

VPLIV HIDROLITIČNIH ENCIMOV NA ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST OLJČNIH LISTOV



Agrokultura

Raziskovalna naloga

Julija Skrt, 4. A; Jaša Krevh, 4. A

Mentor: asist. dr. Mihaela Skrt – Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorja: doc. dr. Ilja Gasan Osojnik Črnivec –Biotehniška fakulteta, Univerza
v Ljubljani; Alenka Mozer – Gimnazija Vič

Gimnazija Vič

Ljubljana, 2022–2023

Povzetek

Oljčni listi so naravni in nizkocenovni vir fenolnih spojin, med katerimi prevladuje oleuropein. Te spojine so zaradi svoje potencialne antioksidativne učinkovitosti koristne za človeško telo. Njihova vsebnost v ekstraktih oljčnih listov je odvisna od različnih dejavnikov, kot so izbrano topilo, temperatura in metoda ekstrakcije.(1)

Naš cilj je bil raziskati hitro, ugodno in okolju prijazno metodo ekstrakcije fenolnih spojin v oljčnih listih z dodatkom mešanice hidrolitičnih encimov, s katero bi pridobili znatno količino fenolnih spojin iz oljčnih listov.

V skladu z načeli zelene kemije smo uporabili različne metode ekstrakcije, kot sta stresanje in magnetno mešanje (pri pH 2, 4, 6 in 8) za krajši in daljši čas, za topilo pa smo uporabili ultra čisto vodo. Učinek teh ekstrakcijskih metod smo določili z analizo skupne vsebnosti fenolnih spojin, določeno z metodo Folin-Ciocalteu, in analizo antioksidativne učinkovitosti, določene z 2,2-difenil-1-picrilihidrazilom (DPPH). Te rezultate smo primerjali z rezultati kontinuirne in vitro simulacije prebavnega sistema. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo določili vsebnost oleuropeina in hidroksitirozola v vodnih ekstraktih oljčnih listov istrske belice iz leta 2020.

Naši rezultati so pokazali, da je mešanica hidrolitičnih encimov, uporabljeni v raziskavi, povečala učinkovitost ekstrakcije, znižala skupno vsebnost fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost ne glede na sorto, letni čas obiranja in starost listov. Encimi so znižali vsebnost oleuropeina in povečali vsebnost hidroksitirozola.

Abstract

Olive leaves are a natural and low-price source of phenolic compounds, with a predominant oleuropein content. Such compounds are potentially beneficial for human health due to their antioxidant activity. The content of phenolic compounds in extracts of olive leaves depends on various factors, such as the used solvent, temperature, method of extraction and the solvent to dry mass ratio (Cifá D. et al, 2018).

Our aim was to research a fast, low-cost and environmentally friendly extraction technique for phenolic compounds in olive leaves with addition of a mixture of hydrolytic enzymes to obtain a substantial amount of phenolic compounds from olive leaves.

We used different extraction methods, such as shaking and magnetic stirring (at pH 2, 4, 6 and 8) for a shorter and longer time, with ultrapure water as a solvent, following the principles of green chemistry. The effect of these extraction techniques was evaluated with the total phenolic content, determined with the Folin-Ciocalteu method, and antioxidant activity, analyzed with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). These results were compared with the results from the continuous in vitro simulation of the digestive system. We analyzed the content of oleuropein and hydroxytyrosol in water extracts of Itrska belica from 2020 using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Our results showed that the mixture of hydrolytic enzymes used in this study increased extraction efficiency, lowered the total phenolic content and antioxidant capacity regardless

of the sort, time of collection and leaf age. Hydrolytic enzymes lowered the content of oleuropein and increased the content of hydroxytyrosol.

Kazalo

1. Uvod	9
2. Teoretično ozadje	10
2.1. Oljka (<i>Olea europaea</i> L.).....	10
2.1.1. Istarska belica	10
2.1.2. Cipressino.....	11
2.1.3. Listi kot stranski proizvod v oljkarstvu.....	11
2.2. Biokemijska sestava oljčnih listov	11
2.2.1. Antioksidanti	11
2.2.2. Fenolne spojine.....	11
2.2.3. Ekstrakcija oljčnih listov (čas in pH)	13
2.2.4. Metabolizem polifenolov.....	14
2.2.5. Človeški prebavni sistem.....	15
3. Metode	15
3.1. Materiali	15
3.2. Instrumenti.....	17
3.2.1. Mettler Toledo HE53 analizator vlage	17
3.2.2. UV-Vis Spektrofotometer (Hewlett Packard 8453, Agilent 89090A).....	18
3.2.3. HPLC (Agilent 1260 Infinity, Združene države Amerike).....	19
3.2.4. pH-meter (Mettler Toledo Seven Easy S20)	20
3.2.5. Ostalo:	21
3.3. Metode	21
3.3.1. Mletje	21
3.3.2. Ekstrakcija 1 - mešanje.....	21
3.3.3. Ekstrakcija 2 - stresanje	22
3.3.4. Ekstrakcija 3 – kontinuirna simulacija prebavnega sistema	23
3.3.5. Določanje vsebnosti fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom	25
3.3.6. HPLC analiza	26
3.3.7. Določanje antioksidativne učinkovitosti z DPPH-reagentom	28
4. Rezultati in interpretacija	30
4.1. Učinkovitost ekstrakcije	31
4.2. Skupna vsebnost fenolnih spojin	32

4.3.	Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo DPPH	34
4.4.	HPLC-analiza vsebnosti hidroksitirozola in olevropeina	35
5.	Ekonomski načrt (potencialna uporaba/aplikacija)	37
5.1.	Analiza trga:.....	37
5.2.	Proces priprave.....	37
5.2.1.	Transport.....	37
5.2.2.	Mletje	37
5.2.3.	Pakiranje	37
5.3.	Poslovni načrt in ekonomija	37
6.	Sklepi	38
Viri	39	

Kazalo slik:

Slika 1: Stereokemijska zgradba olevropeina (16)	13
Slika 2: Analizator vlage (37)	17
Slika 3: Spektrofotometer (39).....	18
Slika 4: HPLC (Agilent 1260 Infinity, Združene države Amerike)	19
Slika 5: pH-meter (43)	20
Slika 6: Grafični prikaz kontinuirne simulacije prebavnega sistema (46)	24
Slika 7: Umeritvena krivulja za galno kislino/FC-reagent	25
Slika 8: Umeritvena krivulja raztopin hidroksitirozola, analiziranih na Jupiter Proteo 90 Å koloni. Y v enačbi predstavlja površino kromatografskega vrha hidroksitirozola, X pa koncentracijo standardne raztopine hidroksitirozola.	28
Slika 9: Umeritvena krivulja raztopin olevropeina, analiziranih na Jupiter Proteo 90 Å koloni. Y v enačbi predstavlja površino kromatografskega vrha olevropeina, X pa koncentracijo standardne raztopine olevropeina.	28
Slika 10: Umeritvena krivulja Troloxa/DPPH.....	29
Slika 11: Učinkovitost ekstrakcije vodotopnih spojin. Graf prikazuje učinkovitost ekstrakcije, izraženo kot maso suhega ekstrakta (g) na maso suhih listov (g). Podatki so povprečja ± SD (n = 3).	31
Slika 12: SVF v suhih listih (metodi mešanja in stresanja). Izražena kot ekvivalent mase (mg) galne kisline na maso (g) suhih listov. Podatki so povprečja ± SD (n = 3).	32
Slika 13: SVF v suhih listih (neprekinjena simulacija prebavnega sistema). Izražena kot ekvivalent mase (mg) galne kisline na maso (g) suhih listov. Podatki so povprečja ± SD (n = 3).	33
Slika 14: Antioksidativna aktivnost oljčnih listov, izražena kot ekvivalent mase (mg) Troloksa na maso (g) suhih listov. Podatki so povprečja ± SD (n = 3).	34

Slika 15: Primer kromatogramov separacije spojin iz vodnega ekstrakta oljčnih listov Istarske belice, pripravljenega z 90 min mešanjem na magnetnem mešalu v ultračisti vodi pri pH 4,0. Modra krivulja predstavlja kromatogram separacije spojin iz vodnega ekstrakta.....	35
Slika 16: Vsebnost olevropeina (OLE) in hidroksitirozola (HYT) v ekstraktih oljčnih listov Istarske belice, pripravljenih z 90 min mešanjem pri 37 °C na magnetnem mešalu v ultračisti vodi pri pH 2 (MIB2), pH 4 (MIB4), pH 6 (MIB6) in pH 8 (MIB8) brez in z dodatkom	36

Kazalo tabel:

Tabela 1: Klasifikacija sorte <i>Olea Europaea</i> (4).....	10
Tabela 2: Ekstrakti, pripravljeni z mešanjem na magnetnem mešalniku	22
Tabela 3: Ekstrakti, pripravljeni s stresanjem	22
Tabela 4: Vzorci, ki so šli skozi simulirano prebavo	24
Tabela 5: Gradient mobilne faze.....	27
Tabela 6: Seznam okrajšav.....	30

Seznam okrajšav

Itrska belica 2020 (MIB)	Cipressino (MCI)	Itrska belica (MSB)	Samo encimi (ME)
Itrska belica 2020 brez encimov pri pH2 (MIBK2)	Cipressino brez encimov pri pH2 (MCIK2)	Itrska belica 2015 brez encimov pri pH2 (MSBK2)	
Itrska belica 2020 z encimi pri pH2 (MIBE2)	Cipressino z encimi pri pH2 (MCIE2)	Itrska belica 2015 z encimi pri pH2 (MSBE2)	Encimi pri pH2 (ME2)
Itrska belica 2020 brez encimov pri pH4 (MIBK4)	Cipressino brez encimov pri pH4 (MCIK4)	Itrska belica 2015 brez encimov pri pH4 (MSBK4)	
Itrska belica 2020 z encimi pri pH4 (MIBE4)	Cipressino z encimi pri pH4 (MCIE4)	Itrska belica 2015 z encimi pri pH4 (MSBE4)	Encimi pri pH4 (ME4)
Itrska belica 2020 brez encimov pri pH6 (MIBK6)	Cipressino brez encimov pri pH6 (MCIK6)	Itrska belica 2015 brez encimov pri pH6 (MSBK6)	
Itrska belica 2020 z encimi pri pH6 (MIBE6)	Cipressino z encimi pri pH6 (MCIE6)	Itrska belica 2015 z encimi pri pH6 (MSBE6)	Encimi pri pH6 (ME6)
Itrska belica 2020 brez encimov pri pH8 (MIBK8)	Cipressino brez encimov pri pH8 (MCIK8)	Itrska belica 2015 brez encimov pri pH8 (MSBK8)	
Itrska belica 2020 z encimi pri pH8 (MIBE8)	Cipressino z encimi pri pH8 (MCIE8)	Itrska belica 2015 z encimi pri pH8 (MSBE8)	Encimi pri pH8 (ME8)

Itrska belica 2020 (IB)	Cipressino (CI)	Itrska belica (SB)	Samo encimi (E)
Itrska belica 2020 brez encimov po prebavi ust (IBK po ustih)	Cipressino brez encimov po prebavi ust (CIK po ustih)	Itrska belica 2015 brez encimov po prebavi ust (IBK po ustih)	
Itrska belica 2020 z encimi po prebavi ust (IBE po ustih)	Cipressino z encimi po prebavi ust (CIE po ustih)	Itrska belica 2015 z encimi po prebavi ust (IBE po ustih)	Encimi po prebavi ust (E po ustih)
Itrska belica 2020 brez encimov po prebavi želodca (IBK po želodcu)	Cipressino brez encimov po prebavi želodca (CIK po želodcu)	Itrska belica 2015 brez encimov po prebavi želodca (IBK po želodcu)	
Itrska belica 2020 z encimi po prebavi želodca (IBE po želodcu)	Cipressino z encimi po prebavi želodca (CIE po želodcu)	Itrska belica 2015 z encimi po prebavi želodca (IBE po želodcu)	Encimi po prebavi želodca (E po želodcu)
Itrska belica 2020 brez encimov po končani prebavi (DIBK)	Cipressino brez encimov po končani prebavi (DCIK)	Itrska belica 2015 brez encimov po končani prebavi (DIBK)	
Itrska belica 2020 z encimi po končani prebavi (DIBE)	Cipressino z encimi po končani prebavi (DCIE)	Itrska belica 2015 z encimi po končani prebavi (DIBE)	Encimi po končani prebavi (DE)

Itrska belica 2020 (SIB)	Cipressino (SCI)	Samo encimi (SE)
Itrska belica 2020 brez encimov (SIBK)	Cipressino brez encimov (SCIK)	Samo encimi (SE)
Itrska belica 2020 z encimi (SIBE)	Cipressino z encimi (SCIE)	

Okrajšava	Opis vzorca	Vzorci, ki spadajo pod okrajšavo
A	Vodni ekstrakti oljčnih listov (mešanje ali stresanje)	MIBK2/4/6/8, MCIK2/4/6/8, MSBK2/4/6/8, SIBK, SCIK, SSBK
HE	Vodni ekstrakti oljčnih listov (mešanje ali stresanje) z dodanimi encimi	MIBE2/4/6/8, MCIE2/4/6/8, MSBE2/4/6/8, SIBE2/4/6/8, SCIE2/4/6/8, SSBE2/4/6/8
SDA	Ekstrakti oljčnih listov v simulirani prebavi (brez encimov)	IBK po ustih, CIK po ustih, SBK po ustih, IBK po želodcu, CIK po želodcu, SBK po želodcu, DIBK, DCIK, DSBK
SDHE	Ekstrakti oljčnih listov v simulirani prebavi (z dodanimi encimi)	IBE po ustih, CIE po ustih, SBE po ustih, IBE po želodcu, CIE po želodcu, SBE po želodcu, DIBE, DCIE, DSBE

Okrajšava	Pomen
HPLC	Visoko zmogljiva tekočinska kromatografija (high performance liquid chromatography)
FC	Folin-Ciocalteu
SVF	Skupna vsebnost fenolnih spojin
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom
OLE	Olevropein
HYT	hidroksitirozol
FCC	Food Chemical Codex
HUT	Hemoglobin Unit Tyrosine
PU	Papain Units
ALU	Acid Lactase Units
CU	Cellulase Units
GalU	Galactosidase Units
HCU	Hemicellulase Units
Endo-PGU	Endo-Polygalacturonase Units
SAPU	Spectrophotometric Acid Protease Units
XU	Xylanase Units

1. Uvod

V sodobnem svetu čas teče hitro in nimamo vedno časa poskrbeti za pravilno prehrano, zato se veliko ljudi zateka k prehranskim dopolnilom. Ena izmed teh so prehranska dopolnila iz oljčnih listov. Ti so bogati s polifenoli, za katere je dokazano, da imajo s protivnetnim, protimikrobnim in kardioprotективним delovanjem pomembne vloge pri preprečevanju in odpravljanju bolezni.

