

# Učinkovitost ekstrakta komine masline u zaštiti mesa od oksidativnog kvarenja tijekom skladištenja

---

**Knežević, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:239808>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Marija Knežević**

**Učinkovitost ekstrakta komine masline u zaštiti  
mesa od oksidativnog kvarenja tijekom  
skladištenja**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2014-09-9143.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na svim savjetima i stručnoj pomoći koje su mi uvelike olakšali uspješnu izradu ovoga diplomskog rada.*

*Također se zahvaljujem i asistentici Kristini Radić na svojoj pruženoj pomoći prilikom provođenja istraživačkog dijela diplomskog rada..*

*Zahvaljujem se i asistentici Sanji Jurmanović i tehničarki Gordani Blažinić sa „Zavoda za kemiju prehrane“ koje su mi omogućile sve potrebne uvjete za izradu diplomskog rada.*

*Isto tako, zahvalila bih se svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali ovo iskustvo.*

*Naposljetku, najveće zahvale idu mojoj obitelji koji su mi bili podrška, kako u životu, tako i tijekom cijelog studiranja.*

## KRATICE

3,4-DHPEA- 3,4-dihidroksifeniletanol

3,4-DHPEA-EA - oleuropein-aglikon-mono-aldehid

3,4-DHPEA-EDA - oleuropein aglikon di-aldehid

BHA - butilhidroksianisol

BHT - butilhidroksitoluen

GC - plinska kromatografija

HNE - hidroksialkenal 4-hidroksinonenal

$\text{HO}_2^\bullet$  - hidrosiperoksilni radikal

HP- $\beta$  - ekstrakt koline masline pripremljen s hidrosipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

$\text{LO}^\bullet$  - lipidni alkoksilni radikal

$\text{LOO}^\bullet$  - lipidni peroksilni radikal

LOOH - lipidni hidroperoksid

MDA - malondialdehid

$\text{OH}^\bullet$  - hidroksilni radikal

$\text{O}_2^-$  - superoksidni radikal

PUFA - polinezasićene masne kiseline

RAMEB - nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin

$\text{RO}^\bullet$  - alkoksilni radikal

$\text{RO}_2^\bullet$  - peroksilni radikal

ROS - reaktivne kisikove specije

TBA - tiobarbiturna kiselina

TBARS - reaktivne specije tiobarbiturne kiseline

TBHQ - tert-butylhidrokinon

TEP - 1,1,3,3-tetraetoksipropan

TMP - 1,3,3 tetrametoksipropan

TXA2 - tromboksan A2

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Maslina .....	2
1.2. Maslinovo ulje i otpadni produkti .....	3
1.3. Komina masline .....	4
1.3.1. Polifenoli .....	5
1.4. Lipidna peroksidacija .....	7
1.4.1. Produkti lipidne peroksidacije.....	8
1.4.2. Malondialdehid.....	8
1.4.3. Lipidna peroksidacija u mesu.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. Materijali .....	12
3.1.1. Kemikalije .....	12
3.1.2. Instrumenti i oprema .....	12
3.1.3. Priprema ekstrakata komine masline.....	13
3.2. Test s tiobarbiturnom kiselinom.....	14
3.3. Opis istraživanja .....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	17
4.1. Modifikacija metode mjerenja antioksidativne aktivnosti u modelu mesa - optimizacija termičke obrade mesa u svrhu induciranja lipidne peroksidacije.....	17
4.2. Kalibracijska krivulja MDA .....	18
4.3. Optimizacija metode mjerenja antioksidativne aktivnosti u modelu mesa- optimizacija djelatnih koncentracija uzorka BHA .....	20
4.4. Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakta komine tokom skladištenja .....	24
4.5. Usporedba antioksidativnog učinka različitih uzoraka komine i BHA.....	28
5. ZAKLJUČAK .....	31
6. LITERATURA.....	32
7. SAŽETAK .....	36
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	

## 1. UVOD

Maslinovo ulje je prepoznato kao vrijedna namirnica te se već dugi niz godina koristi u ljudskoj prehrani. Ono predstavlja i važan izvor antioksidansa što možemo prepisati ponajviše fenolnim spojevima. Fenolni spojevi dokazano djeluju antioksidativno, antimikrobno i antiinflamatorno (Pereira i sur., 2007; Talhaoui i sur., 2015). Također je dokazano da fenolne komponente štite proteine niske gustoće od oksidacije, snižavaju krvni tlak u životinja i inhibiraju lipidnu oksidaciju (Khayyal i sur., 2002; Micol i sur., 2005; Bouaziz i sur., 2008).

Tokom proizvodnje maslinovog ulja, veliki udio fenolnih spojeva zaostaje u otpadnim produktima. Jedan od otpadnih produkata je i komina masline. Zbog visoke koncentracije amonijaka i vodotopivih soli je štetna za okoliš što predstavlja problem prilikom zbrinjavanja. Budi se veliki interes za iskorištavanjem potencijala bioaktivnih sastavnica otpada maslinovog ulja, kako u prehrambenoj tako i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, čime bi se riješio problem njihova zbrinjavanja.

Jedna od potencijalnih uporaba komine masline jeste kao prirodni antioksidans. Danas se uglavnom koriste sintetski antioksidansi poput BHA, BHT i TBHQ. Oni su efikasni, visoko stabilni i niske cijene. Ipak raste zabrinutost oko njihove potencijalne toksičnosti (Kahl i Kappus, 1993). Mane prirodnih antioksidansa iz bilja jesu manja efikasnost, veća cijena i varijabilnost sastava koja ovisi o uvjetima uzgoja biljke.

Ovaj rad se bavi istraživanjem antioksidativne aktivnosti suhog ekstrakata komine masline na modelu mesa. Lipidna oksidacija u mesu jedan je od glavnih razloga njegovog kvarenja a događa se tokom proizvodnje, prerade, distribucije i skladištenja. Radikali, prisutni u procesu oksidacije, dovode do stvaranja aldehida odgovornih za promjenu boje i okusa mesa. Kompleksan mehanizam oksidacije utječe na membranske fosfolipide i proteine mesa. Kako bi izmjerili količinu produkata lipidne peroksidacije odabrana je TBA metoda. Ona mjeri količinu formiranog malondialdehida, jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije, pomoću tiobarbiturne kiseline.

## 1.1. Maslina

Maslina (*Olea europaea* L.) je zimzelena biljka iz porodice Oleaceae. Zbog visokog postotka ulja (15 – 35 %) u plodovima, maslina je dobila ime po latinskoj riječi olea, što znači ulje. Podrijetlo masline može se pratiti do područja uz istočnu obalu Sredozemnog mora (Vossen, 2007), nakon čega je proširena prema zapadu i sjeveru Mediterana. Feničani, Grci i Rimljani su proširili tu kulturu po cijelom sredozemnom bazenu.

