnih mezofilnih bakterija ( $2,5 \times 10^2 - 6,65 \times 10^2\text{ CFU/g}$ ) i plijesni i kvasaca ( $1,62 \times 10^2 - 1,71 \times 10^2\text{ CFU/g}$ ) koje su Sofo i sur. (2014.) detektirali na suhom maslinovom lišću. Nekoliko čimbenika može objasniti ovakvu razliku u brojnosti. Poznato je da kolonizacija

biljaka i posljedična brojnost mikroorganizmima, ovisi o čimbenicima kao što su vrsta tkiva, razvojni stadij, fiziološko stanje, genotip biljke i poljoprivredna praksa (Hardoim i sur. 2008.; Singh i sur. 2009.). Nadalje, dodatni mikroorganizmi mogu dospjeti na biljke putem vode i tla, te tijekom prikupljanja, obrade i skladištenja (Bhat i sur. 2010.; Katusin-Razem i sur. 2001.). Ovakvi biljni materijali mogu izravno utjecati na ljudsko zdravlje, uzrokovati kontaminaciju i kvarenje farmaceutskih i prehrambenih proizvoda kojima se dodaju, te negativno utjecati na biološki aktivne tvari u biljnom materijalu tijekom skladištenja (Thomas i sur. 2008.).

U konvencionalnoj ekstrakciji temperatura vode koja se koristi kao otapalo za ekstrakciju doseže 100 °C/5 min, dok se kod UPE i MUPE razvijaju temperature od 60 °C uz istovremeno djelovanje ultrazvuka (A 75%, 3 min). Sve ispitane metode ekstrakcije, značajno su smanjile brojnost aerobnih mezofilnih bakterija. KE je uzrokovao oko 1 log redukciju brojnosti što je u skladu s istraživanjem koje su proveli Ukuku i sur. (2004.). UPE i MUPE su uzrokovali znatno veću redukciju brojnosti (2 log) iako se kod tih metoda razvila niža temperature nego kod KE. Međutim, istovremeno s temperaturom, kao stresor na bakterijske stanice, djeluje i ultrazvuk, a ultrazvuk frekvencije 20-100 kHz uspješno inaktivira mikroorganizme (Gao i sur. 2014.).

Suprotno AMB, aerobne sporogene bakterije su do 2 log puta brojnije u ekstraktima nego na listu masline. Za razliku od AMB, ASB odlikuju se sposobnošću formiranja spora u nepovoljnim uvjetima što im daje prednost u preživljavanju u odnosu na druge bakterije. Sakanaka i sur. (2000.) pokazali su da sporogene bakterije roda *Bacillus* formiraju spore pri temperaturama višim od 50-60 °C.

Za razliku od AMB i ASB sve prethodno navedene metode ekstrakcije djelovale su bakteriocidno i fungicidno na enterobakterije odnosno plijesni i kvasce. Ukuku i sur. (2004.) pokazali su da tretiranje bakterija roda *Salmonella* početne biomase 3 log CFU/ml, vrućom vodom temperature 70 °C i 97 °C u potpunosti ubija sve prisutne stanice, dok kod početne biomase 6 log CFU/ml isti učinak pokazuju tretman vrućom vodom temperature 70 °C u kombinaciji s dodatnim stresorom i tretman samo vrućom vodom temperature 97 °C. Plijesni i kvasci osjetljiviji su na povišene temperature od bakterija, pa tako već djelovanje temperature od 50-60 °C kroz 10-40 sek može u potpunosti inhibirati rast različitih plijesni (Karabulut i sur. 2002).

Prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10, 153/11) i Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2011.) za kategorije "Začini, začinske biljke i njihove mješavine", prah lista masline zadovoljava obavezne i preporučene kriterije, dok prema kategoriji "Ekstrakti začina i prehrambene arome i boje" samo ekstrakt lista masline dobiven UPE je unutar propisanih referentnih vrijednosti za AMB. Kod ekstrakata dobivenih KE i MUPE broj AMB prelazi dozvoljene referentne vrijednosti. Zbog relativno visoke početne biomase AMB u prahu lista masline, kratkotrajan utjecaj visoke temperature vjerojatno nije bio dovoljan da reducira

broj AMB kod KE, dok kod MUPE koncentriranje ekstrahiranih polifenola vjerojatno je dovelo i do koncentriranja preživjelih AMB.