Ker je Slovenija ena od držav pridelovalk oljk, so oljčni nasadi na Primorskem ob Jadranskem morju pogost pojav. Kmetje gojijo različne sorte, med njimi tudi sorto Cipressino in udomačeno sorto Itrska belica, ki smo ju uporabili v naši raziskavi. Pridelava oljčnega olja je zelo razširjena - vsako leto slovenski lastniki oljčnih nasadov pridelajo približno 700 ton oljčnega olja in 6,5 tone drugih oljčnih izdelkov, pri čemer se natančne količine iz leta v leto spreminjajo. Iz teh količin lahko izračunamo, da pri letnem vzdrževanju oljčnih nasadov nastane 416 ton bioloških odpadkov iz oljčnih listov, ki se večinoma ne uporabijo v noben namen in se običajno zavržejo. To je škoda, če upoštevamo, da je vsebnost fenolnih spojin v oljčnih listih veliko večja kot v drugih delih oljke.(2)

V naši raziskavi smo se osredotočili na ekstrakcijo polifenolov iz oljčnih listov z dodajanjem hidrolitičnih encimov, pri čemer smo kot topilo uporabili vodo (z neuravnanim pH ter s pH 2, 4, 6, 8). Nekontinuirno encimsko ekstrakcijo oljčnih listov smo primerjali s kontinuirno ekstrakcijo. S slednjim smo želeli simulirati človeški prebavni sistem s podobnimi pogoji (čas, pH in temperatura ekstrakcije so bili prilagojeni prebavnemu sistemu). Da bi simulirali prebavne procese, smo listom dodali tudi hidrolitične encime. Vendar ti encimi niso bili enaki tistim v naši prebavi (dodani encimi na primer vsebujejo tudi hemicelulaze in celulaze, ki jih človek ne proizvaja sam). Uporabili smo namreč komercialno dostopno mešanico encimov, pri čemer smo sledili ideji nizkocenovne ekstrakcije.

2. Teoretično ozadje

2.1. Oljka (*Olea europaea* L.)

Oljka je visoka od 3 do 12 metrov ali več in ima gosto krošnjo. Njeni listi so usnjati in kopjaste oblike. Zgoraj so temno zeleni, na spodnji strani pa srebrnkasti in so na vejicah nameščeni v paru drug proti drugemu.(3)

Tabela 1: Klasifikacija sorte *Olea Europaea* (4)

Kraljestvo:	<i>Zelene rastline</i>
Podkraljestvo:	<i>Tracheobionata – žile rastline</i>
Deblo:	<i>Spermatophyta - semenske rastline</i>
Poddeblo:	<i>Magnoliophyta - cvetoče rastline</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida – dvokaličnice</i>
Podrazred:	<i>Asteridae</i>
Red:	<i>Scrophulariales ali Lamiales</i>
Družina:	<i>Oleaceae - jesen, privet, bezeg in oljke</i>
Rod:	<i>Olea</i>
Vrsta:	<i>Olea europaea</i>

2.1.1. Itrska belica

Belica je najbolj zastopana sorta v slovenskem oljčnem nasadu. Je srednje bujno drevo pokončne, košate in zaprte rasti. Cveti v socvetjih (sestavljenih iz 11-18 posameznih cvetov), njeni plodovi pa so srednje veliki (teža 2-4 g na olivo). Ta sorta dozori pozno. Ni preveč občutljiva na nizke temperature in škodljivce ter je kot mlada rastlina na lastnih koreninah odporna na sušo.(5)

Njeni listi so ploščati, eliptično kopjasti, dolgi 5-7 centimetrov in široki 1,25-1,50 centimetra. Pogosto se zvijajo okoli svoje osi, okoli robov pa ne.(5)

Po ljudskem izročilu je Itrska belica avtohton in izvira z območja Doline in Boljunka pri Trstu. Prvi zapisi Carla Huguesa o zastopanosti sort oljk v Istri s konca 19. stoletja pa ne vključujejo te sorte, kar bi lahko pomenilo, da je bila na naše območje prinesena pozneje. Ker nimamo zagotovila, da ima avtohton genetski material in ker ni bila namerno vzgojena, je ne moremo uvrstiti med avtohtone sorte. Zato jo uvrščamo med udomačene sorte, kamor spadajo tudi vse druge sorte tujega izvora, ki se v Republiki Sloveniji pridelujejo več kot 50 let in so dobro prilagojene pridelovalnim razmeram.(5) Danes je Itrska belica najbolj razširjena sorta oljk v slovenskih oljčnikih.

2.1.2. Cipressino

Cipressino, znana tudi kot oljka Frangivento, je italijanska sorta, ki ima srednje močno in pokončno rast ter gosto krošnjo. Hitro raste in se dobro obnavlja po obrezovanju. Njeni listi so eliptični, podolgovati in srednje široki. Je zelo odporna proti oljčni pavji pegavosti (*Cycloconium oleaginum*), eni najpogostejših bolezni oljk. Sorto trenutno pogosto gojijo v Apuliji in na Sardiniji za pridelavo olja, ki je cenjeno zaradi svoje dobre kakovosti.(6)

2.1.3. Listi kot stranski proizvod v oljkarstvu

Oljčni listi so eden od odpadnih stranskih proizvodov oljkarstva - ostajajo na drevesih, se odstranijo med obrezovanjem ali pa jih pred predelavo oliv ločijo od njih z ventilatorjem.

Na enem hektarju oljka se proizvede 1500 kg biomase, ki nastane pri obrezovanju dreves, pri čemer listi predstavljajo 25 % (375 kg). V Sloveniji je 1665,6 ton te biomase (podatki iz leta 2017), kar sorazmerno pomeni, da slovenski kmetje letno pridelajo 416,4 ton oljčnih listov, ki se zavržejo.(7,8) V Evropski uniji letno pridelamo 4,5 milijona ton oljčnih listov.(9)

Te agrarne odpadke lahko uporabimo kot organski substrat za kompostiranje, prehrano živali, neposredno deponiranje na zemljišču, pridobivanje manitola ali ekstrakcijo fenolnih spojin.(10)

2.2. Biokemijska sestava oljčnih listov

2.2.1. Antioksidanti

Antioksidativne spojine so pomemben dejavnik v zdravju. Glavna značilnost antioksidantov je njihova sposobnost, da zadržujejo in stabilizirajo proste radikale. Antioksidativne spojine zavirajo avtooksidacijo molekul z zaviranjem začetka ali širjenja oksidativnih verižnih reakcij, zato lahko preprečijo poškodbe celic.(11)

Prosti radikali povzročajo številne zdravstvene težave, kot so rak, staranje, bolezni srca in želodčne težave. Prosti radikal je opredeljen kot molekula ali molekularni delci, ki vsebujejo enega ali več neparnih elektronov v zunanji atomski ali molekulski orbitali. Antioksidativni učinek je povezan s fenolnimi sestavinami.(11)

Aktivnost fenolnih spojin je predvsem posledica njihovih redoks lastnosti pri zadrževanju in stabilizaciji prostih radikalov.(11)

2.2.2. Fenolne spojine

Polifenoli, skupina heterogenih spojin, so naravni sekundarni metaboliti, ki se večinoma nahajajo v rastlinskih vrstah. Njihova molekularna struktura temelji na vezi med hidroksilnimi skupinami (polarna faza) in enim ali več aromatskih obročev.(12)

Fenolne spojine so široko zastopane v rastlinskem kraljestvu. Zaradi njihovih ugodnih učinkov na človeško zdravje in pojavljanja v lahko dostopnih nizkocenovnih virih, kot so odpadki iz kmetijsko-živilske predelave, se je v zadnjem desetletju povečalo zanimanje za njihovo pridobivanje in nadaljnje izkoriščanje.(13)

Polifenoli oljčnih listov imajo številne ugodne učinke na zdravje ljudi, kot so antioksidativna učinkovitost, antiaterosklerotično, kardioprotektivno, protivnetno, protimikrobo, hipoglikemično in protirevmatično delovanje.(8)

Antioksidativna učinkovitost polifenolov je delno odvisna od števila in razporeditve hidroksilnih in glikoziliranih hidroksilnih skupin na benzenovih obročih. Na antioksidativno učinkovitost vpliva tudi prisotnost drugih učinkov v matriksu, iz katerega se ekstrahirajo fenolne spojine.(12)

2.2.2.1. Antianterosklerotični učinek

Kardiovaskularni učinki oljčnih listov so bili temeljito raziskani in pripisani zlasti sortam, ki imajo najvišje koncentracije olevropeina in oleacina, ki pogosto predstavlja tudi večji del antioksidativne učinkovitosti. Ti spojini sta pokazali sposobnost širjenja koronarnih krvnih žil in posledično zmanjšali pojavnost srčnih bolezni.(8)

2.2.2.2. Kardioprotektivni učinek

Raziskan je bil tudi in vivo učinek olevropeina pri zdravljenju z adriamicinom in ugotovljeno je bilo, da olevropein blaži kardiotoksičnost z zaviranjem produktov lipidne peroksidacije, zmanjšanjem oksidativnega stresa in zmanjšanjem dušikovih reaktivnih zvrsti v kardiomiocitih. Te raziskave so bile opravljene na podganah, rezultati raziskav na ljudeh pa še niso znani.(8)

2.2.2.3. Protivnetno delovanje

Spojine, prisotne v oljčnih listih, so pokazale protivnetno delovanje na živalskih modelih ter protialergijske in vitro učinke.(8)

2.2.2.4. Protimikrobo delovanje

Hidrolitični produkti olevropeina, hidroksitirozola in elenolne kisline so vzrok za protimikrobo delovanje oljčnih listov ter njihove antiprotozoarne, kanti-glivične in protivirusne lastnosti.(8)

2.2.2.5. Hipoglikemično delovanje

Oleanolna kislina ima močno hipoglikemično delovanje, ki prispeva k antidiabetičnemu učinku listov Olea europaea.(8)

2.2.2.6. Protirevmatično delovanje

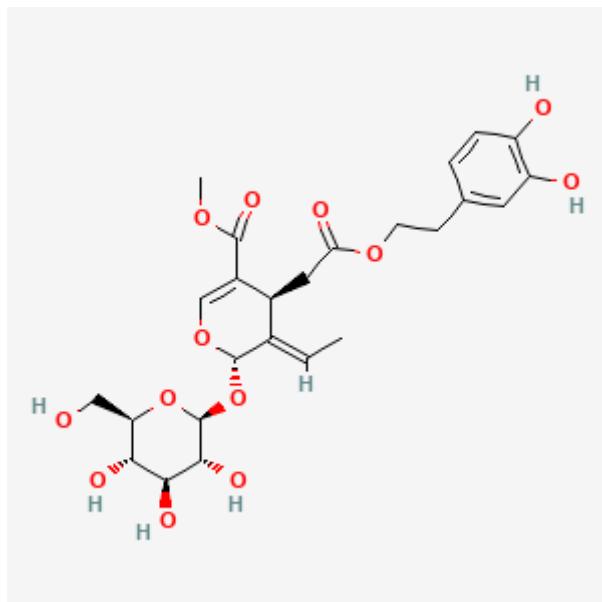
Olevropein je spojina, odgovorna za preprečevanje in zdravljenje revmatoidnega artritisa na živalskih modelih, podobne učinke pa ima tudi pri osteoartritisu, zlasti pri izboljšanju otekanja sklepov in preprečevanju nastajanja vnetnih citokinov.(8)

2.2.2.7. Fenolne spojine v oljčnih listih

Najpomembnejše fenolne spojine v oljčnih listih za človekovo zdravje so olevropein, ki ga je v oljčnih listih 17-24,5 %, v primerjavi z 1,4 % apigenin-7-glukozidom, 1,4 % luteolin-7-307 glukozidom, 1,1 % verbaskozidom in 0,01-0,8 % hidroksitirozolom.(8, 14)

Lignocelulozne sestavine oljčnih listov so celuloza (5,7% na suho snov), hemiceluloza (3,8% na suho snov) in lignin (39,6% na suho snov).(8)

Olevropein spada med sekoiridoide. Iridoidi in sekoiridoidi so spojine, ki so običajno glikozidno vezane in nastajajo pri sekundarni presnovi terpenov kot prekurzorji različnih indolnih alkaloidov. Olevropein je ester 2-(3,4-dihidroksifenil) etanola (hidroksitirozola) in ima oleozidni skelet.(15)



Slika 1: Stereokemijska zgradba olevropeina (16)

Antioksidativni potencial olevropeina je lahko posledica njegove sposobnosti povezovanja s kovinskimi ioni, kot sta Cu in Fe, ki katalizirajo reakcije nastajanja prostih radikalov, ter sposobnosti zaviranja številnih vnetnih encimov, kot so lipoksiгенaze, brez vpliva na ciklooksigenazno pot.(8)

S staranjem listov se količina olevropeina zmanjšuje, medtem ko se količina hidroksitirozola povečuje zaradi kemičnih in encimskih procesov, ki potekajo (8) - olevropein se lahko razgradi v hidroksitirozol in elenolno kislino zaradi različnih dejavnikov, kot so zrak, svetloba, kislo ali bazično okolje, oksidanti, kovinski ioni in visoke temperature.(14)

Hidroksitirozol ima tri proste hidroksilne skupine in močno protitumorsko biološko aktivnost, saj zavira proliferacijo celic promielocitne levkemije, celic raka debelega črevesa in celic raka dojke.(14)

2.2.3. Ekstrakcija oljčnih listov (čas in pH)

Te koristne spojine oljčnih listov je mogoče ekstrahirati na različne načine, ki imajo različno učinkovitost pridobivanja. Pri ekstrakciji polifenolnih spojin, od katerih je 75 % olevropeina, je veliko spremenljivk.(17 p151-69) Nekatere med njimi so izbrano topilo, pH raztopine, razmerje med maso listov in topilom, čas in temperatura ekstrakcije. Raziskavo teh parametrov so opravili Domenico Cifá in sodelavci.(1)

Topilo

V raziskavi so ugotovili, da so največji izkoristek olevropeina dosegli z uporabo 70-odstotnega etanola v primerjavi z uporabo čiste vode, ki pri teh pogojih ni dala zaznavnega signala za olevropein.(1)

pH

Med vzorci s pH 2,0, 3,0, 4,0 in 5,7 ni bilo pomembnih razlik. Pri daljšem obdobju (dnevi) se stabilnost olevropeina drastično zmanjša pri pH 2,0 in manj pri pH 3,0 in 4,0.(1)

Razmerje med maso listov in topilom

Največji izkoristek ekstrakcije olevropeina je bil dosežen z uporabo razmerja 1:10 med listi in raztopino 70% etanola.(1)

Čas

Učinkovitost ekstrakcije se v prvih 4 urah ni bistveno spremenila, največja vsebnost olevropeina pa je bila dosežena v prvi uri. Po 4 urah se je izkoristek ekstrakcije s podaljševanjem časa ekstrakcije znatno zmanjšal, kar je bila verjetno posledica nenehne oksidativne razgradnje olevropeina.(1)