### Sistematika masline:

CARSTVO: Plantae

PODCARSTVO: Magnoliophyta

RAZRED: Magnoliopsida

RED: Oleales

PORODICA: Oleaceae

ROD: Olea

VRSTA: *Olea europaea* L.

Stablo masline je razgranato, naraste do 10 metara visine tvoreći nepravilno, kvrgavo deblo s mnogo grana i široku krošnjju. Korijen je vretenast, razgranat i jako razvijen. Kora je u početku glatka, sivkasta, kasnije postane hrapava i ispuca u tamne ljuske. Pupovi su prekriveni sivkastim dlakama. Listovi su nasuprotni, zimzeleni, kožnati, duguljasti, dugi 5-10 cm, široki do 2 cm, cjelovitog ruba, široki ušiljenog vrha, na naličju srebrnasto sivkasti, nalaze se na kratkim peteljka. Cvjetovi su dvospolni, jednodomni, pravilni, sitni, ugodna mirisa, skupljeni u rahle metličaste cvatove i rastu iz pazušaca listova. Plod je mesnata, jajasta koštunica, duga 1-3 cm, široka do 2 cm. U početku je zelena, dozrijevanjem postane tamno modra, crna ili smeđe zelena. Dozrijeva u rujnu i listopadu.

Maslina se uzgaja već tisućama godina i to uglavnom na Sredozemlju. Koriste se i plod i listovi. Listovi se beru tokom cijele godine a plod samo kada dozrije. List se koristi za snižavanje krvnog tlaka, šećera u krvi i kao diuretik, a nalazimo ga u dodacima prehrani, čajevima i čajnim mješavinama ([www.plantea.com.hr](http://www.plantea.com.hr)). Plod se koristi uglavnom za dobivanje maslinovog ulja, koje je osnova mediteranske dijete.

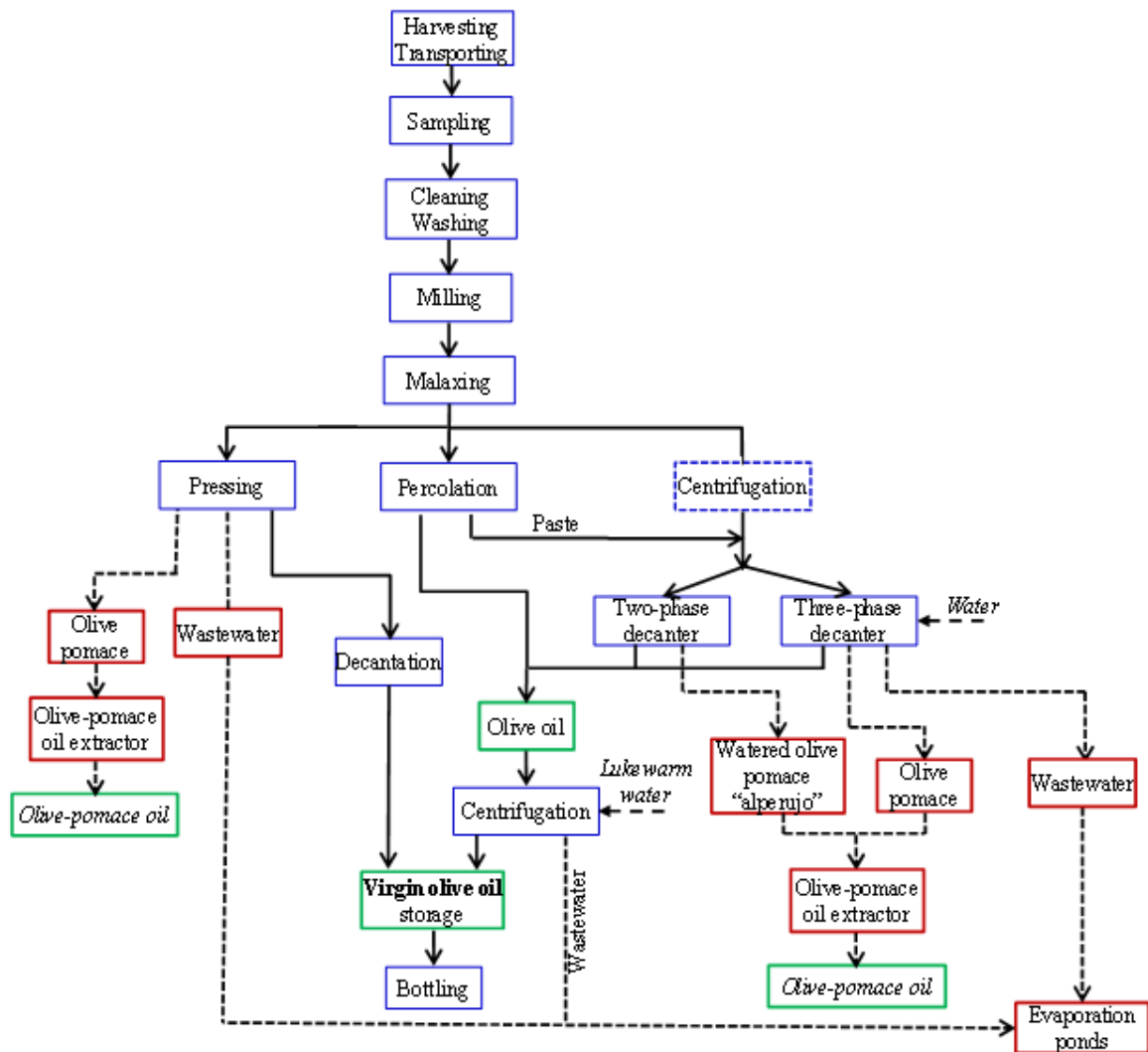


## 1.2. Maslinovo ulje i otpadni produkti

Plod masline se može podijeliti na tri dijela: epikarp (koža), mezokarp (pulpa) i drvenasti endokarp koji sadrži sjemenke. Za ekstrakciju maslinovog ulja koriste se različite tehnike koje mogu biti kontinuirane ili diskontinuirane (Slika 1.). Od diskontinuiranih se najviše koristi tradicionalno prešanje, dok su od kontinuiranih primjenjuju trofazni sistem i dvofazni sistem centrifugiranja (Nunes i sur., 2016).

Diskontinuirano prešanje je najstariji i najrašireniji način dobivanja maslinovog ulja. Prije su se koristili tradicionalni mlinovi, dok su ih danas zamijenile hidrauličke preše. Sam proces započinje mljevenjem masline u finu pastu koja se potom nanosi na diskove naslagane jedan iznad drugog u preši. Primjenom pritiska na diskove dolazi do stvaranja kompaktne čvrste faza te se tekuća faza (ulje i voda) perkolira. Prednosti ove metode su jednostavnost i cijena kao i potreba za upotrebom male količine vode (40 to 60 l/100 kg maslina). Mana procesa je diskontinuitet i visoki troškovi radne snage.