Pokazano je da su samo MUPE metodom ekstrahirane dostatne koncentracije ukupnih polifenola za antimikrobno djelovanje. MUPE ekstrakt lista masline djeluje antimikrobno samo na potencijalne patogene *E. coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i *L. innocua* pri koncentracijama 200-600 µg/disk što su više koncentracije od koncentracija zabilježenih u literaturi (Sudjana i sur. 2009; Liu i sur. 2017.) gdje su za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišteni komercijalno dostupni ekstrakti točno poznatog sastava ili čisti oleuropein. Za razliku od MUPE ekstrakta, konvencionalni antibiotici djeluju antimikrobno pri znatno nižim koncentracijama što se može pripisati različitim mehanizmima djelovanja. Nadalje, poznato je da mehanizam djelovanja polifenola ovisi o njihovoj koncentraciji. Tako visoke koncentracije precipitiraju i denaturiraju stanične proteine, oštećuju staničnu stijenku i staničnu membranu, dok niže, subletalne koncentracije utječu na aktivnosti enzima uključenih u stanični metabolizam (Furneri i sur. 2002.).

## 6. Zaključci

- Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UPE) omogućava ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz listova masline
- Uvjeti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (vrijeme, masa praha lista masline, otapalo, amplituda rada ultrazvučne sonde) utječu na udio biološki aktivnih spojeva (polifenoli, flavonoidi i antioksidansi) u ekstraktu, pa je potrebno eksperimentalno odrediti optimalne uvjete za svaku ekstrakciju
- UPE nije rezultirala ekstraktom koji pokazuje antimikrobna svojstva
- Modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (MUPE) moguće je ekstrahirati iz lista masline koncentracije polifenola koje pokazuju antimikrobno djelovanje
- Ekstrakt lista masline dobiven MUPE ne djeluje antimikrobno na korisne izolate, već samo na potencijalne patogene bakterije
- Ekstrakt lista masline dobiven MUPE djeluje antimikrobno na izolat *Salmonella enterica* subsp. *enterica* u koncentracijama od 200 i 600 µg/disk, dok na *Escherichia coli* i *Listeria innocua* djeluje samo pri koncentraciji od 600 µg/disk
- Ekstrakt dobiven MUPE (600 µg/disk) pokazuje 26,1% učinkovitosti ciprofloksacina i 37,0% učinkovitosti ampicilin-sulbaktama za *S. enterica* subsp. *enterica*, 23,2% učinkovitosti ciprofloksacina i 33,0% učinkovitosti ampicilin-sulbaktama za *E. coli* i 28,3% učinkovitosti tetraciklina i 32,6% učinkovitosti eritromicina za *L. innocua*
- Ekstrakt dobiven MUPE (200 µg/disk) djeluje samo na izolat *S. enterica* subsp. *enterica* pokazujući pri tom 20,4% učinkovitosti ciprofloksacina i 29,0% učinkovitosti ampicilin-sulbaktama
- Aerobne mezofilne i sporogene bakterije, bakterije obitelji *Enterobacteriaceae* te plijesni i kvasci čine prirodnu mikrobiotu lista masline
- Sve metode ekstrakcije djelovale su bakteriocidno na enterobakterije, odnosno i fungicidno prema kvascima i plijesnima
- Brojnost aerobnih mezofilnih bakterija (AMB) se značajno smanjuje ovisno o metodi ekstrakcije, dok aerobne sporogene bakterije (ASB) pokazuju suprotan trend zbog sposobnosti sporulacije
- Patogene bakterija rodova *Listeria* i *Salmonella* nisu prisutne na listu masline, niti u ekstraktima lista masline