Temperatura

Z višanjem temperature se je povečal izkoristek olevropeina, kar je povezano z večjo topnostjo in difuzijskimi koeficienti. V nekaterih raziskavah je bila izpostavljena razmeroma nizka toplotna stabilnost olevropeina, v drugih pa se je kot optimalna temperatura za ekstrakcijo izkazala 60 °C.(1)

2.2.4. Metabolizem polifenolov

López de las Hazas M. in sodelavci (16) so v raziskavi na podlagah primerjali razlike v absorpciji in presnovi hidroksitirozola v prosti obliki ali prek njegovih naravnih esterificiranih prekurzorjev: olevropeina in njegovih aglikonskih oblik, znanih kot sekoiridoidi.(18)

V tej raziskavi je v želodcu ostala zaznavna količina prvotnega olevropeina, kar pomeni, da je molekula olevropeina do neke mere odporna na kislinsko hidrolizo v želodcu. V skladu s tem so predhodne raziskave pokazale, da je olevropein stabilen v človeškem želodčnem soku.(18)

Med prebavo v tankem črevesu je del prvotne oblike olevropeina ostal nespremenjen, ne da bi se deglikoziliral, in je bil odporen proti delovanju laktazne florizinske hidrolaze (encima, ki ga najdemo v lumnu resičaste stene tankega črevesa z β -glukozidazno aktivnostjo do glikozidnih spojin, kot so flavonoidi). Ti rezultati bi lahko kazali, da se olevropein v alkalnih črevesnih razmerah manj razgrajuje kot hidroksitirozol in sekoiridoidi.(18)

Ko se polifenoli absorbirajo skozi črevesno pregrado, se v črevesni sluznici in notranjih tkivih konjugirajo v glukuronidne, sulfatne in metilne skupine. Nekonjugiranih polifenolov v plazmi praktično ni. Takšne reakcije olajšajo njihovo izločanje in omejujejo njihovo morebitno toksičnost. Polifenole, ki pridejo v debelo črevo, mikroflora intenzivno presnavlja v številne fenolne kisline z nizko molekulsko maso.(19)

2.2.5. Človeški prebavni sistem

Človeški prebavni sistem je neprekinjen in dinamičen proces, ki se začne v ustih. Pri trdni hrani se v ustih zmanjša velikost delcev hrane in ustvari se bolus. Tekočine pa so skoraj pripravljene za požiranje in razen uravnavanja na telesno temperaturo in redčenja s slino potrebujejo minimalno obdelavo. Slina je kompleksna viskozna vodna snov, ki jo proizvajajo žleze slinavke in vsebuje 99,5 % vode, 0,3 % beljakovin/encimov (zlasti lipaze in amilaze) ter različne elektrolite, kot so natrij, kalij, kalcij, magnezij, fosfat in bikarbonat. Ti encimi lahko delno spremenijo strukturo in sestavo živil. pH sline se giblje med 6,2 in 7,6.(20) Približna količina izločene sline med žvečenjem je 4,5 do 5 mL na minuto.(21)

Nastali bolus hrane se s peristaltiko prenese v želodec, kjer se sprostijo proteaze (kot je pepsin) in klorovodikova kislina, ki uničuje ali zavira bakterije in zagotavlja kisel pH 2 za delovanje proteaz. Volumen želodčne tekočine na teče je približno 35 mL ± 7 mL.(22) Peristaltika, ki poteka v želodcu, je približno 2,6 do 3 krčev na minuto. Bolus ostane v želodcu od 15 minut do 3 ure.(23)

Delno prebavljena hrana se pomika iz želodca navzdol v tanko črevo, ki izloča natrijev bikarbonat, da postane rahlo alkalno (pH od 7 do 8). Pri tem pride do nadaljnje razgradnje beljakovin in maščob ter absorpcije hranilnih snovi.(24) Hrana lahko v tankem črevesu (25) ob krčenju mišic s približno 16 krči na minuto ostane od 2 do 6 ur.(26)

3. Metode

3.1. Materiali

- Dve sorte oljčnih listov:
 - Istrska belica iz aprila 2015 in novembra 2020
 - Cipressino iz avgusta 2021
 - obe sorte sta bili pridobljeni na Inštitutu za oljkarstvo ZRS Koper, do nadaljnje uporabe sta bili shranjeni na suhem
- Enhanced Super Digestive Enzymes (Life Extension Europe®) s 140 mg prebavnih encimov VSEBINA KAPSUL:
 - **Proteaza SP** (*Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, 25.000 FCC (HUT))
Serinske proteaze so največji razred proteaz pri sesalcih. Njihovo ime razkriva, da na svojih aktivnih mestih vsebujejo katalitično pomemben serinski ostanek. Serinske proteaze so optimalno aktivne pri nevtralni pH-vrednosti in imajo pomembno vlogo pri zunajcelični proteolizi.(27)
 - **Bromelain** (*Ananas comosus*, 800.000 FCC (PU))
Bromelain spada v skupino encimov za razgradnjo beljakovin, ki napadajo notranje peptidne vezi beljakovinske verige.(28)
 - **Laktaza** (*Aspergillus oryzae*, 2.000 FCC (ALU))
Laktaza je encim, ki ga najdemo v tankem črevesu sesalcev in katalizira razgradnjo lakoze (mlečnega sladkorja) v enostavna sladkorja glukozo in galaktozo.(29)
 - **Celulaza** (*Aspergillus oryzae*, 2.000 FCC (CU))
Encimi celulaze razgrajujejo celulozo do glukoze. Celulaza vključuje tri encime, kot so β-1,4-endoglukanaza, celobiohidrolaza in β-glukozidaza.(30)

- **Lipaza** (*Candida rugosa*, 2.500 FCC (FIP))
Lipaze (triacilglicerol hidrolaze E.C. 3.1.1.3) so encimi, ki katalizirajo hidrolizo triacilglicerolov v glicerol in maščobne kisline. Lipaze so skupaj z amilazo in proteazami eden izmed glavnih prebavnih encimov.(31)
- **Alfa Galaktozidaza** (*Aspergillus niger*, 150 (GalU))
Alfa galaktozidaza je encim, ki hidrolizira terminalne alfa-galaktozilne dele iz glikolipidov in glikoproteinov. Glikozidaze so pomemben razred encimov, ki katalizirajo številne katabolne procese, vključno s cepitvijo glikoproteinov in glikolipidov ter polisaharidov.(32)
- **Hemicelulaza** (*Aspergillus niger*, 4.000 (HCU))
Hemicelulaze so odgovorne za razgradnjo hemiceluloze iz rastlinske biomase. Hemicelulaze iz gliv in termofilnih bakterij so komercialno pomembne, saj so običajno odporne na robustne pogoje, kot so ekstremne temperature in pH.(33)
- **Pektinaza** (*Aspergillus niger*, 25 (endo-PGU))
Pektinaze so skupina encimov, ki katalizirajo razgradnjo pektinskih snovi (katerekoli od različnih vodotopnih snovi, ki vežejo sosednje celične stene v rastlinskih tkivih) z reakcijami depolimerizacije (hidrolaze in liaze) ali deesterifikacije (esteraze). Komercialne pektinaze so optimalno aktivne med 45 in 55 °C ter v območju pH 4,8-5,0.(34)
- **Proteaza 3.0** (*Aspergillus niger*, 10 (SAPU))
Proteaze so učinkovite pri hidrolizi peptidnih vez.(35)
- **Ksilanaza** (*Trichoderma longibrachiatum*, 500 (XU))
Ksilanaze so hidrolaze, ki depolimerizirajo spojino rastlinskih celic ksilan, ki je drugi najpogosteji polisaharid. Optimalne temperature ksilanaz v glivah so med 60 in 80 °C. Ti encimi so običajno glikoproteini in večina jih kaže največjo aktivnost pri kislem pH.(36)
- kromatografska kolona (Phenomenex Jupiter 4 µm Proteo 90 Å 4,6 mm x 250 mm, Združene države Amerike)
- Standarda:
 - Hidroskitirozol (Hydroxytyrosol analytical standard ≥ 98% HPLC, Extrasynthese, Francija)
 - Olevropein (≥ 80% HPLC, Sigma-Aldrich)
- Mobilni fazi:
 - Acetonitril (CHROMASOLV™, gradient grade, for HPLC, ≥99.9%, Honeywell Riedel-de Haën)
 - Trifluoroocetna kislina (for synthesis, Merck)

3.2. Instrumenti

3.2.1. Mettler Toledo HE53 analizator vlage



Slika 2: Analizator vlage (37)

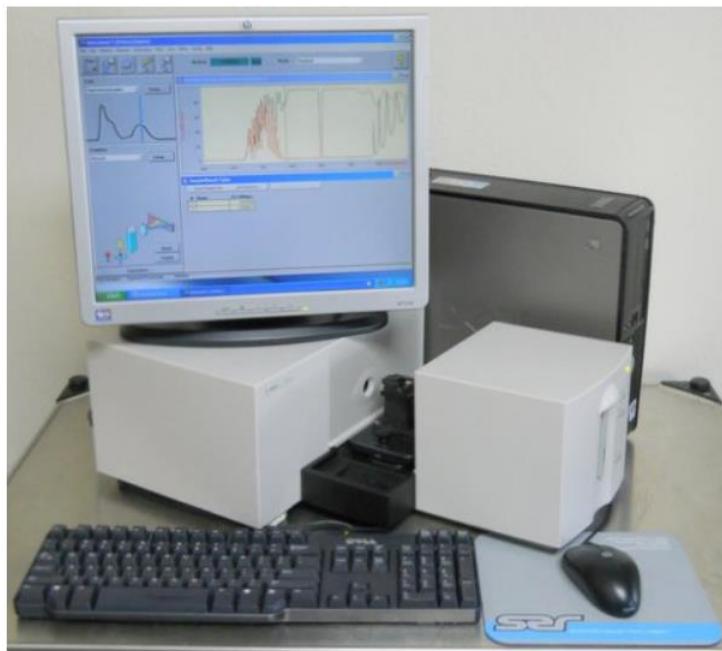
Analizator vlage je instrument za hitro določanje vsebnosti vlage v vzorcu. Sestavljen je iz infrardečega vira segrevanja in enote za tehtanje.(38)

Analizator vlage deluje z metodo "izgube pri sušenju" (LOD). To je najpogostejsa metoda za analizo vlage.(35)

Analizator stehta vzorec pred odstranitvijo vlage in po njej. To se izvede s stalnim spremljanjem mase med segrevanjem in sušenjem vzorca s halogensko svetilko ali drugim infrardečim virom.(38)

Ko se masa vzorca s časom ne spreminja več, se izmeri razlika med začetno in končno maso, kar se uporabi za izračun vsebnosti vlage. To je znano tudi kot termogravimetrično načelo.(38)

3.2.2. UV-Vis Spektrofotometer (Hewlett Packard 8453, Agilent 89090A)



Slika 3: Spektrofotometer (39)

Spektrofotometer je instrument, ki meri, koliko svetlobe absorbira snov. Vsaka snov prepušča in absorbira svetlobo nekoliko drugače.(40)

Koraki spektrofotometrične analize:

1. V spektrofotometer vstavimo kiveto s tekočim vzorcem. Pri ravnjanju s kivetom moramo biti previdni, saj lahko že majhen prstni odtis moti rezultate.
2. Vir svetlobe sveti na vzorec.
3. Naprava, imenovana monokromator, razdeli svetlobo na posamezne barve oziroma posamezne valovne dolžine. Nastavljava reža prepušča le eno določeno valovno dolžino svetlobe do raztopine vzorca.
4. Svetloba z določeno valovno dolžino pade na vzorec.
5. Svetloba, ki prehaja skozi vzorec, se prikaže na izhodnem zaslonu kot prepustnost (svetloba, ki prehaja skozi vzorec) ali absorpcija (svetloba, ki se zadrži v vzorcu).(40)

Pri kalibraciji spektrofotometra se za kalibracijo opreme uporabi slepi vzorec. To je vzorec, pripravljen na enak način kot eksperimentalni vzorec, le da ne vsebuje učinkovine, ki jo analiziramo. Napravo kalibriramo tako, da slepi vzorec vstavimo v spektrofotometer, ponastavimo nastavitev in zaženemo instrument. Nato se lahko eksperimentalni vzorci analizirajo s spektrofotometrijo.(41)

V skladu z Beer-Lambertovim zakonom je absorbanca premo sorazmerna s koncentracijo uporabljeni raztopine. Iz signala absorbance lahko izračunamo koncentracijo topljenca v raztopini. To lahko storimo z Beer Lambertovo enačbo ali iz umeritvene krivulje.(42)

3.2.3. HPLC (Agilent 1260 Infinity, Združene države Amerike)



Slika 4: HPLC (Agilent 1260 Infinity, Združene države Amerike)

HPLC-sistem je Agilent 1260 Infinity (ZDA), in je sestavljen iz:

- Razplinjevalec: G1322A
- Binarna črpalka: G1312B
- Avtomatski odjemalec vzorcev: G1367E
- Termostat za kolono: G1316A
- Detektor DAD: G4212B
- Podprt z računalniškim programom ChemStation for LC 3D Systems (REV:B.04.03-SP2 (105))

Uporabili smo tudi:

- kromatografsko kolono (Phenomenex Jupiter 4 µm Proteo 90 Å 4,6 mm x 250 mm, Združene države Amerike)
- Standarda:
 - Hidroskitirozol (Hydroxytyrosol analytical standard ≥ 98% HPLC, Extrasynthese, Francija)
 - Olevropein (≥ 80% HPLC, Sigma-Aldrich)
- Mobilni fazi:
 - Acetonitril (CHROMASOLV™, gradient grade, for HPLC, ≥99.9%, Honeywell Riedel-de Haën)
 - Trifluoroocetna kislina (for synthesis, Merck)
- Filtre Sartorius Minisart RC 4, 20 µm

3.2.4. pH-meter (Mettler Toledo Seven Easy S20)



Slika 5: pH-meter (43)

pH-meter deluje podobno kot voltmeter: izmeri napetost, ki jo proizvede raztopina, katere kislost nas zanima, jo primerja z napetostjo znane raztopine in na podlagi razlike v napetosti med njima določi razliko v pH. Kisla raztopina ima v sebi veliko več oksonijevih ionov kot bazična, zato ima večji potencial, da pri uporabi steklene kombinirane elektrode (ki zaznava oksonijeve ione) proizvede električni tok.(44)

Da bi bili pH-metri natančni, morajo biti pravilno umerjeni (da merilnik natančno pretvarja meritve napetosti v meritve pH), zato jih je običajno treba preizkusiti in prilagoditi, preden jih začnemo uporabljati. Merilnik pH kalibriramo tako, da ga potopimo v pufre (preskusne raztopine z znanim pH) in z njimi merilnik ustrezno prilagodimo.(44)

3.2.5. Ostalo:

- Tehnice:
 - KERN ABP 200-5DM
 - METTLER TOLEDO PB3002-S
- IKA Vortex Genius 3 (vrtinčnik)
- IKA RCT basic (magnetni mešalnik)
- Mixer Mill MM 400 – RETSCH (kroglični mlin)
- Kefo 9738408*LLG grinding ball 15R (kroglica za mletje)
- Centrifuge:
 - Microcentrifuga: Centrifuge 5425/5425 R
 - Centrifuga CENTRIC 322 A (Tehnica™)
- Stresalniki:
 - Vibromix 314 EVT stresalnik (Tehnica™)
 - MaxQ™ 4000 Benchtop Orbital Shaker (Thermo Scientific™)

3.3. Metode

3.3.1. Mletje

Oljčne liste smo mleli 60 sekund pri frekvenci 30 Hz. Zmlete liste smo nato stehtali in jih do nadaljnje uporabe shranili v zaprtih posodah.