Kontinuirani načini produkcije koriste centrifugu kako bi razdvojili faze. Princip se temelji na različitoj gustoći komponenti paste maslina (maslinovo ulje, voda i netopive krutine). Koriste se dvo ili trofazni sistemi. Trofazni proces dodaje toplu vodu u svakom procesu centrifuge i time proizvodu veliku količinu otpadnih voda (80–120 l/100 kg maslina). Ovim sistemom se dobivaju tri frakcije: čvrsti ostatak, maslinovo ulje i otpadne vode. Prednost je to što je proces automatiziran i dobivenog ulje je kvalitetno. Negativne strane su velika potrošnja energije i vode te cijena instaliranja. Unatoč velikoj potrošnji vode, najviše se koristi što uz povećanu potražnju za maslinovim uljem doprinosi ekološkom problemu. Dvofazni proces je razvijen 1990-ih kako bi se smanjilo volumen otpadnih voda i ispiranje fenola iz maslinovog ulja. On proizvodi dvije frakcije: maslinovo ulje i mokru pastu (kombinacija čvrstog dijela i otpadnih voda). Danas je ovaj postupak široko korišten u Hrvatskoj i Španjolskoj. (Dermeche i sur., 2013).



Slika 1. Glavni procesi ekstrakcije (preuzeto s [www.lipidlibrary.com](http://www.lipidlibrary.com))

### 1.3. Komina masline

Komina maslina je čvrsti nusprodukt koji nastaje tokom ekstrakcije. Sastoji se od pulpe, kože, koštice, vode i male količine ulja. Odvaja se dekantacijom od ostatka otpadnih voda. S obzirom na vrstu ekstrakcije komina masline sadrži različit postotak vlage. Komina dobivena tradicionalnim načinom prešanja sadrži 20-25 % vlage. Dvofaznim postupkom se dobiva komina s 65-75 % vlage a trofaznim postupkom centrifugiranja komina s 40-45 % vlage (Dermeche i sur., 2013).

### 1.3.1. Polifenoli

Fenolni spojevi uključuju mnoge organske spojeve koji posjeduju aromatski prsten s jednim ili više supstituiranih hidroksilnih skupina i funkcionalnim bočnim lancem. Prirodni fenolni spojevi uključuju jednostavne molekule, poput fenolnih kiselina, i visoko polimerizirane spojeve kao što su tanini. Najčešći oblici fenolnih spojeva su konjugirani s različitim molekulama šećera (mono-, di- ili oligosaharidi), organskim kiselinama i lipidima (masti), ili s drugim fenolima vezanim na hidroksilne skupine ili na aromatske ugljikove atome. Razlike u kemijskoj strukturi su odgovorne za različitu klasifikaciju i djelovanje (Slika 2.). Glavne skupine su fenolne kiseline, aldehidi, flavonoidi, lignani, stilbeni, tanini i lignin (Dermeche i sur., 2013). Sadržaj polifenola je odgovoran i za različite okus maslinovog ulja: hidroksitirozol određuje gorak okus maslina i ulja, dok je za trpak okus odgovoran oleokantal (Beauchamp i sur., 2005).

Sastav komine je kompleksan i varira ovisno o klimatskim prilikama, uzgoju biljke, skladištenju ploda i procesu ekstrakcije maslinovog ulja. Ipak, istraživanja su pokazala kako postoje spojevi koji su uvijek zastupljeni u većim koncentracijama, neovisno o uvjetima. Neki autori su pronašli da je hidroksitirozol glavni fenolni spoj u komini masline, dostižući koncentraciju između 1624-2872 mg / kg (Lujan i Luque de Castro, 2007; Senent i sur., 2012). Drugi su pak našli da je glavni spoj oleuropein (Cioffi i sur., 2010).

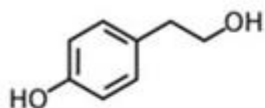
Hidroksitirozol, također poznat kao 3,4-DHPEA, je dio skupine fenilalkohola. Njegova visoka antioksidacijska svojstva proizlaze iz o-difenolne strukture koja učinkovito stabilizira radikale (Visioli i sur., 1998). Oleuropein je dio grupe sekoiridoida i sastoji se od estera hidroksitirozola vezanog za elenolnu kiselinu s glukozom. Kao i hidroksitirozol, oleuropein također ima o-difenolnu skupinu koja djeluje kao antioksidans u staničnim obrambenim mehanizmima uklanjanjem dušikovog oksida koji nastaje sintazom dušikovog oksida i hipoklorne kiseline. Tijekom proizvodnje, oleuropein se pomoću  $\beta$ -glukozidaze enzimijski pretvara u hidroksitirozol i ostale derivati sekoiridoida, kao što je 3,4-DHPEA-EDA, povećavajući njihovu količinu u nusproduktima (Obied i sur., 2008).

U nižim koncentracijama u komini masline su prisutni sekoiridoidni i oleuropeinski derivati kao što su 3,4-DHPEA-EA i 3,4-DHPEA-EDA. Oni su bioaktivni spojevi jer se mogu

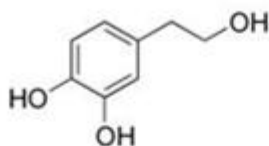
metabolizirati u hidroksitrosol prije no stignu u ljudsku plazmu (Fito i sur., 2007). Frakcije bogate verbaskozidom i njegovim izomerom izoverbaskozidom su pokazale veću aktivnost uklanjanja hidroksilnih radikala u usporedbi s hidroksitrosolom (Cardinali i sur., 2010).

Nusprodukti proizvodnje kao što su komina masline i korištena voda su problem za okoliš. Kako bi se to riješilo razmatrana je mogućnost njihove upotrebe kao gnojiva (Lopez-Pineiro i sur., 2011). Fenolni spojevi u nusproduktima predstavljaju veliki interes u industriji hrane i nutraceutika zbog njihovog velikog potencijala kao antioksidansa (Bouaziz i sur., 2008).