## 7. Popis literature

1. Abbeddou S., Rischkowsky B., Richter E., Hess H., Kreuzer M. (2011). Modification of milk fatty acid composition by feeding forages and agro-industrial byproducts from dry areas to Awassi sheep. *J Dairy Sci*; 94:4657–4668.
2. Acquaviva R., Di Giacomo C., Sorrenti V., Galvano F., Santangelo R., Cardile V., Gangia S., D’Orazio N., Abraham N.G., Vanella L. (2012). Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int. J. Oncol.* 41, 31–38.
3. Agbor G.A., Vinson J.A., Donnelly P.E. (2014). Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* 3(8): 147–156
4. Ahmad-Qasem M. H., Barraji n-Catalán E., Micol V., Mulet A. i García-Pérez J. V. (2013). Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*, 50(1), 189–196.
5. Ahmad-Qasem M. H., C novas J., Barraji n-Catalán E., Micol V., C rcel J. A. i García-Pérez J. V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 120–129.
6. Aliabadi M.A., Darsanaki R.K., Rokhi M.L., Nourbakhsh M. i Golnaz R. (2012). Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Scholars Research Library. Annals of Biological Research*, 3 (8):4189-4191.
7. Ando C., Takahashi N., Hirai S., Nishimura K., Lin S., Uemura T., Goto T., Yu R., Nakagami J., Murakami S. i sur. (2009). Luteolin, a food-derived flavonoid, suppresses adipocyte-dependent activation of macrophages by inhibiting JNK activation. *FEBS Lett.* 583, 3649–3654.
8. Andrikopoulo N.K., Kaliora A.C., Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P. (2002) Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro lowdensity lipoprotein oxidation. *J Med Food* 5:1–7.
9. Aryal S. (2019). *Microbe Notes, Online Microbiology and Biology Notes*. <https://microbenotes.com/plate-count-agar-pca/> - pristup 4.9.2020.
10. Aryal S., Baniya MK., Danekhu K., Kunwar P., Gurung R i Koirala N. (2019). Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants (Basel)* 8 (4): 96.

11. Barba F. J., Zhu Z., Koubaa M., Sant'Ana A. S. i Orlie V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96–109.
12. Ben Othman N., Roblain D., Thonart P. i Hamdi M. (2008). Tunisian table olive phenolic compounds and their antioxidant capacity. *J. Food Sci.* 73(4):235–240.
13. Benavente-García O., Castillo J., Lorente J., Ortuño A. i Del Rio J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem* 68(4): 457–462.
14. Benavente-García O., Castillo J., Lorente J., Ortuño A. i Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457–462.
15. Bhat R., Rai R. V. i Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57–81.
16. Bisignano G., Tomaino A., Cascio R. L., Crisafi G., Uccella N. i Saija, A. (1999). On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974.
17. Blainski A, Lopes GC, Pallazo de Mello JC (2013) Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852–6865.
18. Boskou D (1996) In: Boskou D (ed) History and characteristics of the olive tree. Olive oil: chemistry and technology. AOCS Press, Champaign, Illinois, pp 1–11.
19. Boskou G., Salta F. N., Chrysostomou S., Mylona A., Chiou A. i Andrikopoulos N. K. (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chem.* 94:558–564.
20. Boskou, D. (2009). Olive oil - Minor constituents and health in Culinary. *Applications of Olive Oil-Minor Constituents and Cooking*, pp. 1–7.
21. Boskou, D. (2009). Other important minor constituents. In *Olive Oil: Minor constituents and Health*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; pp. 45–54.
22. Boss A., Bishop K. S., Marlow G., Barnett M. P. G. i Ferguson, L. R. (2016). Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. *Nutrients*, 8(8).

23. Botsoglou E., Govaris A., Christaki E. i Botsoglou, N. (2010). Effect of dietary olive leaves and/or  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 121(1), 17–22.
24. Bouaziz M., Sayadi S. (2005). Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *Eur J Lipid Sci Technol* 107(7–8): 497–504.
25. Braun L. i Cohen M. (2015). *Herbs and Natural Supplements, Volume 2: An Evidence Based Guide*.
26. Breton C. M., Warnock . i Brville A. J. (2012). *Origin and History of the Olive, Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*, Innocenzo Muzzalupo, IntechOpen, DOI: 10.5772/51933. <https://www.intechopen.com/books/olive-germplasm-the-olive-cultivation-table-olive-and-olive-oil-industry-in-italy/origin-and-history-of-the-olive - pristup 15.9>.
27. Cao K., Xu J., Zou X., Li Y., Chen C., Zheng A., Feng Z. (2014). Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, 396–407.
28. Cecchi, L.; Migliorini, M.; Zanoni, B.; Breschi, C.; Mulinacci, N. (2018). An effective HPLC- based approach for the evaluation of the content of total phenolic compounds transferred from olives to virgin olive oil during the olive milling process. *J. Sci. Food Agric.* 98, 3636–3643.
29. Chaaban H., Ioannou I., Chebil L., Slimane M., Gérardin C., Paris C., Ghoul M. (2017). Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13203.
30. Chazau-Gillig S. (1994). The civilisation of olive trees and cereals. *Olivae* 53:14.
31. Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.S. i Abert-Vian M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
32. Chimi H., Cillard J., Cillard P., Rahmani M. (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 68:307–312.
33. CLSI. (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Twelfth Edition*. CLSI document M02-A12. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne ,Pennsylvania, SAD.