Pred nadaljnjo analizo smo z analizatorjem vlage pri obeh vrstah listov določili vsebnost vlage.

3.3.2. Ekstrakcija 1 - mešanje

Liste smo ekstrahirali na dva različna načina. Prvi način ekstrakcije je bil naslednji:

1 g vsake sorte listov smo odtehtali v eno stekleničko z zamaškom, 1 g pa v drugo stekleničko. Vsebina ene encimske kapsule je bila dodana eni steklenički z listi. Vsebina ene encimske kapsule je bila dodana v lastno stekleničko.

V vsako stekleničko smo dodali 10 mL ultračiste vode s prilagojeno pH-vrednostjo (vsakemu nizu vzorcev smo dodali vodo z različno pH-vrednostjo: 2, 4, 6 ali 8). Epruvete smo pokrili z aluminijasto folijo, da svetloba ne bi motila postopka ekstrakcije. Vzorce smo nato 90 minut ekstrahirali na magnetnem mešalniku pri 37 °C in 950 vrtljajih na minuto.

Po ekstrakciji smo vzorce za 10 minut centrifugirali pri 19 000 x g RCF in 20 °C. Supernatante smo filtrirali skozi 12 µm filter in nato skozi 0,45 µm filter. Izmerili smo prostornino filtriranih vzorcev. Vzorce smo shranili v centrifugirkah.

S to metodo smo pripravili več ekstraktov:

Tabela 2: Ekstrakti, pripravljeni z mešanjem na magnetnem mešalniku

Itrska belica 2020 (MIB)	Cipressino (MCI)	Itrska belica (MSB)	Samo encimi (ME)
Itrska belica 2020 brez encimov pri pH2 (MIBK2)	Cipressino brez encimov pri pH2 (MCIK2)	Itrska belica 2015 brez encimov pri pH2 (MSBK2)	Encimi pri pH2 (ME2)
Itrska belica 2020 z encimi pri pH2 (MIBE2)	Cipressino z encimi pri pH2 (MCIE2)	Itrska belica 2015 z encimi pri pH2 (MSBE2)	
Itrska belica 2020 brez encimov pri pH4 (MIBK4)	Cipressino brez encimov pri pH4 (MCIK4)	Itrska belica 2015 brez encimov pri pH4 (MSBK4)	Encimi pri pH4 (ME4)
Itrska belica 2020 z encimi pri pH4 (MIBE4)	Cipressino z encimi pri pH4 (MCIE4)	Itrska belica 2015 z encimi pri pH4 (MSBE4)	
Itrska belica 2020 brez encimov pri pH6 (MIBK6)	Cipressino brez encimov pri pH6 (MCIK6)	Itrska belica 2015 brez encimov pri pH6 (MSBK6)	Encimi pri pH6 (ME6)
Itrska belica 2020 z encimi pri pH6 (MIBE6)	Cipressino z encimi pri pH6 (MCIE6)	Itrska belica 2015 z encimi pri pH6 (MSBE6)	
Itrska belica 2020 brez encimov pri pH8 (MIBK8)	Cipressino brez encimov pri pH8 (MCIK8)	Itrska belica 2015 brez encimov pri pH8 (MSBK8)	Encimi pri pH8 (ME8)
Itrska belica 2020 z encimi pri pH8 (MIBE8)	Cipressino z encimi pri pH8 (MCIE8)	Itrska belica 2015 z encimi pri pH8 (MSBE8)	

3.3.3. Ekstrakcija 2 - stresanje

Tabela 3: Ekstrakti, pripravljeni s stresanjem

Itrska belica 2020 (SIB)	Cipressino (SCI)	Samo encimi (SE)
Itrska belica 2020 brez encimov (SIBK)	Cipressino brez encimov (SCIK)	Samo encimi (SE)
Itrska belica 2020 z encimi (SIBE)	Cipressino z encimi (SCIE)	

1 g listov posamezne sorte smo stehtali v eno 15-mililitrsko centrifugirko, 1 g pa v drugo. Vsebina ene encimske kapsule je bila dodana v eno centrifugirko z listi, vsebina ene encimske kapsule pa je bila dodana v lastno centrifugirko.

V vsako centrifugirko smo dodali 10 mL ultračiste vode. Mešanice smo mešali na stresalniku in jih pokrili z alufolijo. Vzorce smo nato trikrat zaporedoma ekstrahirali na stresalniku 30 minut pri 25 °C in 0,307 RCF (SIBK, SIBE, SCIK, SCIE) ter jih centrifugirali 10 minut pri 2590 RCF. Po vsakem centrifugiranju smo supernatante prenesli v sveže 50 mL centrifugirke. Preostalim usedlinam je bilo dodanih 10 mL ultračiste vode. Postopek ekstrakcije smo ponovili še dvakrat. Supernatante iz zaporedne ekstrakcije smo na koncu združili.

Po koncu tristopenjske ekstrakcije smo supernatante prefiltrirali skozi 0,45 µm filtre.

Vzorec z zgolj encimsko kapsulo (SE) smo brez prekinitve stresali 90 minut in nato centrifugirali 10 minut pri 2590 RCF. Supernatant (vzorec SE) smo nato prefiltrirali skozi 0,45 µm filter.

Vse vzorce smo do nadaljnje analize hranili v hladilniku.

3.3.4. Ekstrakcija 3 – kontinuirna simulacija prebavnega sistema

Pogoje za kontinuirno prebavo človeškega organizma smo izvedli v skladu z metodo statičnih modelov in vitro prebave.(45)

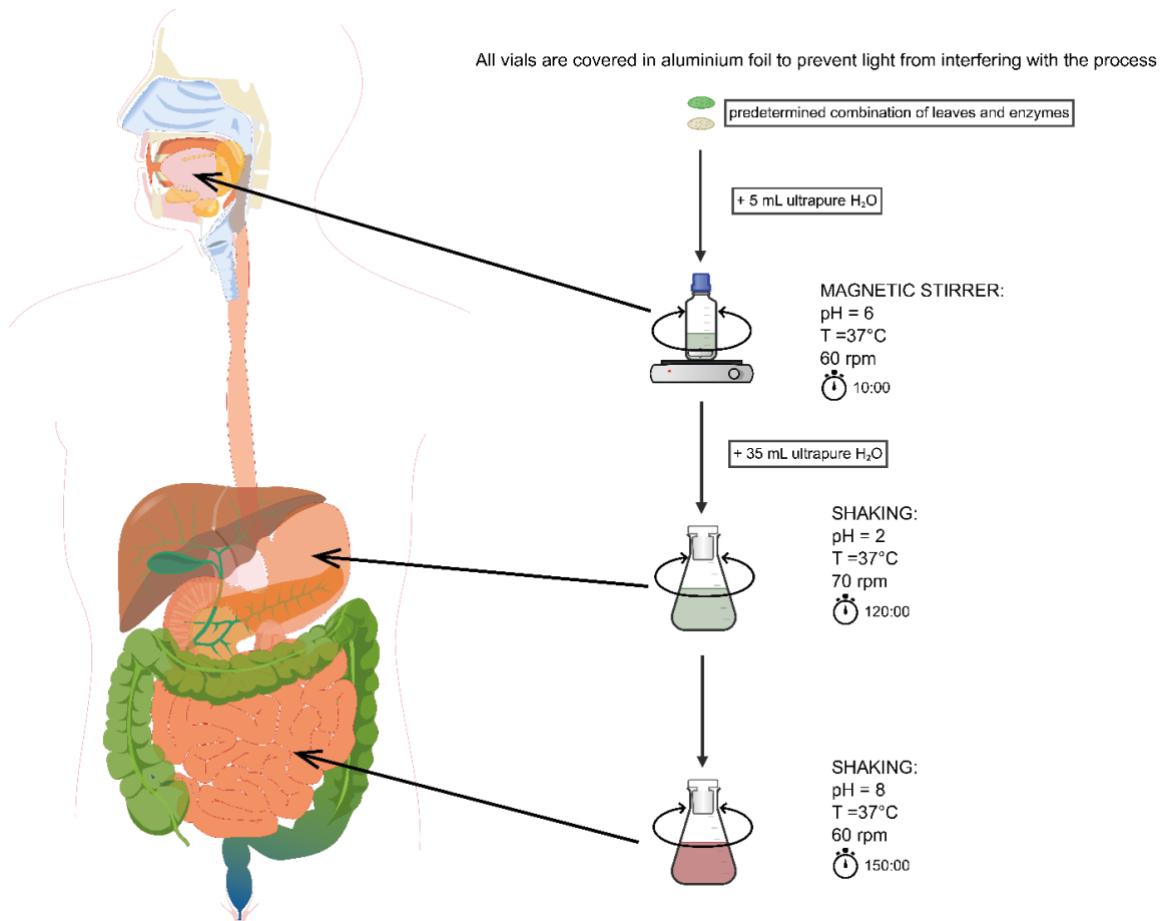
Za pripravo vzorcev za prebavo smo v dve steklenički odtehtali v vsako po 0,5 g posamezne sorte listov. Vsebino štirih encimskih kapsul (okvirna masa 1,65 g) smo enakomerno razdelili na štiri mase. Od tega smo dve četrtini dodali listom Itrske belice (eno četrtino vzorca iz leta 2015 in drugo vzorcu iz leta 2020), eno četrtino listom Cipressino, zadnjo četrtino pa smo shranili v lastno stekleničko.

Za simulacijo razmer v človeških ustih med žvečenjem smo ultračisto vodo uravnali na pH 6,0 z 1,0 M NaHCO₃ in jo s odpipetirali po 5 mL v vsako stekleničko. Epruvete smo nato zavili v aluminijasto folijo in mešali na magnetnem mešalu za 10 minut pri 37 °C in 60 rpm. Na koncu ekstrakcije smo 0,5 mL vsake mešanice odpipetirali v 1 mL centrifugirke, tako da smo lahko kasneje primerjali začetek in konec simulacije.

Za simulacijo razmer v človeškem želodcu smo mešanice nato prelili v erlenmajerice in v vsako dodali 35 mL ultračiste vode. pH vsake mešanice smo z 1 M HCl uravnali na 2,0. Erlenmajerice smo zavili v aluminijasto folijo in jih ekstrahirali 120 minut na stresalniku pri 37 °C in 70 rpm. Frekvenco stresanja smo nastavili višje od povprečne frekvence želodčne peristaltike (na 1,167 s⁻¹ namesto 0,125 s⁻¹), ker se tekočine pri nižji frekvenci niso dobro mešale.

Za simulacijo razmer v **tankem črevesu**: po simulaciji želodca smo pH mešanic prilagodili na 8,0 z 1 M NaOH. Nato smo vzorce ekstrahiriali na stresalniku 150 minut pri 37 °C in 60 rpm.

Po simulirani prebavi smo vsebino erlenmajeric še enkrat temeljito premešali in nato prelili v 50-mililitrske centrifugirke. Te smo centrifugirali (10 minut, 2590 RCF) in filtrirali (0,45 µm). Filtrate smo do nadalnjih analiz shranili v 2 mL centrifugirkah v obliki 1 mL alikvotov.



Slika 6: Grafični prikaz kontinuirne simulacije prebavnega sistema (46)

Tabela 4: Vzorci, ki so šli skozi simulirano prebavo

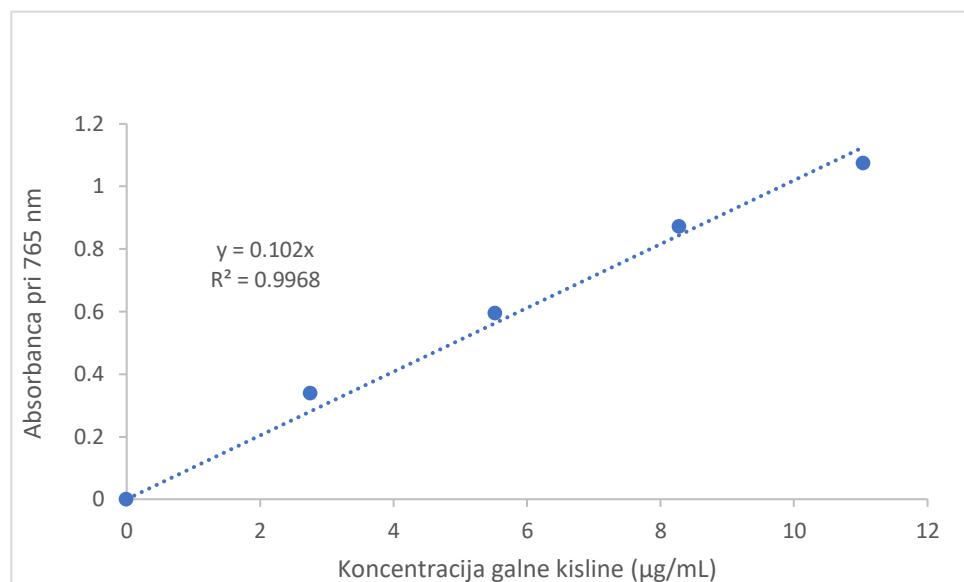
Itrska belica 2020 (IB)	Cipressino (CI)	Itrska belica (SB)	Samo encimi (E)
Itrska belica 2020 brez encimov po prebavi ust (IBK po ustih)	Cipressino brez encimov po prebavi ust (CIK po ustih)	Itrska belica 2015 brez encimov po prebavi ust (IBK po ustih)	Encimi po prebavi ust (E po ustih)
Itrska belica 2020 z encimi po prebavi ust (IBE po ustih)	Cipressino z encimi po prebavi ust (CIE po ustih)	Itrska belica 2015 z encimi po prebavi ust (IBE po ustih)	
Itrska belica 2020 brez encimov po prebavi želodca (IBK po želodcu)	Cipressino brez encimov po prebavi želodca (CIK po želodcu)	Itrska belica 2015 brez encimov po prebavi želodca (IBK po želodcu)	Encimi po prebavi želodca (E po želodcu)
Itrska belica 2020 z encimi po prebavi želodca (IBE po želodcu)	Cipressino z encimi po prebavi želodca (CIE po želodcu)	Itrska belica 2015 z encimi po prebavi želodca (IBE po želodcu)	
Itrska belica 2020 brez encimov po končani prebavi (DIBK)	Cipressino brez encimov po končani prebavi (DCIK)	Itrska belica 2015 brez encimov po končani prebavi (DIBK)	Encimi po končani prebavi (DE)
Itrska belica 2020 z encimi po končani prebavi (DIBE)	Cipressino z encimi po končani prebavi (DCIE)	Itrska belica 2015 z encimi po končani prebavi (DIBE)	

3.3.5. Določanje vsebnosti fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

Analiza s Folin-Ciocalteujem (FC) je ena izmed najbolj priljubljenih analiz za določanje vsebnosti fenolnih spojin. Princip FC-analize je redukcija FC-reagenta v prisotnosti fenolnih spojin, pri čemer nastane molibden-volframov kompleks, ki se meri spektrofotometrično pri 760 nm, pri čemer intenzivnost narašča linearno s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijskem mediju.(47)

Na splošno se kot referenčna standardna spojina uporablja galna kislina, rezultati pa so izraženi kot ekvivalenti galne kisline (mg/mL).