### FENOLNI ALKOHOLI

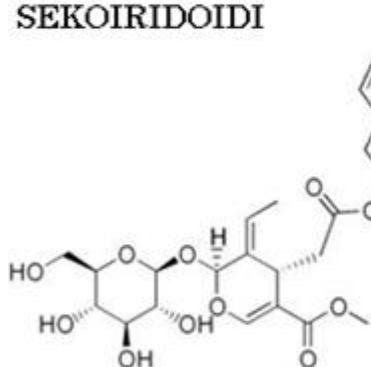


tirosol

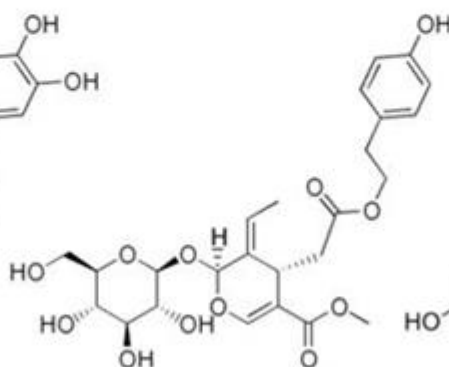


hidroksitirosol

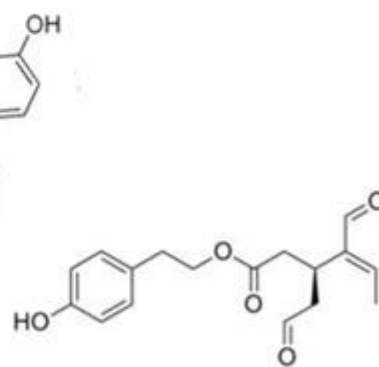
### SEKOIRIDOIDI



oleuropein



ligstrozid

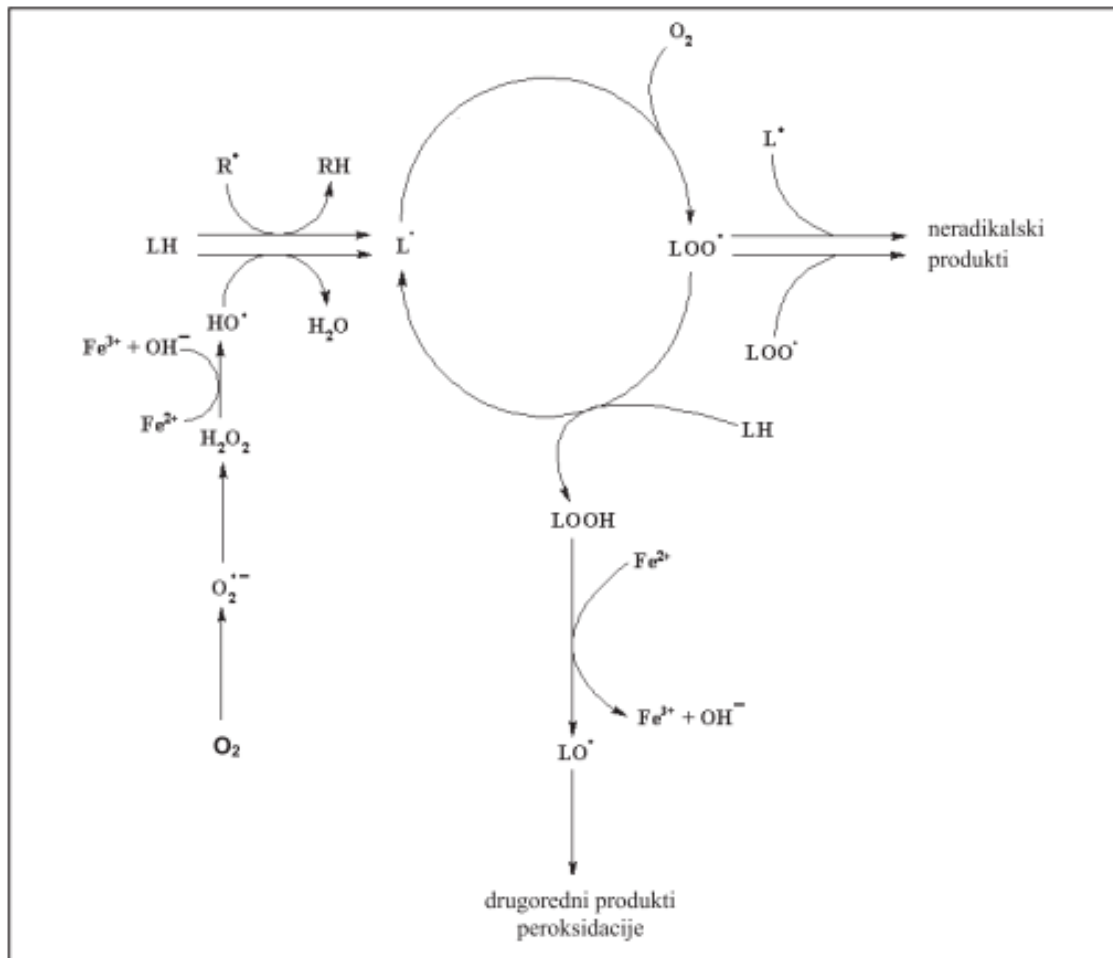


oleokantal

Slika 2. Kemijske strukture glavnih fenolnih spojeva komine masline

## 1.4. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je proces koji rezultira promjenom ili oštećenjem lipidne molekularne strukture. U biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema  $H^+$  i drugim ionima te do moguće rupture stanice i curenja njena sadržaja. Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje  $OH^\bullet$ , međutim i drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije (Slika 3.)



Slika 3. Pregled lipidne peroksidacije (preuzeto od: Štefan i sur., 2007)

$OH^\bullet$  - hidroksid,  $OH^\bullet$  - hidroksilni radikal,  $H_2O_2$  - vodikov peroksid,  $LH$  - lipidna molekula,  $L^\bullet$  - lipidni radikal,  $LO^\bullet$  - lipidni alkoksilni radikal,  $LOO^\bullet$  - lipidni peroksilni radikal,  $LOOH$  - lipidni hidroperoksid,  $R^\bullet$  - prooksidans,  $O_2$  - kisik,  $O_2^{\bullet-}$  - superoksidni radikal

Proces lipidne peroksidacije možemo podijeliti u tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Proces inicijacije započinje napadom ROS-a, koji izdvoji atom vodika iz metilenske skupine ( $-CH_2-$ ). Iz PUFA-e tada nastaju slobodni lipidni radikali. Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u jesu  $OH^\bullet$ ,  $HO_2^\bullet$ ,  $RO^\bullet$ , te  $RO_2^\bullet$ , dok je  $O_2^{\bullet-}$  nedovoljno

reaktivan za eliminaciju vodika. Dvostruka veza u masnim kiselinama oslabljuje C-H veze na atomu ugljika u njoj blizini i čini premještanje vodika lakšim. Nastali ugljikovi radikali se nastoje stabilizirati oblikujući konjugirane diene. U aerobnim uvjetima konjugirani dieni se spajaju s kisikom i tvore LOO<sup>•</sup>. Oni mogu eliminirati vodik iz druge organske molekule, uključujući PUFA-u. Dolazi do oblikovanja LOOH i reaktivnih ugljikovih radikala koji nastavljaju reakciju (faza propagacije). Tijekom propagacije LOOH u prisutnosti željeza disocira do LO<sup>•</sup> i LOO<sup>•</sup> koji dovode do reinicijalizacije peroksidacije. Disocijacijom LOOH dolazi do nastanka konačnih produkata peroksidacije: aldehida i ugljikovodika. Za terminaciju je potreban antioksidans koji donira vodikov atom LOO<sup>•</sup>. Pri tom nastaje odgovarajući radikal antioksidansa koji s drugim radikalom tvori neradikalne produkte (Štefan i sur., 2007).