34. Corona, G., Tzounis X., Assunta Dessì M., Deiana M., Debnam E.S., Visioli F., Spencer J.P.E. (2006). The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic. Res.* 40, 647–658.
35. Covas M. I., Nyssonen K., Poulsen H. E., Kaikkonen J., Zunft H. J., Kiesewetter H., Gaddi A., de la Torre R., Mursu J., Baumler H., Nascetti S., Salonen J. T., Fito M., Virtanen J., Marrugat J. i EUROLIVE Study ´ Group. (2006a). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 145:333–341.
36. Covas M. I., Ruiz-Gutierrez V., De La Torre R., Kafatos A., Lamuela- ´ Raventos R. M., Osada J., Owen R. W. i Visioli F. (2006b). Minor ´ components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutr. Rev.* 64(Suppl. 1):20–30.
37. Da Rosa G. S., Vanga S. K., Garipey Y. i Raghavan V. (2019). Development of Biodegradable Films with Improved Antioxidant Properties Based on the Addition of Carrageenan Containing Olive Leaf Extract for Food Packaging Applications. *Journal of Polymers and the Environment*.
38. De Leonardis A., Aretini A., Alfano G., Macciola V. i Ranalli G. (2007). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, 226(4), 653–659.
39. Deák T. (2014). Food Technologies: Pasteurization. *Encyclopedia of Food Safety*. Volume 3, pages 219 – 224.
40. Delgado-Adámez J., Bote E., Parra-Testal V., Martín M. J. i Ramírez, R. (2016). Effect of the Olive Leaf Extracts In Vitro and in Active Packaging of Sliced Iberian Pork Loin. *Packaging Technology and Science*, 29(12), 649–660.
41. Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P., Tognolini M., Borges G., Crozier A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1818–1892.
42. Dent M., Dragović-Uzelac V., Penić M., Brnčić M., Bosiljkov T. i Levaj B. (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technol. Biotechnol.* 51 (1) 84–91.
43. Di Giovacchino, L., Sestili, S. i Di Vincenzo, D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 587–601.

44. Dias A. A., Bezerra R. M. i Pereira A. N. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, 92(1), 7–13.
45. Dimitrios B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 17: 505–12.
46. Dobrinčić A., Repajić M., Garofulić I. E., Tuđen L., Dragović-Uzelac V. i Levaj, B. (2020). Comparison of Different Extraction Methods for the Recovery of Olive Leaves Polyphenols. *Processes*, 8(9), 1008.
47. Duda-Chodak A., Tarko T. i Statek M. (2008). The effect of antioxidants on *Lactobacillus casei* cultures. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7(4), 39–51.
48. El S.N., Karakaya S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Rev* 67(11): 632-638.
49. Elamin M.H., Daghestani M.H., Omer S.A., Elobeid M.A., Virk P., Al-Olayan E.M., Hassan Z.K., Mohammed O.B., Aboussekhra A. (2013). Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food Chem. Toxicol.* 53, 310–316.
50. Fiorino P., Nizzi Griffi F. (1992). The spread of olive farming. *Olivae* 44:9.
51. Fito M., Guxens M., Corella D., Saez G., Estruch R., De La Torre R., Francés F., Cabezas C., Lopez-Sabater M. C., Marrugat J., García-Arellano A., Aros F., Ruiz-Gutierrez V., Ros E., Salas-Salvado J., Fiol M., Sola R. i Covas M. I. (2007). Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: A randomized controlled trial. *Arch. Intern. Med.* 67:1195–1203.
52. Fortes, C. (2005). Mediterranean diet health benefits may be due to a synergistic combination of phytochemicals and fatty-acids. *BMJ.* 331:E366.
53. Franco D., Rodríguez- Amado I., Agregán R., Munekata P.E.S., Vázquez J.A., Barba F.J. i Lorenzo J.M. (2018). Optimization of antioxidants extraction from peanut skin to prevent oxidative processes during soybean oil storage. *LWT-Food Science and Technology*, 88, 1-8.
54. Frankel E., Bakhouché A., Lozano-Sánchez J., Segura-Carretero A., i Fernández-Gutiérrez A. (2013). Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5179–5188.