Umeritveno krivuljo smo pripravili z galno kislino, razredčeno v razponu od 0 do 11 µg/mL.



Slika 7: Umeritvena krivulja za galno kislino/FC-reagent

Vse vzorce smo pripravili za analizo s FC-reagentom. V ta namen smo vzorce ustreznno razredčili. Pripravili smo tudi 20-odstotno raztopino Na₂CO₃ in 3x razredčen FC-reagent. Reagent smo zavili v aluminijasto folijo, da bi preprečili možne motnje zaradi svetlobe.

Raztopine smo zmešali z vrtinčnikom. 200 µL razredčenega vzorca, 125 µL FC-reagenta, 125 µL raztopine Na₂CO₃ in 550 µL ultračiste vode smo odpipetirali v 2 mL centrifugirke. Ta postopek smo v navedenem vrstnem redu trikrat ponovili za vsak vzorec.

Slepi vzorec smo pripravili z naslednjim zaporedjem: 125 µL FC-reagenta, 125 µL raztopine Na₂CO₃ in 750 µL ultračiste vode smo odpipetirali v 2 mL centrifugirko.

Mešanice smo premešali na vrtinčniku in jih za 30 minut zavili v aluminijasto folijo. Nato smo jih centrifugirali 10 minut pri 8200 x g RCF in 20 °C. Absorbanco pripravljenih vzorcev smo izmerili pri 765 nm.

3.3.6. HPLC analiza

Kromatografija je separacijska metoda, ki temelji na porazdelitvi posameznih komponent v kompleksnih zmeseh med mobilno fazo, ki je lahko tekočina ali plin, in stacionarno fazo, ki je lahko trdna snov ali tekočina. Do separacije posameznih komponent v zmesi pride zaradi razlike v hitrosti migracije komponent pod vplivom mobilne faze zaradi selektivnega zadrževanja komponent na stacionarni fazi. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) spada v skupino kolonske kromatografije, kjer se stacionarna faza nahaja v tako imenovani kromatografski koloni, mobilna faza pa se s pomočjo črpalke pretaka skozi stacionarno fazo. Sestava mobilne faze se lahko med kromatografskim postopkom spreminja s časom (gradientni način) ali pa je konstantna (izokratski način). Ker so kemijske spojine v stacionarni in mobilni fazi različno topne, pride do porazdelitve spojin med obe fazi in s tem ločbe spojin iz kompleksnih zmesi. Tekočina, ki priteče iz kolone, se po kapilari pretaka skozi detektor (DAD, RI, FLD..), s pomočjo katerega se zaznajo na koloni ločene komponente v zmesi. Separacija komponent iz kompleksne zmesi je predstavljena v obliki kromatograma, ki je grafični prikaz odvisnosti signala detektorja na HPLC sistemu od elucijskega časa snovi, ki se je izločila iz kolone.(48)

Za ločevanje fenolnih spojin iz različnih rastlinskih ekstraktov se običajno uporabljam HPLC-metode z reverzno fazo. Pri takem načinu kromatografske separacije je stacionarna faza bolj nepolarna od sestave mobilne faze, ki se pretaka skozi stacionarno fazo. Pri HPLC z reverzno fazo je torej mobilna faza hidrofilna, medtem ko je stacionarna faza hidrofobna. To pomeni, da se molekule eluirajo z zmanjšanjem polarnosti mobilne faze, kar pomeni da se tekom kromatografskega postopka povečuje delež organskega topila. Kot organsko topilo se za mobilno fazo najbolj pogosto uporabljava topili acetonitril in metanol, stacionarne faze pa so linearni alkilsilika geli, običajno oktildecilsilan z vezanimi C₁₈-alkilnimi verigami.(48)

Ker pa v času, ki smo ga imeli na voljo za HPLC analizo, kolona C18 ni bila na razpolago, smo metodo separacije fenolnih spojin iz vodnih ekstraktov oljčnih listov razvili na C12-koloni. V nalogi predstavljamo preliminarne rezultate separacije hidroksitirozola in olevropeina le iz vzorčkov vodnih ekstraktov oljčnih listov Itrske belice iz leta 2020. Metoda je opisana v naslednjih odstavkih.

Za separacijo in določanje vsebnosti hidroksitirozola in olevropeina v vzorcih vodnih ekstraktov iz oljčnih listov smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo s sistemom Agilent 1260 Infinity, sestavljenim iz binarne črpalke Agilent G1312B, razplinjevalca Agilent G1322A, avtomatskega podajalca vzorcev Agilent G1367E, termostata za kolono Agilent G1316A, C12-kolone Jupiter 4 µm Proteo 90 Å, 4,6 mm x 250 mm (Phenomenex, Združene države Amerike), spektrofotometričnega detektorja z nizom fotodiod (DAD) Agilent G4212B. Volumen injiciranja vzorcev je bil 20 µL. Vzorci so bili hranjeni v avtomatskem odjemalcu vzorcev pri temperaturi 15 °C, temperatura kolone pa je bila nastavljena na 25 °C.

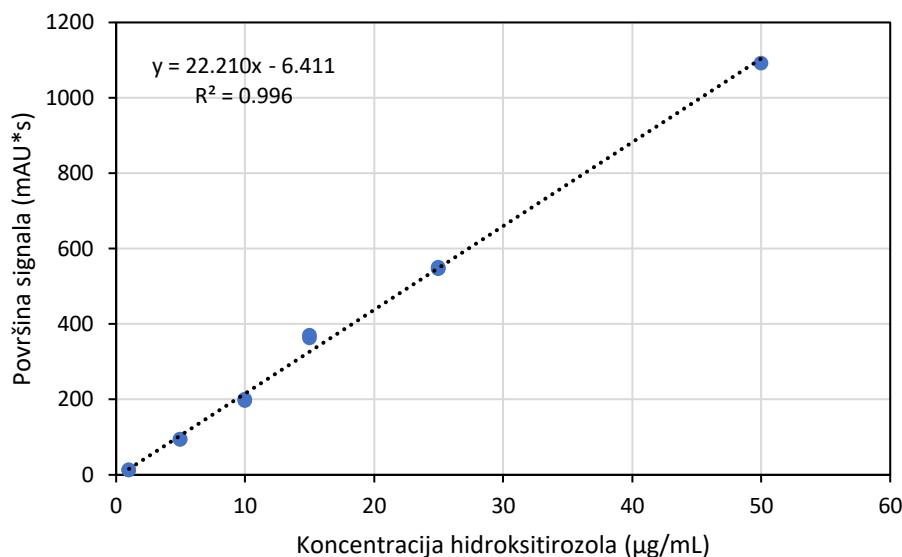
Eluirane spojine smo detektirali pri 280 nm in z zajemanjem spektrov z nastavljivo od 190 nm do 400 nm. Separacija spojin je potekala z mobilno fazo, sestavljeno iz 0,1 % trifluoroacetne kisline (A) in 90 % acetonitrila, ki je vseboval 0,09 % trifluoroacetne kisline (B). Pretok mobilne faze skozi kolono je bil nastavljen na 0,8 mL/min. Sestava mobilne faze se je med kromatografskim postopkom s časom spreminja. Gradient mobilne faze je prikazan v tabeli 1. Zajemanje podatkov in njihova obdelava je bila vodena z računalniškim programom Chemstation for LC 3D Systems (REV:B.04.03-SP2 (105)).

Tabela 5: Gradient mobilne faze

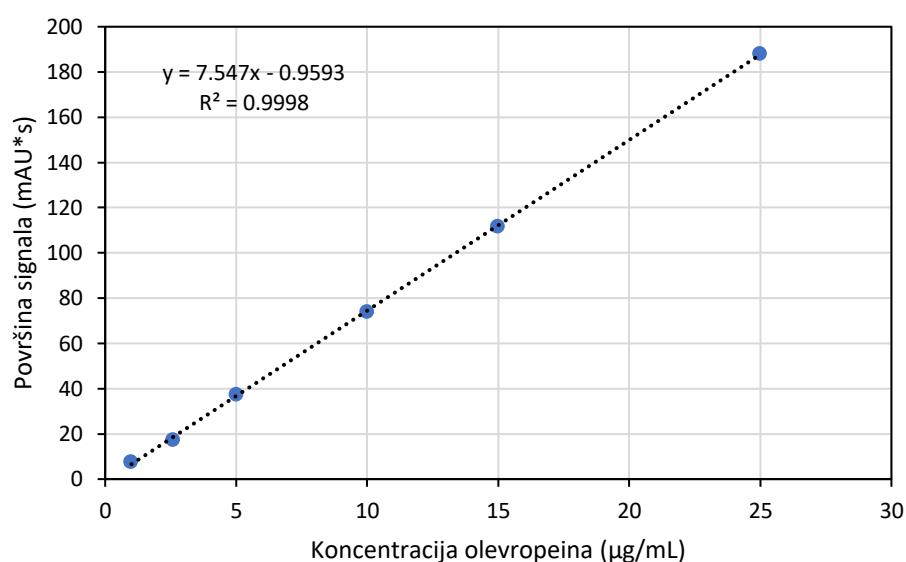
čas (min)	A (%)	B (%)
0,0	90,0	10,0
5,0	90,0	10,0
45,0	75,0	25,0
55,0	50,0	50,0
71,0	20,0	80,0
72,0	90,0	10,0
77,0	90,0	10,0

Identifikacija hidroksitirozola in olevropeina je potekala s primerjavo elucijskih časov in spektrov standardnih raztopin hidroksitirozola in olevropeina. Vsebnost hidroksitirozola in olevropina smo v analiziranih vzorcih vodnih ekstraktov oljčnih listov Istrske belice ovrednotili iz enačbe umeritvenih krivulj, pripravljenih iz standardnih raztopin hidroksitirozola s koncentracijami 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 25 µg/mL in 50 µg/mL, in raztopin olevropeina s koncentracijami 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL in 25 µg/mL. Umeritvene krivulje predstavljajo odvisnost površine kromatografskega vrha standardne spojine v odvisnosti od koncentracije standardne raztopine. Standardne raztopine smo pripravili z redčenjem 70 % etanolne raztopine hidroksitirozola in olevropeina s koncentracijo 10 mg/mL. Raztopine hidroksitirozola in olevropeina, ki smo jih analizirali s HPLC-metodo, smo redčili na ustrezne koncentracije z mobilno fazo, uporabljeno za HPLC-analizo, in filtrirani skozi 0,20 µm filter (Sartorius, Minisart RC4). Vzorčke raztopin standardnih spojin smo analizirani trikrat.

Vzorčke vodnih ekstraktov oljčnih listov Istrske belice smo pripravili za HPLC-analizo tako, da smo jih najprej ustreznno redčili z raztopino mobilne faze, centrifugirali in filtrirali skozi 0,20 µm filter (Sartorius, Minisart RC4). Pripravljene vzorčke vodnih ekstraktov listov Istrske belice smo na HPLC nanesli dvakrat.



Slika 8: Umeritvena krivulja raztopin hidroksitirozola, analiziranih na Jupiter Proteo 90 Å koloni. Y v enačbi predstavlja površino kromatografskega vrha hidroksitirozola, X pa koncentracijo standardne raztopine hidroksitirozola.



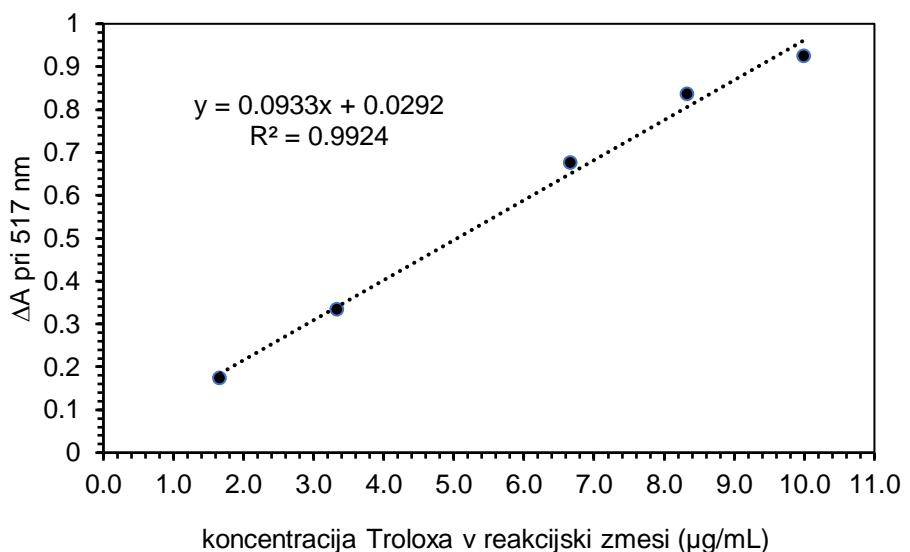
Slika 9: Umeritvena krivulja raztopin olevropeina, analiziranih na Jupiter Proteo 90 Å koloni. Y v enačbi predstavlja površino kromatografskega vrha olevropeina, X pa koncentracijo standardne raztopine olevropeina.

3.3.7. Določanje antioksidativne učinkovitosti z DPPH-reagentom

DPPH metoda temelji na redukciji radikala DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) z reducenti. Reakcija s tem radikalom je odvisna od sposobnosti oddajanja H-atomov. Metoda se

pogosto uporablja zaradi relativno kratkega časa, potrebnega za analizo. Prosti radikal DPPH je zelo stabilen. Reagira s spojinami, ki lahko oddajo vodikove atome, in ima UV-vis absorpcijski maksimum pri 515 nm. Metoda temelji na lovljenju radikala DPPH z antioksidanti, ki po redukcijski reakciji razbarvajo metanolno raztopino DPPH. Test meri redukcijsko sposobnost antioksidantov do DPPH-radikala.(49)

Umeritveno krivuljo smo pripravili s Troloxom, razredčenim v razponu od 1,7 do 10,0 $\mu\text{g/mL}$, rezultati pa so izraženi kot ekvivalenti Troloxa (mg/mL).