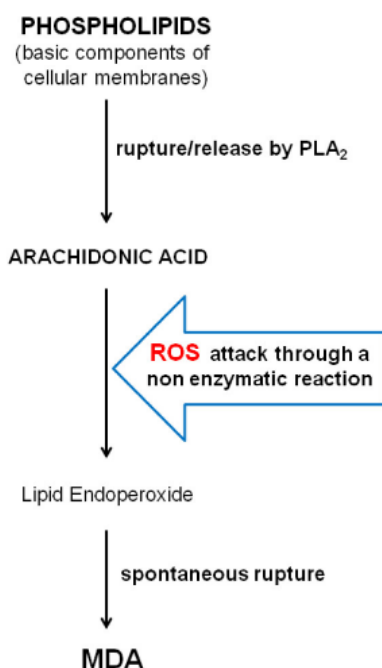
#### **1.4.1. Produkti lipidne peroksidacije**

Pod djelovanjem iona željeza ili bakra, lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte – od aldehida, ketona, ugljikovodika (etana, etena, pentana), epoksida, do aktivnih radikala. Pokazatelj peroksidacije je MDA koji se tijekom peroksidacije lipida stvara u malim količinama. HNE je produkt peroksidacije  $\omega$ -6 PUFA-e (linoleinske i arahidonske). U većim količinama ima izrazito toksično djelovanje, inhibira stanični rast, sposoban je modificirati lipoproteine te potaknuti razvoj ateroskleroze. HNE se metabolizira stvarajući GSH-konjugate preko glutation transferaza koji dalje prelaze u merkapturnu kiselinu, te se izlučuju mokraćom. Kao markeri lipidne peroksidacije koriste se i izoprostani koji se stvaraju oksidacijom fosfolipida te se mogu određivati u ljudskoj plazmi i u mokraći. Oni su izomeri prostaglandina s kojima imaju popriličnu sličnost, no razlikuju se između ostaloga po tomu što izoprostani nastaju lokalno u membranama i mnogo su složeniji. (Štefan, 2007).

#### **1.4.2. Malondialdehid**

Oštećenje masnih kiselina dovodi do nastanka aldehida. Aldehidi, a posebno MDA, su najčešće korišteni biljezi u praćenju oksidacijskog stresa. MDA je završni produkt enzimske ili neenzimske razgradnje arahidonske kiseline i većih polinezasićenih masnih kiselina. Bioaktivnost mu ovisi o pH. Pri fiziološkom pH, on se nalazi u obliku enolatnog iona i slabo je reaktivan. Reaktivnost mu raste sa smanjenjem pH i on prelazi u beta-hidroksiakrolein. Enzimatski nastaje kao nusprodukt biosinteze TXA<sub>2</sub> (Slika 4.). Neenzimatski način stvaranja MDA je slabo razjašnjen. Zbog elektrofilne naravi MDA se jako veže za nukleofile poput

bazičnih aminokiselina. Reakcijom između MDA i slobodne aminokiseline ili proteina nastaju Schiffove baze ( $R_2C=NR'$ ). Takve adukte nazivamo i krajnjim produktima uznapredovale lipidne peroksidacije. Acetaldehid je produkt metabolizma MDA te u uvjetima stresa i uz prisutnost MDA, može proizvesti visoko imunogene malondialdehid acetaldehid adukte. Ti adukti mogu uzrokovati unakrsno povezivanje proteina/DNA čime oštećuju funkciju biomolekula. MDA također može reagirati i sa nekoliko nukleozida tvoreći adukte. Ako ne dođe do popravka DNA, adukti MDA-DNA mogu dovesti do mutacija, pucanja lanca, zaustavljanja staničnog ciklusa i indukcije apoptoze (Ayala i sur., 2014).



Slika 4. Nastanak MDA (preuzeto od Lorente i sur., 2013)

### 1.4.3. Lipidna peroksidacija u mesu

Mnogi su čimbenici povezani s oksidacijom lipida u mesu, na primjer: toplina i svjetlost, katalizator, sadržaj fosfolipida i nezasićenih masnih kiselina, pH (Ahn i sur., 1992; Buckley i sur., 1995; Stoick i sur., 1991; Lee i sur., 1996). Fosfolipidi, koji se nalaze u staničnim membranama, su osjetljivi na oksidaciju u mesu jer sadrže više nezasićenih masnih kiselina u usporedbi s ostalim lipidima. Krto meso sadrži visok postotak fosfolipida te je zbog toga osjetljivo na oksidaciju (Igene i sur., 1980). Meso različitih stočnih vrsta sadrži različite omjere nezasićenih masnih kiselina i različito je osjetljivo na oksidaciju lipida. Piletina sadrži

veći postotak nezasićenih masnih kiselina i ima veću brzinu oksidacije lipida od svinjskog mesa. Svinjetina pak sadrži više nezasićenih masnih kiselina od govedine te je osjetljivija na oksidaciju lipida (Igene i sur., 1981). Postupci mljevenja, rezanja i kuhanja također ubrzavaju oksidaciju lipida. Glavni razlog je taj što obrada oslobađa fosfolipide vezane na membranu te se oni tada lakše oksidiraju. Obrada mesa remeti i strukturu mišića te uzrokuje reakciju nezasićenih masnih kiselina s kisikom iz zraka. Time se povećava kontakt s enzimima i hem pigmentima koji sadrže metalne ione, kao što je željezo, te se promiče autoksidacija u mesnim sustavima (Gray JI i Pearson AM, 1987). Kontrola čimbenika koji utječu na oksidaciju lipida je najbolji način za zaustavljanje oksidacije i očuvanje mesnih proizvoda (Cheng JH, 2016).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Maslinovo ulje je dugogodišnje korištena namirnica, naročito u mediteranskoj kuhinji. Poznato je da sadrži dosta antioksidansa zbog čega raste i potražnja za tom visoko vrijednom namirnicom. Povećana proizvodnja dovodi i povećanja količine otpadnih produkata u koje ubrajamo kominu masline i otpadne vode. One su bogate fenolima što ih čini štetnima za okoliš ako se odlažu bez prethodne obrade. Fenoli pak imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje te bi primjena nusprodukata u svrhu izolacije fenola bila idealan način za njihovo iskorištavanje.