55. Furneri P. M., Marino A., Saija A., Uccella N. i Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International journal of antimicrobial agents*, 20(4), 293-296.
56. Gao S. P., Hemar Y., Ashokkumar M., Paturel S. i Lewis, G. D. (2014). Inactivation of bacteria and yeast using high-frequency ultrasound treatment. *Water Res.* 60, 93–104.
57. Giacometti J., Žauhar G. i Žuvić M. (2018). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Major Phenolic Compounds from Olive Leaves (*Olea europaea* L.) Using Response Surface Methodology. *Foods*, 7(9), 149.
58. Goldsmith C., Vuong Q., Stathopoulos C., Roach P. i Scarlett C. (2014). Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves. *Antioxidants*, 3(4), 700–712.
59. Gordon M.H., Paiva-Martins F., Almeida M. (2001) Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 49:2480–2485.
60. Goren – Inbar N., Alperson N., Kislev M. E., Simchoni O., Melamed Y., Ben – Nun A., Werker E. (2004). Evidence of hominin control of fire at Gesher Benot Ya'aqov, Israel. *Science* 304, 725.
61. Gorzynik-Debicka M., Przychodzen P., Cappello F., Kuban-Jankowska A., Marino Gammazza A., Knap N., Gorska-Ponikowska M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 686.
62. Gutierrez-Rosales, F.; Romero, M. P.; Casanovas, M.; Motilva, M. J.; Minguez-Mosquera, M. I. (2010). Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea Europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12924–12933.
63. Gutierrez-Rosales, F.; Romero, M. P.; Casanovas, M.; Motilva, M. J.; Minguez-Mosquera, M. I. (2012).  $\beta$ -Glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropein during the growth and development of olive fruits (*Olea Europaea* L. cv. Arbequina) grown under different farming practices. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4348–4358.
64. Hannachi H., Benmoussa H., Saadaoui E., Saanoun I., Negri N. i Elfalleh W. (2019). Optimization of ultrasound and microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves by response surface methodology. *Research Journal of Biotechnology*. Vol 14 (7).

65. Hao J., Shen W., Yu G., Jia H., Li X., Feng Z., Wang Y., Weber P., Wertz K., Sharman E. (2010). Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 21, 634–644.
66. Haralampidis, K., Milioni, D., Sanchez, J., Baltrusch, M., Heinz, E. and Hatzopoulos, P. (1998). Temporal and transient expression of stearyl-ACP carrier protein desaturase gene during olive fruit development. *J. Exp. Bot.* 49:1661–1669.
67. Hardoim P. R., van Overbeek L. S. i Elsas J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471.
68. Hayes J. E., Allen P., Brunton N., O’Grady M. N. i Kerry J. P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126(3), 948–955.
69. Heimler D., Pieroni M., Tattini A., Cimato A. (1992). Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and bi flavonoids in *Olea europaea* L. Leaves *Chromatograp* 33:369–373.
70. Herrero M., Temirzoda T.N., Segura-Carretero A., Quirantes R., Plaza M., Ibañez E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *J. Chromatogr. A* 1218, 7511–7520.
71. IOC (2020). International Olive Council. <https://www.internationaloliveoil.org/olive-oil-provisional-data-2018-19-crop-year/> - pristup 17.9.2020.
72. Irakli M., Chatzopoulou P. i Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 124, 382–388.
73. ISO 11290-2. (2017). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 2: Enumeration method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
74. ISO 21527-2. (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