Slika 10: Umeritvena krivulja Troloxa/DPPH

Vse vzorce smo pripravili z DPPH-reagentom, da bi določili njihovo antioksidativno učinkovitost. V centrifugirke smo s pipeto odmerili 50 μL nerazredčenega ekstrakta in 1450 μL DPPH-reagenta. Mešanice smo nato premešali in jih pustili 30 minut v temi pred analizo.

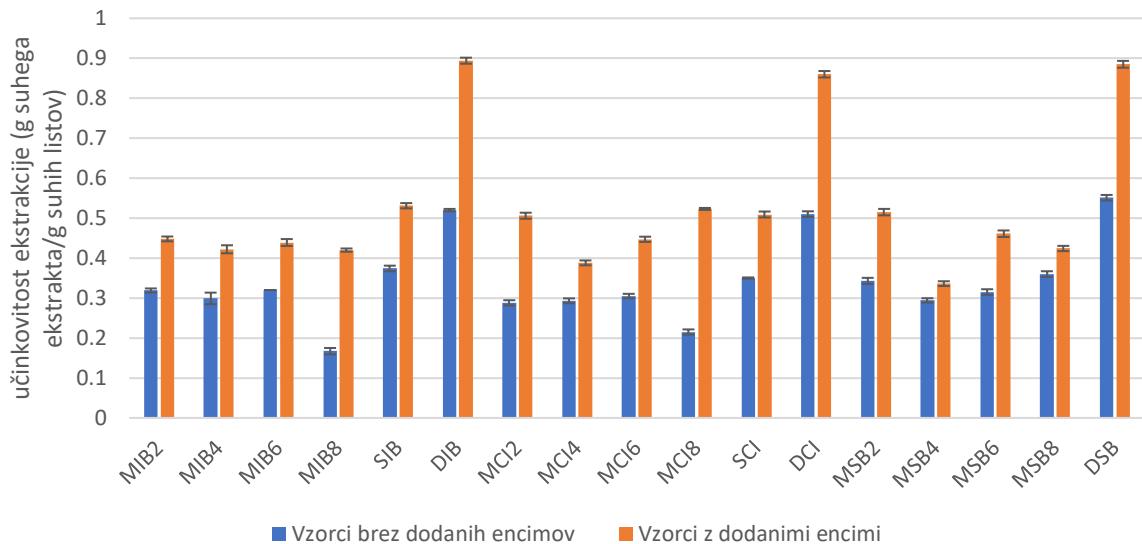
4. Rezultati in interpretacija

Tabela 6: Seznam okrajšav

Okrajšava	Opis vzorca	Vzorci, ki spadajo pod okrajšavo
A	Vodni ekstrakti oljčnih listov (mešanje ali stresanje)	MIBK2/4/6/8, MCIK2/4/6/8, MSBK2/4/6/8, SIBK, SCIK, SSBK
HE	Vodni ekstrakti oljčnih listov (mešanje ali stresanje) z dodanimi encimi	MIBE2/4/6/8, MCIE2/4/6/8, MSBE2/4/6/8, SIBE2/4/6/8, SCIE2/4/6/8, SSBE2/4/6/8
SDA	Ekstrakti oljčnih listov v simulirani prebavi (brez encimov)	IBK po ustih, CIK po ustih, SBK po ustih, IBK po želodcu, CIK po želodcu, SBK po želodcu, DIBK, DCIK, DSBK
SDHE	Ekstrakti oljčnih listov v simulirani prebavi (z dodanimi encimi)	IBE po ustih, CIE po ustih, SBE po ustih, IBE po želodcu, CIE po želodcu, SBE po želodcu, DIBE, DCIE, DSBE

4.1. Učinkovitost ekstrakcije

Učinkovitost ekstrakcije smo izrazili kot maso suhega ekstrakta (g) na maso suhih listov (g).



Slika 11: Učinkovitost ekstrakcije vodotopnih spojin. Graf prikazuje učinkovitost ekstrakcije, izraženo kot maso suhega ekstrakta (g) na maso suhih listov (g). Podatki so povprečja $\pm SD$ ($n = 3$).

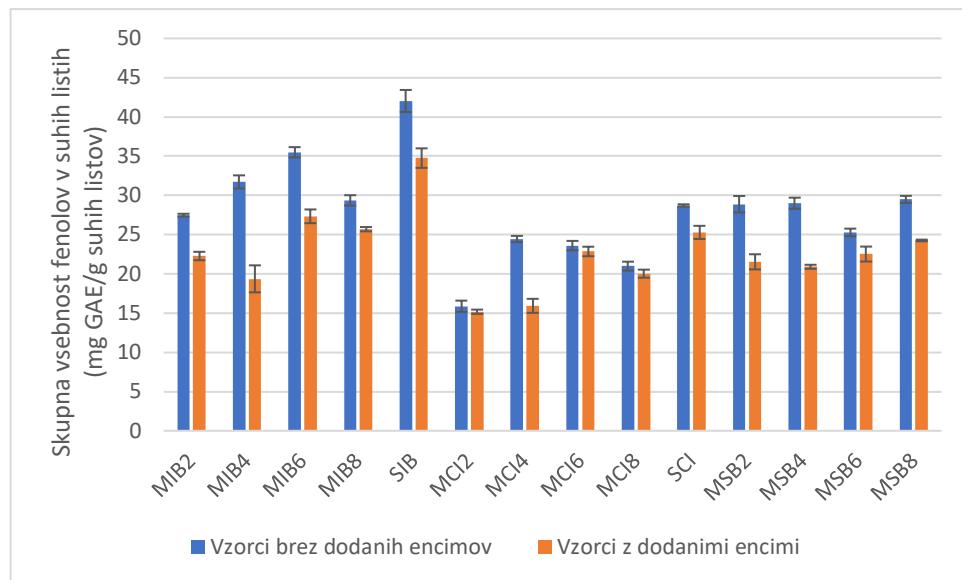
Na sliki 11 lahko opazimo štiri trende učinkovitosti ekstrakcije.

1. Najmanjša učinkovitost ekstrakcije (v povprečju 0,19 g/g suhih listov) je pri pH 8 pri sortah Itrska belica (november 2020) in Cipressino (avgust 2021).
2. Učinkovitost ekstrakcije vzorcev A s stresanjem je višja (povprečno 0,36 g/g suhih listov) kot pri vzorcih A z mešanjem (povprečno 0,29 g/g suhih listov), pri vzorcih SDA pa je učinkovitost ekstrakcije še višja (povprečno 0,53 g/g suhih listov) kot pri vzorcih A s stresanjem.
3. Učinkovitost ekstrakcije vzorcev HE je pri vseh sortah ne glede na pogoje ekstrakcije višja kot pri vzorcih A, z več kot 85-odstotno učinkovitostjo ekstrakcije vzorcev HE po končani simulaciji prebave.

Višjo učinkovitost ekstrakcije pri vzorcih HE kot pri vzorcih A je mogoče pojasniti z delovanjem celulaze in hemicelulaze v dodanih encimskih kapsulah na razgradnjo celuloze in hemiceluloze v celičnih stenah oljčnih listov. Veliko večjo učinkovitost ekstrakcije, opaženo pri vseh treh HE-jih po končani simulaciji prebave, bi lahko pripisali daljšemu času ekstrakcije. To bi lahko omogočilo dodanim hidrolitičnim encimom, da razgradijo več rastlinskih celic in tako povečajo učinkovitost ekstrakcije.

4.2. Skupna vsebnost fenolnih spojin

Skupna vsebnost fenolnih spojin (SVF) je bila izražena kot ekvivalent mase galne kisline (mg) na maso suhih listov (g).



Slika 12: SVF v suhih listih (metodi mešanja in stresanja). Izražena kot ekvivalent mase (mg) galne kisline na maso (g) suhih listov. Podatki so povprečja ± SD (n = 3).

Skupna vsebnost fenolnih spojin v vzorcih A je padala v naslednjem vrstnem redu: Itrska belica, november 2020 (od 29,4 mg GAE/g suhih listov do 42,0 mg GAE/g suhih listov) > Itrska belica, april 2015 (od 25,3 mg GAE/g suhih listov do 29,5 mg GAE/g suhih listov) > Cipressino, avgust 2021 (od 15,9 mg GAE/g suhih listov do 28,7 mg GAE/g suhih listov).

Najpogosteje uporabljeno topilo za ekstrakcijo fenolnih spojin iz oljčnih listov je etanol. SVF v naših ekstraktih smo primerjali s podatki o SVF iz drugih študij, v katerih je bil kot topilo za ekstrakcijo fenolnih spojin uporabljen etanol. Cifá in sodelavci (1) so iz Itrske belice v postopku ekstrakcije s 70-odstotnim etanolom ekstrahirali 32,7 mg GAE/g suhih listov. Nicolì in sodelavci (50) so s 60-odstotnim etanolom iz Cipressina ekstrahirali približno 23 mg GAE/g suhih listov. V primerjavi z omenjenimi študijami smo z vodo kot topilom uspeli ekstrahirati podobne in večje količine skupnih fenolnih spojin iz obeh sort (od 25,3 mg GAE/g suhih listov (Itrska belica 2015) do 42,0 mg GAE/g suhih listov (Itrska belica 2020)). Ta primerjava kaže, da je voda odlično alternativno topilo.

Dodajanje mešanice hidrolitičnih encimov je imelo zanimiv učinek na SVF.

Na splošno je mogoče ugotoviti, da je SVF v vseh vzorcih A višja kot v vzorcih HE ne glede na sorto. Največje razlike med HE in As so bile opažene pri pH 4, in sicer:

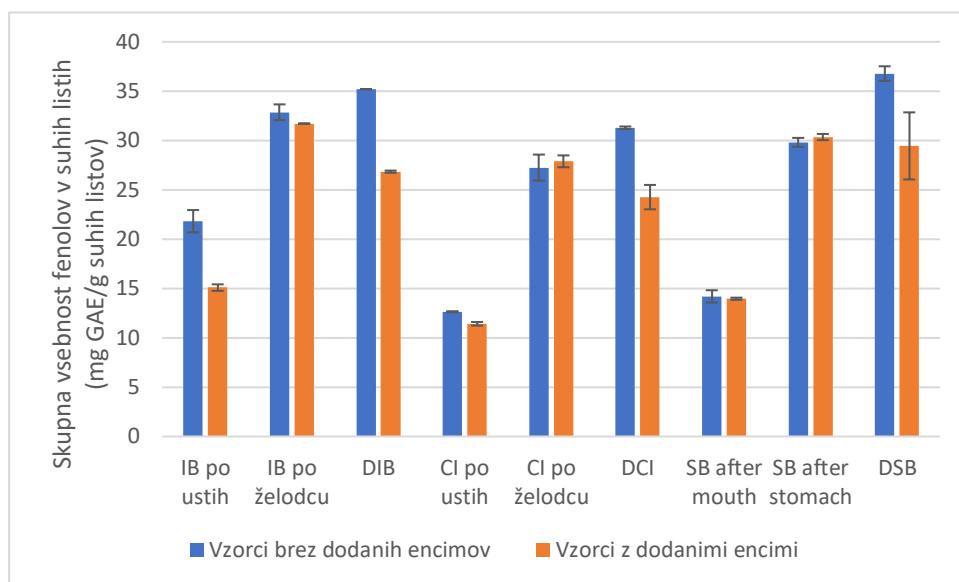
Δ8,1 mg GAE/g suhih listov v Itrski belici, april 2015; Δ8,5 mg GAE/g suhih listov v Cipressinu, avgust 2021 in Δ12,4 v Itrski belici, november 2020.

Opažena nižja SVF v HE na splošno bi lahko bila posledica encimske hidrolize. Ta trend so opisali tudi Yuan in dr. (14). Dokazali so, da lahko hidrolitični encimi, kot so β -glukozidaza, hemicelulaza, tanaza, nevtralna proteaza, celulaza, glukoamilaza, papain, alkalna proteaza,

amilaza in β -glukanaza, hidrolizirajo olevropein v hidroksitirozol, pri čemer hemicelulaza in celulaza omogočata najvišjo stopnjo razgradnje.

Njihova raziskava je pokazala tudi, da ima hemicelulaza encimsko aktivnost med pH 4 in 6, kar bi lahko pojasnilo največji padec SVF pri pH 4 na *sliki 12*.

Ne glede na čas zbiranja in starost listov je bila v obeh sortah ugotovljena podobna SVF. To kaže na dobro dolgoročno stabilnost vzorcev oljčnih listov v obliki prahu, kar je odlična informacija za uporabo te biomase. Sestavine, ki jih je mogoče pred ekstrakcijo dolgo skladiščiti, so dragocena prednost za proizvodnjo prehranskih dopolnil ali pridobivanje funkcionalnih spojin.



Slika 13: SVF v suhih listih (neprekinjena simulacija prebavnega sistema). Izražena kot ekvivalent mase (mg) galne kisline na maso (g) suhih listov. Podatki so povprečja $\pm SD$ ($n = 3$).

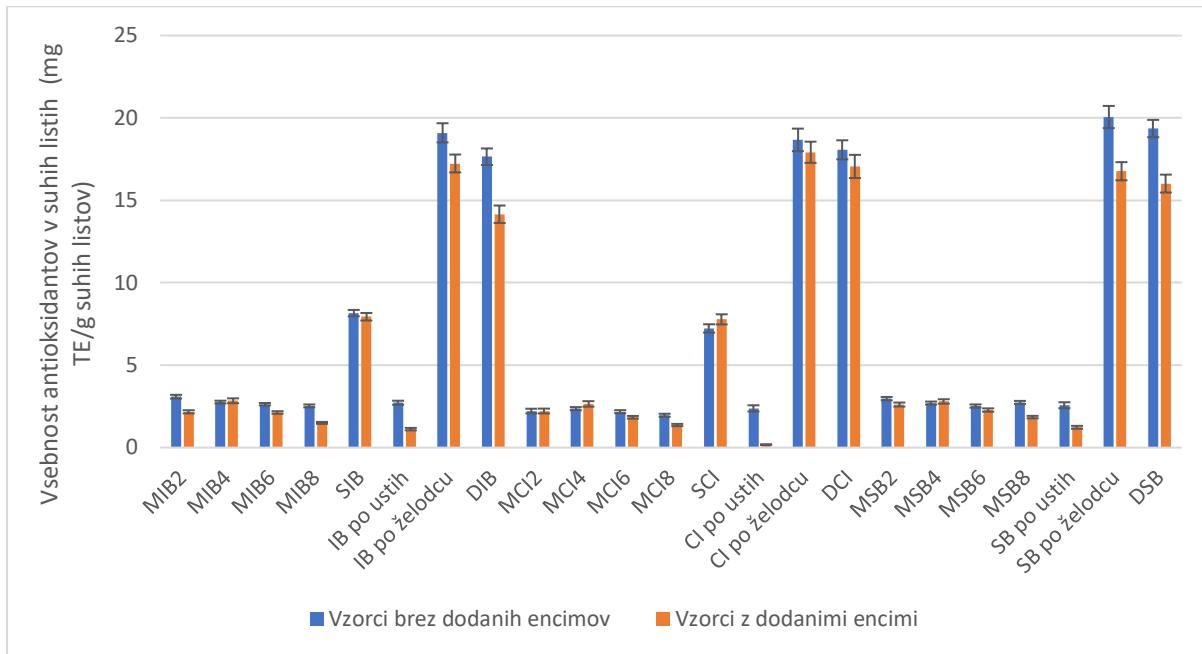
SVF v vzorcih *SDA* je v vrstnem redu: Istrska belica, november 2020 (od 21,8 mg GAE/g suhih listov do 35,2 mg GAE/g suhih listov) > Istrska belica, april 2015 (od 14,2 mg GAE/g suhih listov do 36,8 mg GAE/g suhih listov) > Cipressino, avgust 2021 (od 12,6 mg GAE/g suhih listov do 31,3 mg GAE/g suhih listov) (*slika 13*).