Sve se više radi na istraživanju mogućnostima zamjene sintetskih antioksidansa u prehrambenoj industriji onim prirodnima. Razlog tomu leži u novijim istraživanjima koja povezuju dugoročni učinak primjene sintetskih antioksidansa, kao što su BHA i BHT, s mutagenim i kancerogenim učincima. Komina masline sadrži potentne antioksidanse te bi mogla biti primjenjiva kao alternativa sintetskim antioksidansima. Cilj ovog rada je usporediti kolika je učinkovitost ekstrakata komine masline u inhibiciji lipidne peroksidacije u mesu, u usporedbi sa standardno korištenim sintetskim antioksidansima. Učinkovitost ekstrakata komine masline kao antioksidansa u mesu otvara nove mogućnosti njihovog korištenja kao prirodnih prehrambenih aditiva te u širem smislu može doprinijeti rješavanju ekoloških problema vezanih uz neadekvatno odlaganje velikih količina komine masline u okoliš.

U okviru ovog istraživanja istražen je antioksidacijski potencijal ekstrakata komine masline na modelu mesa. Glavni cilj istraživanja je ustvrditi kako će ekstrakt komine masline smanjiti lipidnu peroksidaciju u mesu tijekom skladištenja te usporediti njegovu učinkovitost s učinkovitošću standardno korištenih sintetskih antioksidansa.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Kemikalije**

- Etanol, p.a., 96 %, Kemika d.o.o, kataloški br.: 1170
- Lauril sulfat, Sigma-Aldrich, kataloški br.: L-5750
- 2-Tiobarbiturna kiselina,  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, kataloški br.: T550-0
- Octena kiselina, p.a., 99.5 %, Kemika d.o.o, kataloški br.: 1500301
- n-Butanol, p.a., Lach-Ner, kataloški br.: 30079
- hidroksipropilirani derivat  $\beta$ -ciklodekstrina (HP- $\beta$ -CD): Wacker Chemie GMBH, kataloški br.: 0110193
- nasumično metilirani derivat  $\beta$ -ciklodekstrina (RAMEB-CD): Wacker Chemie GMBH, Lot – No.:3292
- MDA-tetrabutylamonijeva sol, Sigma-Aldrich, kataloški br.: 63287
- komina masline, jesen/zima 2017.
- miješano mljeveno meso, 850 g, PIK Vrbovec
- pročišćena voda

##### **3.1.2. Instrumenti i oprema**

- Analitička vaga, Mettler Toledo AB265S
- Laboratorijska peć, Over industrijska elektronika
- Termostirana kupelj s mućalicom, Gesellschaft für Labortechnik, tip 1086
- Termostat, INKO
- Soxhlet aparatura, INKO SK6ESS + Petroleum ether, Carlo Erba reagents V7L559307L
- Metalna sita, Prüfsieb DIN 4188
- Büchi Vacuum controller V-800
- Büchi Heating bath B-490
- Vakuumpumpa, Büchi Vac V-500
- Zamrzivač, Zanussi

- Liofilizator, Christ Alpha 1-4 LOC-1 + mast za pomašćivanje, Vacuum grease, Sigma Aldrich 18405
- Vakuumpumpa, Leybold Trivac D 2,5 E + ulje za pumpu, Leybonol LVO 100
- Plamenik, Poligas OMM
- Vortex miješalica, Mixer UZUSIO, tip VTY-3000L
- Štoperica, Oregon scientific, model NO.TR118
- Centrifuga, Centric 322A, Tehnica
- UV-Vis spektrofotometar, Photometer MA 9510, Iskra

### **3.1.3. Priprema ekstrakata komine masline**

Ekstrakt komine masline je pripremljen prema prethodno optimiranom postupku (Vuletić, 2018). Za dobivanje polifenolnog ekstrakta je potrebno prah komine ekstrahirati s 60 %-tnim etanolom, u vodenoj kupelji (2 h / 70 °C / 110 rpm). Postupak je rađen u triplicatu u Erlenmeyerovim tikvicama od 1000 ml. Nativni uzorak pripremljen je ekstrakcijom čiste komine bez korištenja ekscipijensa. Drugi uzorak je pripremljen ekstrakcijom komine uz dodatak HP- $\beta$ -a a treći uz dodatak RAMEB-a. Ekstrakcije su provedene korištenjem 60 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog sredstva protresivanjem u vodenoj kupelji 2h pri 70 °C. Masena koncentracija komine u ekstraktima je iznosila 20g/L, dok je ona ekscipijensa bila 8g/L (Tablica 1.). Ekstrakti su filtrirani preko naboranog filter papira uz nadopunjavanje pročišćenom vodom na ukupno 500 ml. Etanol se uklanja uparavanjem u rotavaporu (50 °C / ~ 60 mbar) te se tekući ekstrakti liofiliziraju na -20°C (Miao i sur., 2017).

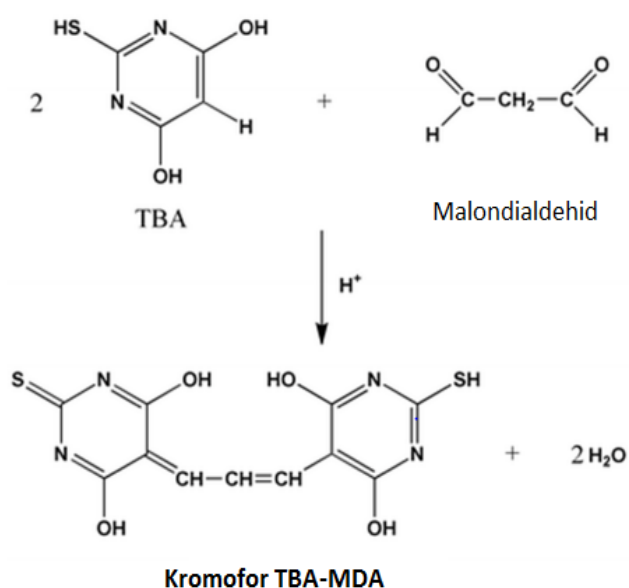
Tablica 1. Izrada ekstrakta kumine masline

Oznaka uzorka	Odvaga kumine/ g	Ekscipijens	Odvaga ekscipijensa/ g	Volumen ekstrakcijsko sredstva/mL
nativni	10,001		/	500
HP- $\beta$	9,994	hidroksipropil - $\beta$ - ciklodekstrin	3,999	500
RAME B <sub>1</sub>	10,001	nasumično metilirani $\beta$ - ciklodekstrin	3,994	500
RAME B <sub>2</sub>	10,004	nasumično metilirani $\beta$ - ciklodekstrin	4,004	500