75. ISO 21528-2. (2017). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony-count technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
76. ISO 4833-2. (2013). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
77. ISO 6597-1. (2017). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
78. Japon-Lujan R, Luque-Rodriguez J.M. i Luque de Castro M.D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related polyphenols from olive leaves. *J Chromatogr A*. 1108: 76–82.
79. Japón-Luján R., Luque de Castro M.D. (2007). Static–Dynamic Superheated Liquid Extraction of Hydroxytyrosol and Other Biophenols from Alperujo (a Semisolid Residue of the Olive Oil Industry). *J Agric Food Chem* 55(9): 3629–3634.
80. Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., i Crowther, J. C. (2007). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(1), 1–26.
81. Karabulut O. A. i sur. (2002). Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. *Postharvest Biology and Technology* 24.2 103-111.
82. Katušin-Ražem B., Novak B. i Ražem, D. (2001). Microbiological decontamination of botanical raw materials and corresponding pharmaceutical products by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 62(2-3), 261–275.
83. Khaliq A., Sabir S.M., Ahmad S.D., Boligon A.A., Athayde M.L., Jabbar A., Qamar I., Khan A. (2015). Antioxidant activities and phenolic composition of Olive (*Olea europaea*) leaves. *J Appl Bot Food Qual* 88:16–21.
84. Khemakhem I., Ahmad-Qasem M. H., Catalán E. B., Micol V., García-Pérez J. V., Ayadi M. A. i Bouaziz, M. (2017). Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34(Supplement C), 466–473.
85. Laguerre M., López Giraldo L.J., Piombo G., Figueroa-Espinoza M.C., Pina M., Benaissa M., Villeneuve P. (2009). Characterization of olive-leaf phenolics by ESI-MS and



- evaluation of their antioxidant capacities by the CAT assay. *J Am Oil Chem Soc* 86:1215–1225.
86. Lalas S., Athanasiadis V., Gortzi O., Bounitsi M., Giovanoudis I., Tsaknis J. i Bogiatzis F. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*, 127(4), 1521–1525.
  87. Landete J.M., Curiel J.A., Rodríguez H., de las Rivas B., Muñoz R. (2008). Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chem.* 107, 320–326.
  88. Lee O.H. i Lee B.Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour. Technol.* 101, 3751–3754.
  89. Lee O.H., Lee B.Y., Lee J., Lee H.B., Son J.Y., Park C.S., Shetty K., Kim Y.C. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour Technol* 100(23): 6107–6113.
  90. Liu Y., McKeever L.C. i Nasir S.A. Malik. (2017). Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens. *Front. Microbiol.* 8:113.
  91. Lorenzo J.M., Munekata P.E.S., Gómez B., Barba F.J., Mora L., Pérez-Santaescolastica C. i Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidant in food products – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 136-147.
  92. Makris D., Boskou G., Andrikopoulos N.K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Food Comp Anal* 20:125–132.
  93. Martín-García A.I. i Molina-Alcaide E. (2008). Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Anim Feed Sci Technol.* 142: 317-29.
  94. Özcan, M. M. i Matthäus, B. (2016). A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243(1), 89–99.
  95. Mohammadi A., Jafari S. M., Esfanjani A. F. i Akhavan, S. (2016). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chemistry*, 190, 513–519.
  96. Mokrani A. i Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68–76.

97. Morello J. R., Vuorela S., Romero M. P., Motilva M. J. i Heinonen M. (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 53:2002–2008.
98. Mrkonjić Fuka M., Tanuwidjaja I., Zgomba Maksimovic A, Zunabovic-Pichler M., Kublik S., Hulak N., Domig K. J, Schloter M. (2020). Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures. *LWT-Food Science and Technology* 118:108782.
99. Mrkonjić Fuka M., Wallisch S., Engel M., Welzl G., Havranek J., Schloter M. (2013). Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses. *PLoS One* 8(11): e80734.
100. Naczki, M. i Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523–1542.
101. Neu H.C. (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257:1064–1073.
102. Orak H. H., Isbilir S. S. i Yagar H. (2012). Determination of antioxidant properties of lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1065–1074.
103. Owen R. W., Giacosa A., Hull W. E., Haubner R., Spiegelhalder B. i Bartsch H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds from olive oil. *Eur. J. Cancer.* 36:1235–1247.
104. Paiva-Martins F., Correia R., Félix S., Ferreira P. i Gordon M. H. (2007). Effects of Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds from Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4139–4143.
105. Pereira A.P., Ferreira I.C.F.R., Marcelino F., Valentao P., Andrade P.B., Seabra R., Estevinho L., Bento A. i Pereira J.A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europea* L. Cv. cobrancosa) leaves. *Molecules* 12 (5):1153–1162.
106. Podsędek A., Sosnowska D. Redzyna M., i Koziołkiewicz M. (2008). Effect of domestic cooking on the red cabbage hydrophilic antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(10), 1770–1777.
107. Postollec F., Mathot AG., Bernard M., Divanac'h ML., Pavan S., Sohier D. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology* 158; 1-8.