V simuliranem prebavnem sistemu je bila v vzorcih *SDHE* določena višja SVF kot v *SDA*, pri čemer je bila najvišja SVF v Istrski belici, november 2020.

Ugotovili smo, da Istrska belica iz leta 2015 še vedno vsebuje razmeroma veliko fenolnih spojin, kar je lahko presenetljivo zaradi starosti listov, kar kaže na dobro dolgoročno stabilnost polifenolov, če so shranjeni v obliki suhega prahu pri sobni temperaturi.

Vidimo, da se vsebnost fenolnih spojin v vzorcih brez encimov povečuje, medtem ko se vsebnost fenolnih spojin v vzorcih z encimi med drugo in tretjo fazo zmanjšuje.

4.3. Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo DPPH



Slika 14: Antioksidativna aktivnost oljčnih listov, izražena kot ekvivalent mase (mg) Troloksa na maso (g) suhih listov. Podatki so povprečja \pm SD ($n = 3$).

Rezultati kažejo, da imajo izvlečki po simulirani prebavi največjo antioksidativno učinkovitost, in sicer od 19,1 mg TE/g suhih listov (Cipressino, avgust 2021) do 20,1 mg TE/g suhih listov (Istrska belica, november 2020).

Tudi ekstrakti, ekstrahirani s stresanjem, imajo veliko večjo antioksidativno učinkovitost (v povprečju 7,8 mg TE/g suhih listov) kot ekstrakti, ekstrahirani z magnetnim mešalom (v povprečju 2,4 mg TE/g suhih listov).

Drastično povečanje antioksidativne učinkovitosti v vzorcih SD je mogoče pojasniti s časom ekstrakcije. SD smo ekstrahirali 280 minut (povprečno 17,7 mg TE/g suhih listov) v primerjavi z drugimi ekstrakti, ki smo jih ekstrahirali le 90 minut (povprečno 2,4 mg TE/g suhih listov) in ekstrakti, ki so šli skozi prvo fazo simulirane prebave in so bili tako ekstrahirani le 10 minut (povprečno 1,7 mg TE/g suhih listov).

Rahlo zmanjšanje antioksidativne učinkovitosti je mogoče opaziti med drugo in tretjo fazo simulirane prebave, po 280 minutah celotne ekstrakcije in končnem pH 8. To je lahko posledica alkalnega okolja, v katerem hidrolitični encimi niso aktivni.

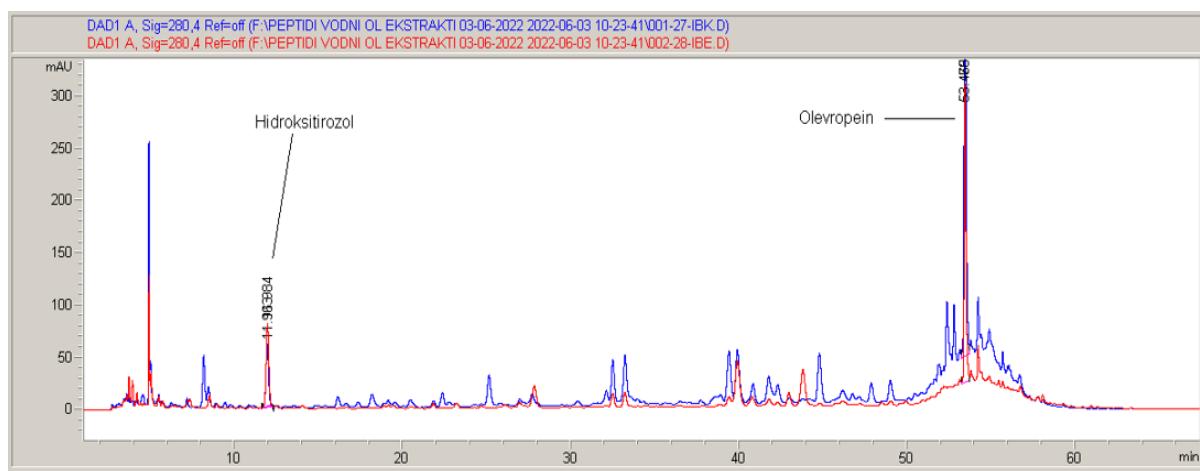
Čeprav se je SVF od druge do tretje faze simulirane prebave vzorcev SDA povečala, se je antioksidativna aktivnost zmanjšala. To bi lahko bila posledica razgradnje polifenolov v fenolne spojine z manjšo antioksidativno učinkovitostjo. Ker je antioksidativna učinkovitost odvisna od kvalitativnih značilnosti fenolnih spojin in ne le od skupne vsebnosti fenolnih spojin, bomo te ekstrakte nadalje analizirali s HPLC.

V vsakem izvlečku z dodanimi encimi lahko opazimo zmanjšanje antioksidativne aktivnosti v primerjavi z izvlečkom brez encimov. To bi lahko pomenilo, da so dodani hidrolitični encimi reagirali s fenolnimi spojinami v oljčnih listih, pri čemer so nastale spojine, ki niso fenolne, saj smo pri dodajanju hidroliznih encimov v oljčne liste opazili tudi zmanjšanje vsebnosti totalni fenolni vsebnosti. Nastali produkti hidrolize fenolnih spojin v oljčnih listih

imajo zato manjšo antioksidativno učinkovitost. To kaže, da dodajanje hidroliznih encimov ni smiselno za namen izboljšanja antioksidativne učinkovitosti.

Med antioksidativnimi aktivnostmi je bilo mogoče opaziti tri glavne tende; najnižjo antioksidativno aktivnost (v razponu od 1,4 mg TE/g suhih listov do 3,1 mg TE/g suhih listov) so imeli vzorci, ekstrahirani z mešanjem, ki se je izboljšala s stresanjem (7,8 mg TE/g suhih listov), največja pa je bila po simulirani prebavi (17,7 mg TE/g suhih listov).

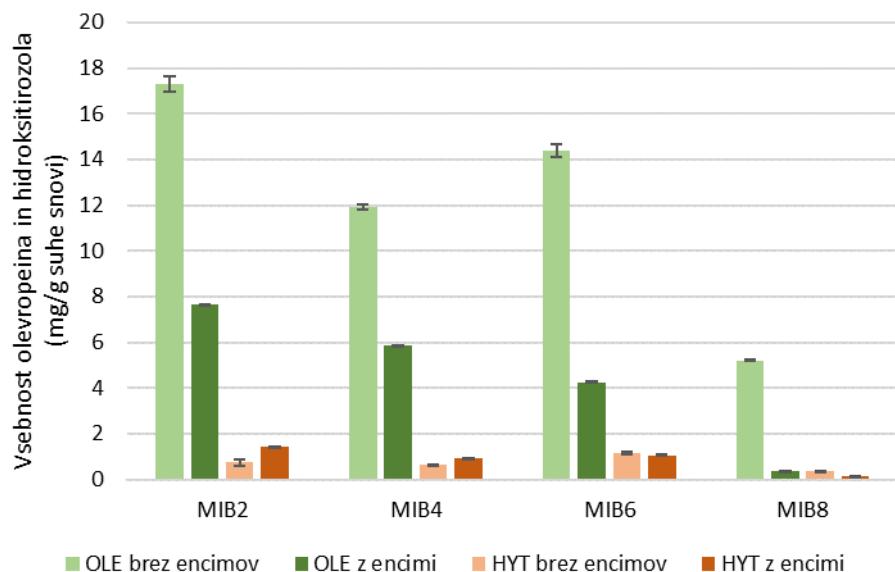
4.4. HPLC-analiza vsebnosti hidroksitirozola in olevropeina



Slika 15: Primer kromatogramov separacije spojin iz vodnega ekstrakta oljčnih listov Istrske belice, pripravljenega z 90 min mešanjem na magnetnem mešalu v ultračisti vodi pri pH 4,0. Modra krivulja predstavlja kromatogram separacije spojin iz vodnega ekstrakta

Vsebnost hidroksitirozola in olevropeina smo določili v vodnih ekstraktih oljčnih listov Istrske belice, pripravljenih z 90 min mešanjem pri 37 °C na magnetnem mešalu v ultračisti vodi pri

pH 2, 4, 6 in 8 in izrazili vsebnosti kot mg hidroksitirozola/g suhe snovi oljčnih listov in mg olevropeina/g suhe snovi oljčnih listov.



Slika 16: Vsebnost olevropeina (OLE) in hidroksitirozola (HYT) v ekstraktih oljčnih listov Istarske belice, pripravljenih z 90 min mešanjem pri 37 °C na magnetnem mešalu v ultračisti vodi pri pH 2 (MIB2), pH 4 (MIB4), pH 6 (MIB6) in pH 8 (MIB8) brez in z dodatkom hidrolitičnih encimov

Preliminarni rezultati HPLC-analize nakazujejo, da je bila v vseh ekstraktih brez dodanih hidrolitičnih encimov določena bistveno višja vsebnost olevropeina, najvišja pri pH 2 (17,3 mg/g) in najnižja pri pH 8 (5,2 mg/g). Vsebnost olevropeina se z dodatkom hidrolitičnih encimov opazno zniža pri vseh pH-vrednostih in je najnižja pri pH 8. Vsebnost olevropeina se z dodanimi encimi zniža za 2-krat do 3-krat v smeri pH 2, 4 in 6, pri pH 8 pa se vsebnost olevropeina zniža za več kot 10-krat. Nekoliko višje vsebnosti hidroksitirozola so opazne v ekstraktih pri pH 2 in 4 z dodanimi hidrolitičnimi encimi v primerjavi brez encimov, bistvene razlike pri pH 6 ni opaziti, nižja vsebnost hidroksitirozola pa je določena v ekstraktu z dodanimi encimi pri pH 8.

Navedeni rezultati so lahko posledica encimske razgradnje olevropeina. Slednji namreč ob dodatku določenih encimov (esteraz, ksilanaz, celulaz, hemicelulaz in β -glukozidaz) razпадa na glukozo, olevropein-aglikon, hidroksitirozol in elenolno kislino.(51) To bi lahko razložilo tudi razliko v razmerju razpadlega olevropeina in nastalega hidroksitirozola – analizirali smo le ti dve spojini, v prihodnje pa bi bilo dobro določiti tudi vsebost drugih razgradnih produktov olevropeina, kot je že omenjena elenolna kislina. Način ekstrakcije, uporabljen v tej nalogi, bi lahko bil koristen za pridobivanje hidroksitirozola in potencialno tudi drugih fenolnih spojin iz oljčnih listov, kot je elenolna kislina, katere vsebnost pa je še potrebno analizirati. Nadaljnje raziskave bi bile potrebne na področjih različnih razmerij med oljčnimi listi in koncentracijo hidrolitičnih encimov, času ekstrakcije in uporabi bolj tarčnih hidrolitičnih encimov.

5. Ekonomski načrt (potencialna uporaba/aplikacija)

Uporaba oljčnih listov ponuja izjemno gospodarsko priložnost, med drugim na področju prehranskih dopolnil, pri čemer se približuje načelom ničelne količine odpadkov (zero waste principle) in ničelnega ogljičnega odtisa (zero carbon footprint).

5.1. Analiza trga:

Na slovenskem trgu že obstajajo prehranska dopolnila iz oljčnih listov, vendar so vsa uvožena iz drugih držav. Če bi prehranska dopolnila proizvajali tukaj v Sloveniji, bi lahko kupcem ponudili izdelke z nižjo ceno in boljšim vplivom na okolje. Poleg tega udomačena sorta, ki jo gojimo v Sloveniji (Istarska belica), izkazuje visoko vsebnost bioaktivnih spojin, zato je lahko zanimiva sestavina tudi za tuje proizvajalce prehranskih dopolnil in funkcionalnih živil.

Številni izdelki, ki smo jih našli na trgu, trdijo, da vsebujejo 20 % olevropeina, pri čemer imajo suhi oljčni listi od 6 do 9 % olevropeina.(52) Več vpogleda v to bomo dobili z analizo vsebnosti olevropeina v izvlečkih oljčnih listov, ki bo opravljena konec junija. Vsekakor bi lahko liste uporabili kot dodatek brez kemične obdelave, tako da bi naredili kapsule, ki bi vsebovale približno 8 % olevropeina. To bi se kazalo v manjši antioksidativni učinkovitosti na maso, vendar bi to nadomestili z večjimi kapsulami, tako da bi bila vsebnost olevropeina v naših kapsulah enaka kot v drugih (20 %) kapsulah na trgu.

5.2. Proces priprave

5.2.1. Transport

Oljčne liste je potrebno najprej prepeljati v proizvodni obrat v bližini oljčnih nasadov, s čimer bi poskušali čim bolj zmanjšali emisije/izpuste plinov in stroške prevoza.

5.2.2. Mletje

Nato je potrebno oljčne liste je zmleti v industrijskem mlinu (na primer v industrijskem avtomatskem mlinu Grinder - cena od 2.000 USD), da nastane fin prah, podoben začimbam..

5.2.3. Pakiranje

Prah oljčnih listov je treba zapakirati - v obliko kapsul ali tablet. Izbrali smo kapsule, da bi prikrili grenak okus oljčnih listov v prahu. Kapsule bi izdelali iz 500 mg oljčnih listov (priporočen dnevni vnos), pri čemer bi uporabili rastlinske kapsule velikosti 0, in s tem omogočili uporabo izdelka tudi veganom in vegetrijancem (0,012 USD na kos). Za kapsuliranje bi uporabili polavtomatski stroj za polnjenje kapsul, ki bi stal 14.100 USD.