### 3.2. Test s tiobarbiturnom kiselinom

TBA test mjeri lipidnu oksidaciju. Reakcija se događa napadom mono-enolnog oblika MDA na aktivne metilenske skupine TBA. Nastali spoj je crvene boje i ima primarni apsorpcijski maksimum na 532-535 nm i sekundarni na 245-305 nm (Sinnhuber i sur., 1958). Intenzitet boje je mjera koncentracije MDA (Tarladgis i sur., 1960). TBA test uspoređuje apsorpciju MDA-TBA kompleksa sa standardom TEP-om ili TMP-om. Brzina reakcije TBA s MDA ovisi o koncentraciji otopine TBA, temperaturi i pH. Povećanjem koncentracije TBA, kuhanjem 60 min (Tarladgis i sur., 1964.) i održavanjem pH na 3 (Kwon i Watts, 1963), skraćuje se vrijeme potrebno da TBA i MDA izreagiraju. Kiseli medij i kuhanje su potrebni ne samo zbog brže reakcije, već i zbog oslobađanja MDA iz svog vezanog oblika (adukti s proteinima, aminokiselinama). Pri tom se može naštetiti stabilnosti MDA-TBA kompleksa i uzrokovati probleme točne kvantifikacije MDA. Postoji više vrsta TBA testova. U njih se ubrajaju: metoda direktne reakcije na cijelom uzorku, destilacijska metoda, ekstrakcijska metoda, lipidni ekstrakcijski postupak i spektrofluorimetrijska metoda (Fernandez i sur., 1997). U ovom radu je korištena metoda direktne reakcije na cijelom uzorku. Sastoji se od

izravnog grijanja uzorka mesa s otopinom TBA u kiselim uvjetima i ekstrakcije crvenog pigmenta s butanolom. To je kvantitativna metoda, ali vrlo je dugotrajna i uključuje brojne ekstrakcije (Yu i Sinnhuber, 1957; Sinnhuber i Yu, 1958; Almandosi sur., 1986). Smatra se da do oksidacije dolazi i tijekom zagrijavanja reakcijske smjese (Tarladgis i sur., 1960) te da uvjeti provođenja reakcije doprinose varijacijama u rezultatima (Baumgartner i sur., 1975). Problem TBA testa je i nespecifičnost jer tiobarbiturna kiselina reagira s drugim spojevima kao što su šećeri, amino kiseline, urea, biliverdin, glioksal, aldehidi. Oni mogu tvoriti komplekse koji apsorbiraju na istoj valnoj duljini kao i MDA-TBA kompleks. Kako bi se razlikovalo MDA od ostalih komponenti sa istim apsorpcijskim maksimumima koriste se još i kromatografske metode (GC i HPLC). Još jedno ograničenje TBA testa je da MDA i drugi kratkolančani ugljikovi proizvodi nastali oksidacijom lipida nisu stabilni tijekom dugog vremenskog razdoblja. Oni se oksidiraju i tvore organske alkohole i kiseline, koji se ne mogu odrediti TBA testom (Tarladgis i Watts, 1960).



Slika 5. Mehanizam testa s tiobarbiturnom kiselinom

(preuzeto od: Sochr i sur., 2014)

### 3.3. Opis istraživanja

Metoda korištena za određivanje učinkovitosti ekstrakata komine kao antioksidansa jest tiobarbiturni test. Metoda je prethodno optimirana kako bi bila pogodna za istraživanje

ekstrakata komine masline. Prvo su optimirani uvjet termičke obrade u svrhu induciranja lipidne peroksidacije u odgovarajućem stupnju. Drugi aspekt optimizacije bio ustvrditi djelatne koncentracije BHA i ekstrakta komine masline. U tu svrhu su uzorcima sirovog mesa dodane različite koncentracije BHA-a i ekstrakta komine (HP- $\beta$ ) te su reakcijske smjese termički obrađene pod prethodno optimiranim uvjetima. Nakon termičke obrade je izmjerena apsorbanacija pomoću koje je izračunat stupanj lipidne peroksidacije. Izračunate su one koncentracije BHA-a i ekstrakta komine koje su dovele do 50 %-tnog smanjenja lipidne peroksidacije. Za istraživanje ovisnosti lipidne peroksidacije o vremenu skladištenja su pripremljeni uzorci mesa kojima su dodane prethodno optimizirane koncentracije BHA i ekstrakta komine (nativni uzorak, HP- $\beta$  i RAMEB) te je pripremljena i kontrola u koju nije dodan antioksidans. Uzorci su skladišteni na 4°C kako bi se simulirani uvjeti skladištenja mesa u domaćinstvu. Mjerenja su vršena u nultom, trećem, šestom, desetom i trinaestom danu. Za svaki uzorak izračunata je količina nastalog MDA tijekom skladištenja te je aktivnost različitih ekstrakata komine masline uspoređena sa aktivnošću BHA kroz 0., 3., 6., 10. i 13. dan.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. Modifikacija metode mjerenja antioksidativne aktivnosti u modelu mesa - optimizacija termičke obrade mesa u svrhu induciranja lipidne peroksidacije**

Originalni protokol preuzet je iz radova Fasseasa i suradnika (2007) i Wonga i suradnika (1995). Prema originalnoj proceduri kao model mesa korišteno je mljeveno meso, koje je prethodno odvojeno od vidljivih dijelova masti. Meso se dodatno homogenizira kako bi se dobila jednolika pasta. Važe se po 50 mg mesa, nakon čega se dio uzoraka termički obrađuje (85°C/ 60 minuta) kako bi se potaknula lipidna peroksidacija, dok drugi dio ostaje sirov (negativna kontrola). Svaki pokus radi se u triplicatu. Nakon termičke obrade u reakcijsku smjesu se doda: 1 ml pročišćene vode, 1.5 ml 20 % octene kiseline i 1.5 ml 0.8 % TBA otopljene u 1.1 % SDS-u (pH reakcijske smjese treba biti 2). Sve se vorteksira i zagrijava na 1h na 100°C. Nakon hlađenja reakcijskoj smjesi se doda 5 ml n-butanola, vorteksira 30 sekundi i centrifugira se 3 minute na 2500 rpm. Butanolski sloj se koristi za spektrofotometrijsko određivanje TBA-reaktivnih produkata na 532 nm.

Optimizacijom metode količina mesa je povećana sa 50 na 100 mg kako bismo povećali količinu produkata lipidne peroksidacije koja nastaje termičkom obradom uzorka. Kako bi tijekom zagrijavanja raspodjela temperature u matriksu mesa bila jednolika, meso se prethodno suspendira u 300 µl deionizirane vode.