108. Pratheeshkumar P., Son, Y.-O.; Budhraj, A.; Wang, X.; Ding, S.; Wang, L.; Hitron, A.; Lee, J.-C.; Kim, D.; Divya, S.P. i sur. (2012). Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. *PLoS ONE*, 7, e52279.
109. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10, 153/11). **MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA.**
110. Putnik P., Lorenzo J. M., Barba F. J., Roohinejad S., Režek A. J., Granato D., i Bursać, D. K. (2018). Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. *Foods*, 7, 106.
111. Rahmanian N., Jafari S. M. i Galanakis, C. M. (2014). Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(1), 1–18.
112. Rahmanian N., Jafari S. M. i Wani T. A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science and Technology*, 42(2), 150 – 172.
113. Rao P. R., Nammi S. i Raju, D. V. (2002). Studies on the antimicrobial activity of, 1, 195 – 198.
114. Rombaut N., Tixier A-S., Bily A., i Chemat F. (2014). Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(4), 530–544.
115. Roselló-Soto E., Koubaa M., Moubarik A., Lopes R. P., Saraiva J. A., Boussetta N., Barba F. J. (2015). Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 296–310.
116. Rostagno M. A., Palma M. i Barroso C. G. (2007). Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, 597, 265–272.
117. Roy M. K., Takenaka M., Isobe S. i Tsushida T. (2007). Antioxidant potential, anti-proliferative activities, and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry*, 103(1), 106–114.

118. Ruiz-Barba J. L., Rios-Sanchez R. M., Fedriani-Iriso C., Olias J. M., Rios J. L. i Jimenez Diaz R. (1990). Bactericidal effect of phenolic compounds from green olives on *Lactobacillus plantarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(2), 199–205.
119. Sagar B. Kedare i R. P. Singh (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci. Technol.* 48 (4): 412-422.
120. Şahin S. i Bilgin M. (2017). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1271–1279.
121. Şahin, S. i Şamli, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595–602.
122. Sakanaka S., Juneja L. R. i Taniguchi M. (2000). Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1), 81–85.
123. Salta F., Mylona A., Chiou A., Boskou G., & Andrikopoulos N. (2007). Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*, 13, 413–421.
124. Salvini S., Sera F., Caruso D., Giovannelli L., Visioli F. i Saieva C. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br. J. Nutr.* 95:742–751.
125. Sanchez-Rodriguez E., Biel-Glesson S., Fernandez-Navarro J., Calleja M., Espejo-Calvo J., Gil-Extremera B., Mesa M. (2019). Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients*, 11(3), 561.
126. Santos M.M., Piccirillo C., Castro P. M. L., Kalogerakis N., i Pintado, M. E. (2012). Bioconversion of oleuropein to hydroxytyrosol by lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 2435–2440.
127. Scoditti E., Capurso C., Capurso A., i Massaro M. (2014). Vascular effects of the Mediterranean diet—Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascular Pharmacology*, 63(3), 127–134.
128. Seo H.S., Choi H.S., Kim S.R., Choi Y.K., Woo S.M., Shin I., Woo J.K., Park S.Y., Shin Y.C., Ko S.G. i sur. (2012). Apigenin induces apoptosis via extrinsic pathway, inducing p53 and inhibiting STAT3 and NFκB signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* 366, 319–334.