5.3. Poslovni načrt in ekonomija

Če bi zbrali le 2% vse listne biomase oljk v Sloveniji (8,2 tone, pri čemer bi lahko uporabili približno 2/3 listov (5500 kilogramov)), bi lahko naredili 11.000.000 kapsul (ker kapsule z 20 % olevropeina tehtajo 200 mg, kapsule s 6-9 % olevropeina pa bi morale tehtati približno 500 g, obe pa bi vsebovali 10 mg olevropeina). Kapsule se lahko prodajajo v pakiranjih po 60 kapsul, kar pomeni 183 000 pakiranj. Prodajali bi jih lahko po ceni 9 USD (nižje od trenutne tržne cene), s čimer bi letno zaslužili več kot 1.650.000 USD, od česar je treba odšteti že znane

stroške strojev in kapsul (132.000 USD) ter druge stroške (infrastruktura, delavci, prevoz, pakiranje ...).

Zaradi grenkobe in potrebe po mletju je oljčne liste bolje prodajati kot prehransko dopolnilo in ne v obliku čistega prahu.

6. Sklepi

V naši raziskavi smo ugotovili, da je voda ustrezna alternativa za ekstrakcijo fenolnih spojin iz listov oljk sort Itrska belica in Cipressino. Ugotovili smo, da je SVF ob raztopljanju v vodi višja ali primerljiva raztopljanju v etanolu (za sorte Cipressino in Itrska belica).

Vsebnost fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost sta se po encimski hidrolizi s komercialno dostopno mešanico hidrolitičnih encimov zmanjšali, po drugi strani pa se je ekstrakcijski izkoristek vodotopnih snovi v prisotnosti hidrolitičnih encimov povečal. To nakazuje, da bi bilo potrebno poleg fenolnih spojin in antioksidativne učinkovitosti analizirati tudi druge vodotopne snovi.

Sistem ekstrakcije s simulirano prebavo je omogočil 10-krat večjo antioksidativno učinkovitost kot katera koli druga uporabljena metoda ekstrakcije. Slednja ugotovitev kaže, da iz vidika antioksidativne učinkovitosti ni potrebe po pripravi kakršnih koli izvlečkov iz oljčnih listov, saj lahko človeški prebavni sistem ekstrahira desetkrat več antioksidantov, tudi ob prisotnosti hidrolitičnih encimov. To pomeni, da bi bila priprava prehranskih dopolnil iz oljčnih listov zelo enostavna in poceni. Na podlagi naših ugotovitev bi lahko bilo koristno tudi dodajanje prebavnih encimov za osebe z oslabljenim delovanjem črevesja, vendar bi morali biti ti encimi bolj podobni tistim v našem prebavnem sistemu. Seveda pa se zavedamo, da bi bilo potrebno to nadalje raziskati na bolj izpopolnjenih in vitro modelih prebavnega sistema.

Pri pripravi prehranskih dopolnil iz oljčnih listov je treba upoštevati čas nabiranja oljčnih listov in sorte. Ugotovili smo, da oljčni listi Itrske belice, obrani aprila 2015, po sedmih letih še vedno ohranjajo primerljivo skupno vsebnost fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost z nedavno nabranimi listi. To je praktično, saj jih je mogoče pred pripravo za prehranska dopolnila dolgo skladiščiti.

Naše raziskave s HPLC-sistemom nakazujejo, da se vsebnost olevropeina zniža ob dodatku dotedne mešanice hidrolitičnih encimov in navedenih pogojih, vsebnost hidroksitirozola pa se poviša. Ta ugotovitev bi lahko bila potencialno koristna za pridobivanje hidroksitirozola iz oljčnih listov.

Za bolj natančne rezultate naših analiz bi bilo potrebno nadaljevati raziskave z različnimi razmerji med hidrolitičnimi encimi in oljčnimi listi v ekstraktih, namesto uporabe mešanice hidrolitičnih encimov pa bi bilo bolje uporabiti bolj tarčne encime. V naši raziskavi smo uporabili mešanico, ki je bila dostopna na trgu in s tem primerna za dijaško raziskovalno nalogo.

Viri

1. Cifá D, Skrt M, Pittia P, Di Mattia C, Poklar Ulrih N. Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition*. 2018;6(4):1128-1137.
2. Oljkarstvo | GOV.SI [Internet]. Portal GOV.SI. 2022 [cited 14 April 2022]. Available from: <https://www.gov.si/teme/oljkarstvo>
3. olive | Description, Production, & Oil [Internet]. Encyclopedia Britannica. 2019 [cited 14 April 2022]. Available from: <https://www.britannica.com/plant/olive-plant>
4. Olive Classification | The Olive Oil Source [Internet]. Oliveoilsource.com. 2022 [cited 30 June 2022]. Available from: <https://www.oliveoilsource.com/page/olive-classification>
5. Vesel V, Bandelj D, Butinar B, Bešter E, Fantinič J, Fičur K et al. Ohranjanje, vrednotenje, karakterizacija in zbiranje genskih virov oljk. Koper: Znanstveno-raziskovalno središče, Annales ZRS; 2019.
6. Olivo Frangivento (Cipressino): Características del árbol y el aceite [Internet]. Variedades de Olivo y Cerezo (características, plagas, viveros, precios...). 2019 [cited 10 April 2022]. Available from: <https://excelentesprecios.com/olivo-frangivento-cipressino>
7. Stare D, Ščap Š, Mihelič R, Mavšar S, Mešl M, Osojnik Črnivec I et al. Ovrednotenje in karakterizacija biomase. [Internet]. 2020 [cited 14 April 2022];. Available from: <https://dirros.openscience.si/lzpisGradiva.php?id=13765&lang=eng>
8. Espeso J, Isaza A, Lee J, Sørensen P, Jurado P, Avena-Bustillos R et al. Olive Leaf Waste Management. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2021;5.
9. Primožič L. InnoRenew CoE - Kaskadna biorefinerija izdelkov iz oljčnih listov: od neuporabljene biomase v primarnem sektorju do prilagojenih rešitev za uporabo na mednarodnem trgu z visoko dodano vrednostjo (OLEAF4VALUE) [Internet]. InnoRenew CoE. 2021 [cited 10 April 2022]. Available from: <https://innorennew.eu/sl/project/kaskadna-biorefinerija-izdelkov-iz-oljcnih-listov-od-neuporabljene-biomase-v-primarnem-sektorju-prilagojenih-resitev-za-uporabo-na-mednarodnem-trgu-z-visoko-dodano-vrednostjo-olead4value/>
10. Podgornik M, Bučar-Miklavčič M, Levart A, Salobir J, Rezar V, Poklar Ulrih N et al. Možnosti uporabe ostankov proizvodnje v oljkarstvu. Koper: Znanstveno-raziskovalno središče, Annales ZRS; 2019.
11. Ningsih I, Zulaikhah S, Hidayat M, Kuswandi B. Antioxidant Activity of Various Kenitu (*Chrysophyllum Cainito* L.) Leaves Extracts from Jember, Indonesia. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2016.
12. Markhali F, Teixeira J, Rocha C. Olive Tree Leaves—A Source of Valuable Active Compounds. *Processes*. 2020.
13. Panzella L, Moccia F, Nasti R, Marzorati S, Verotta L, Napolitano A. Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7.

14. Yuan J, Wang C, Ye J, Tao R, Zhang Y. Enzymatic Hydrolysis of Oleuropein from *Olea europaea* (Olive) Leaf Extract and Antioxidant Activities. *Molecules*. 2015;20(2):2903-2921.
15. Haris Omar S. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*. 2010;78(2):133-154.
16. Oleuropein [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2022 [cited 14 April 2022]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleuropein>
17. Butinar B, Bučar-Miklavčič M, Bešter E, Valenčič V. Oleuropein in biofenoli v oljčnih listih. In: Bandelj D, Podgornik M, Arbeiter A, editors. Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu. Koper: Univerzitetna založba Annales; 2012. p. 151-69
18. López de las Hazas M, Piñol C, Macià A, Romero M, Pedret A, Solà R et al. Differential absorption and metabolism of hydroxytyrosol and its precursors oleuropein and secoiridoids. *Journal of Functional Foods*. 2016;22:52-63.
19. Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémesy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002;56(6):276-282.
20. pH of Saliva [Internet]. Healthline. 2022 [cited 11 April 2022]. Available from: <https://www.healthline.com/health/ph-of-saliva?msclkid=48cc693db9b511ec85b77f47432fb239#risks>
21. Iorgulescu G. Saliva between normal and pathological. Important factors in determiningsystemic and oral health [Internet]. PubMed Central (PMC). 2009. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5052503/>
22. Mudie D, Murray K, Hoad C, Pritchard S, Garnett M, Amidon G et al. Quantification of Gastrointestinal Liquid Volumes and Distribution Following a 240 mL Dose of Water in the Fasted State. *Molecular Pharmaceutics*. 2014;11(9):3039-3047.
23. Li C, Yu W, Wu P, Chen X. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;96:114-126.
24. Stomach pH | Small Intestinal pH | Digestion pH [Internet]. Gastrodigestivesystem.com. 2022 [cited 5 July 2022]. Available from: <http://gastrodigestivesystem.com/digestion/digestion-ph#:~:text=In%20the%20small%20intestine%2C%20the%20pH%20is%20basic,7.2%20that%20is%20near%20neutral%20or%20mildly%20acidic%2Fbasic.?msclkid=a5c965a1b9b811ec8578be695df1c24a>
25. How Long Does It Take For Your Stomach to Empty? [Internet]. Healthline. 2022 [cited 5 July 2022]. Available from: <https://www.healthline.com/health/how-long-does-it-take-for-your-stomach-to-empty#time-in-stomach>
26. Patel K, Thavamani A. Physiology, Peristalsis [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556137/>
27. Owen C. SERINE PROTEINASES. Encyclopedia of Respiratory Medicine. 2006;:1-10.
28. Wijeratnam S. Pineapple. Encyclopedia of Food and Health. 2016;:380-384.
29. lactase | Definition, Function, & Facts [Internet]. Encyclopedia Britannica. 2022 [cited 14 April 2022]. Available from: <https://www.britannica.com/science/lactase>

30. Uzuner S, Cekmecelioglu D. Enzymes in the Beverage Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*. 2019;:29-43.
31. Hou C, Shimada Y. Lipases. *Encyclopedia of Microbiology*. 2009;:385-392.
32. Alpha-galactosidase - Wikipedia [Internet]. En.wikipedia.org. 2022 [cited 14 April 2022]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-galactosidase>
33. Yi Y. Tiny bugs play big role. *Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production*. 2021;:113-136.
34. Ramos O, Malcata F. Food-Grade Enzymes. *Comprehensive Biotechnology*. 2011;:555-569.
35. López-Otín C, Bond J. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(45):30433-30437.
36. Bajpai P. Sources, Production, and Classification of Xylanases. *Xylanolytic Enzymes*. 2014;:43-52.
37. Mettler Toledo® - HE53 - \$2,617.00 - FREE SHIPPING - Affordablescales.com [Internet]. Affordablescales.com. 2022 [cited 14 April 2022]. Available from: <https://www.affordablescales.com/mettler-toledo/he/he53.asp>
38. What is a Moisture Analyser? | What is Moisture Analysis? | Precisa [Internet]. Precisa. 2022 [cited 10 April 2022]. Available from: <https://www.precisa.co.uk/what-is-a-moisture-analyser/#:~:text=A%20Moisture%20Analyser%2C%20which%20is%20also%20refered%20to,by%20using%20the%20E2%80%98loss%20on%20drying%E2%80%99%20%28LOD%29%20method.?msclkid=1e310a03b7de11ec93ef77233d74efa8>
39. Repair S. HP Agilent 8453 UV/Vis Spectrophotometer G1103A with Single Cell Holder | Scientific Equipment Repair [Internet]. Scientific-equipment.com. 2022 [cited 14 April 2022]. Available from: <http://www.scientific-equipment.com/equipment-for-sale/spectrophotometers-uv-vis/8453-uv-vis-spectrophotometer-g1103a-with-single-cell-holder?ln=3375>
40. Foist L. [Internet]. 2022 [cited 11 April 2022]. Available from: <https://study.com/academy/lesson/spectrophotometer-definition-uses-parts.html>
41. McMahon M. What is Spectrophotometer Calibration? (with pictures) [Internet]. All the Science. 2022 [cited 11 April 2022]. Available from: <https://www.allthesience.org/what-is-spectrophotometer-calibration.htm>
42. Clark J. The Beer-Lambert Law [Internet]. Chemistry LibreTexts. 2022 [cited 11 April 2022]. Available from: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/The_Beer-Lambert_Law?msclkid=7b50c143be6911ecba09dbb2eeb20286](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/The_Beer-Lambert_Law?msclkid=7b50c143be6911ecba09dbb2eeb20286)
43. reserved M. S20 SevenEasy™ pH [Internet]. Mt.com. 2022 [cited 14 April 2022]. Available from: https://www.mt.com/au/en/home/phased_out_products/PhaseOut_Ana/S20_pH_meter.html
44. Woodford C. [Internet]. 2022 [cited 10 April 2022]. Available from: <https://www.explainthatstuff.com/how-ph-meters-work.html>

45. Mackie A, Mulet-Cabero A, Torcello-Gómez A. Simulating human digestion: developing our knowledge to create healthier and more sustainable foods. *Food & Function*. 2020;11(11):9397-9431.
46. File:Digestive system diagram sk.svg - Wikimedia Commons [Internet]. Commons.wikimedia.org. 2022 [cited 14 April 2022]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Digestive_system_diagram_sk.svg
47. Schaich K. Analysis of Lipid and Protein Oxidation in Fats, Oils, and Foods. *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. 2016;:1-131.
48. Cortés-Herrera C, Artavia G, Leiva A, Granados-Chinchilla F. Liquid Chromatography Analysis of Common Nutritional Components, in Feed and Food. *Foods*. 2018;8(1).
49. Škrovánková S, Mišurcová L, Machů L. Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Advances in Food and Nutrition Research* Volume 67. 2012;:75-139.
50. Nicolì F, Negro C, Vergine M, Aprile A, Nutricati E, Sabella E et al. Evaluation of Phytochemical and Antioxidant Properties of 15 Italian *Olea europaea* L. Cultivar Leaves. *Molecules*. 2019;24(10):1998.
51. Chatzikonstantinou A, Gkantzou E, Thomou E, Chalmpes N, Lyra K, Kontogianni V et al. Enzymatic Conversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol Using Immobilized β -Glucosidase on Porous Carbon Cuboids. *Nanomaterials*. 2019;9(8).
52. Acar-Tek N, Ağagündüz D. Olive Leaf (<i>Olea europaea L. folium</i>): Potential Effects on Glycemia and Lipidemia. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2020;76(1):10-15.
53. Slika oljčnega lista na naslovnici: Download Free Vectors, Clipart Graphics, Vector Art & Design Templates [Internet]. Vecteezy. 2022 [cited 11 April 2022]. Available from: <https://www.vecteezy.com/free-vector/ornament>