129. Shekhar T.C. i Anju G. (2014). Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. American Journal of Ethnomedicine, 2014, Vol. 1, No. 4, 244-249.
130. Shukla S. i Gupta S. (2010). Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. Pharm. Res. 27, 962–978.
131. Singh M.P. (2009). Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profiling of closely related fungi. Journal of Microbiological Methods, 77, 102–108.
132. Sofo A., Ciarfaglia A., Scopa A., Camele I., Curci M., Crecchio C., Palese A. M. (2013). Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. Soil Use and Management, 30(1), 160–167.
133. Soler-Rivas, C.; Espin, J. C.; Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. J. Sci. Food Agric. 80, 1013–1023.
134. Sudjana A.N., D’Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley T.V., Hammer K.A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. Int J Antimic Agents 33(5):461-463.
135. Suslick K.S. i Price G.J., (1999). Applications of ultrasound to materials chemistry. Annu. Rev. Mater. Sci. 29, 295–326.
136. Tan H.W., Tuck K.L., Stupans I., Hayball P.J. (2003). Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatography 785:187–191.
137. Teh S.S., i Birch E. J. (2014). Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. Ultrasonics Sonochemistry, 21(1), 346–353.
138. Therios I. (2009). Olives. School of Agriculture, Aristotle University, Thessaloniki, Greece.
139. Thielmann J., Kohnen S. i Hauser C. (2017). Antimicrobial activity of *Olea europaea* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. International Journal of Food Microbiology, 251, 48 – 66.
140. Ukuku D. O., Pilizota V., Sapers G. M. (2004). Effect of hot water and hydrogen peroxide treatments on survival of *Salmonella* and microbial quality of whole and fresh-cut cantaloupe. Journal of food protection 67.3, 432-437.

141. Uylaşer, V., i Yildiz, G. (2014). The Historical Development and Nutritional Importance of Olive and Olive Oil Constituted an Important Part of the Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8), 1092–1101.
142. Valavanis P., “Olive Oil and the Ancient Greeks.” In, *Ode to the Olive Tree*, (Greek – English), Hellenic Folklore Research Centre of the Academy of Athens (ed.), General Secretariat for Olympic Games, Hellenic Ministry of Culture, Athens, 62-73, (2004).
143. Vauzour D., Rodriguez-Mateos A., Corona G., Oruna-Concha M. J. i Spencer, J. P.E. (2010). Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11) 1106 – 1131.
144. Vilku K., Mawson R., Simons L. i Bates D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in food industry—A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161–169.
145. Visioli F., Poli A., Galli C. (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 22:65–75.
146. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2011.)- <http://www.veterinarstvo.hr/> - pristup 11.10.2020.
147. Vogel P., Machado I.K., Garavaglia J., Valdeni Z.T., de Souza D. i Dal Bosco S.M. (2015). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutr Hosp.* 31(3):1427-1433.
148. Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signaling molecules. *Free Radical Biol. Med.*, 36, 838-849.
149. Yateem H., Afaneh I., Al-Rimawi F. (2014). Optimum Conditions for Oleuropein Extraction from Olive Leaves. *International Journal of Applied Science and Technology* Vol. 4, Br. 5.
150. Yoon, S. K. (2018). Oleuropein as an Antioxidant and Liver Protect. *The Liver*, 323–335.
151. Zakaria S.M. i Mustapa K.S.M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Eng Rev* 8(1): 23–34.
152. Zhong Y. i Shahidi F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Woodhead Publishing Series of Food in Science, Technology and Nutrition*, pages 287 – 333.

153. Žugčić T., Abdelkebir R., Alcantara C., Collado M. C., García-Pérez J. V., Meléndez-Martínez A. J., Barba F. J. (2018). From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*.

## Životopis

Luka Han rođen je 12.09.1995. u Zagrebu. Osnovnu školu pohađao je u Zagrebu. Srednjoškolsko obrazovanje stječe u Zagrebu u X. gimnaziji Ivan Supek, opći smjer.

Godine 2014. upisuje preddiplomski studij Agroekologija na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Preddiplomski studij završava 2017. i upisuje diplomski studij Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi.

Posjeduje certifikat znanja engleskog jezika B2 razine.

Dobio je rektorovu nagradu za timski znanstveni i umjetnički rad u akademskoj godini 2018./2019.