U istu svrhu, termička obrada se provodi na 85°C kroz 120 min (u odnosu na 85°C kroz 60 min u originalnoj metodi). U završnom koraku uzorci se centrifugiraju na 4000 g, 3 minute (a ne na 2500) kako bi izbjegli miješanje butanolo g sloja, koji sadrži reaktivne TBA produkte, s donjim vodenim slojem i dobili bistre mjerne otopine.

## 4.2. Kalibracijska krivulja MDA

Za izradu kalibracijske krivulje su pripremljene standardne otopine malondialdehida (MDA) koncentracija 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 i 20  $\mu\text{M}$ . Dobivene su otapanjem odgovarajućeg volumena stock otopine standarda ( $c=3035\mu\text{M}$ ) u pročišćenoj vodi, octenoj kiselini i TBA (Tablica 4.). Standard je malondialdehid (MDA)-tetrabutilamonijeva sol jer MDA nije stabilan ali se kvantitativno oslobađa kad je sol pomiješana s kiselinom. Primjer izračuna razrjeđenja:

$$V(\text{stock}_{\text{MDA}} + \text{pročišćena voda}) = 300\mu\text{l}$$

$$V(\text{ukupni}) = 300\mu\text{l} + 1\text{ ml} + 1.5\text{ ml} + 1.5\text{ ml} = 4.3\text{ ml}$$

$$c(\text{konačno}) = 0.5\mu\text{M}$$

$$c(\text{stock}_{\text{MDA}}) = 3035\mu\text{M}$$

$$c(\text{konačno}) * V(\text{ukupni}) = c(\text{stock}_{\text{MDA}}) * V(\text{stock}_{\text{MDA}})$$

$$V(\text{stock}_{\text{MDA}}) = \frac{3035\mu\text{M} * 4.3\text{ml}}{0.5\mu\text{M}} = 0.708 \mu\text{l}$$

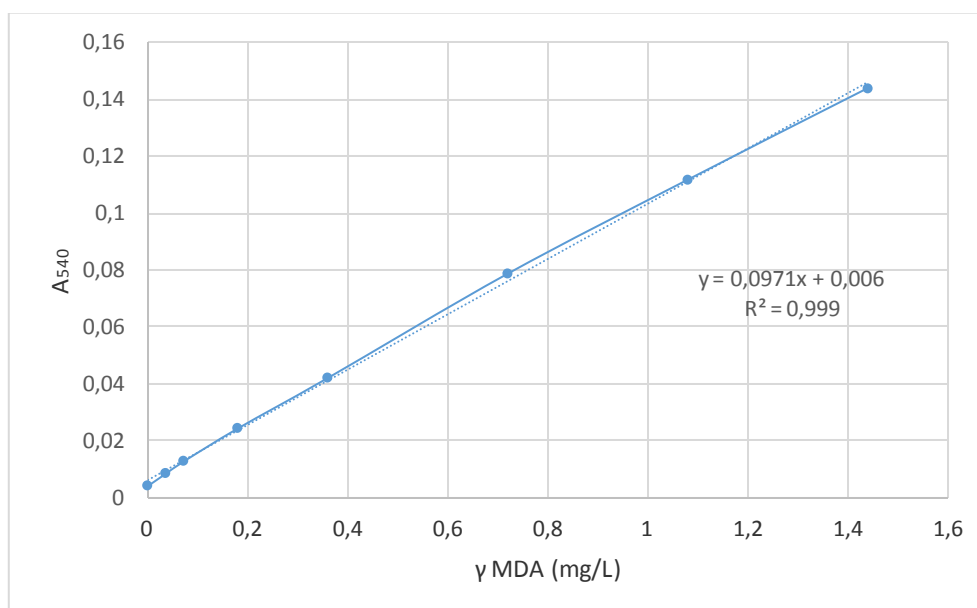
$$V(\text{pročišćena voda}) = 300\mu\text{l} - 0.708 \mu\text{l} = 299.29 \mu\text{l}$$

Otopine su za svaku od analiziranih koncentracija rađene u duplikatu. Pripremljene su u Falcon kivetama (15 ml) dodatkom stock otopine i pročišćene vode kako bi se postignula odgovarajuća koncentracija. Konačni volumen je iznosio 300  $\mu\text{L}$ . Potom je otopinama dodano 1 ml pročišćene vode, 1.5 ml 20 % octene kiseline i 1.5 ml 0.8 % TBA otopljene u 1.1 % SDS-u. Nakon vorteksiranja su kivete zagrijavane 60 min u vodenoj kupelji na 100°C. Apsorbancija standardnih otopina je mjerena na UV-Vis spektrofotometru pri 540 nm. Iz dva mjerenja je dobivena prosječna apsorbancija (aritmetička sredina) prikazana u Tablici 4. Koreliranjem rezultata sa odgovarajućim koncentracijama MDA dobivena je linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji MDA s koeficijentom korelacije ( $R^2 = 0,999$ ).



Tablica 4. Podaci za izradu kalibracijske krivulje MDA

c(MDA)/ μm	V(3035 μM stock otopine)/μL	V(pročišćene vode)/μL	γ(MDA)/ mgL <sup>-1</sup>	A <sub>540</sub>
0	0	300	0	0,004
0,5	0,7	299,3	0,036	0,009
1	1,4	298,6	0,072	0,013
2,5	3,5	296,5	0,180	0,024
5	7,1	292,9	0,360	0,042
10	14,2	285,9	0,721	0,079
15	21,3	278,8	1,081	0,112
20	28,3	271,7	1,441	0,145



Slika 6. Kalibracijska krivulja MDA

### 4.3. Optimizacija metode mjerenja antioksidativne aktivnosti u modelu mesa-optimizacija djelatnih koncentracija uzorka BHA

Optimizacija djelatnih koncentracija uzorka je rađena s uzorkom pripremljenim sa HP-β -om. Kako bi ustvrdili djelatne koncentracije, sirovom mesu su dodane različite koncentracije HP-β-a i BHA te su ti uzorci kuhani 60 min u kupelji na 100°C (kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.). Nakon kuhanja je mjeren stupanj lipidne peroksidacije iz kojeg je dobiven graf ovisnosti lipidne peroksidacije o koncentraciji antioksidansa. Za daljnje istraživanje (oksidativna stabilnost tijekom skladištenja) odabrane su koncentracije HP-β -a i BHA-a koje su dovele do 50 %-tnog smanjenja lipidne peroksidacije.

Stock otopina antioksidansa dobivena je otapanjem 100 mg HP-β-a u 5 ml pročišćene vode. Stock otopina nativnog uzorka je dobivena otapanjem 25 mg ekstrakta komine u 5 ml pročišćene vode. Stock otopine su dalje razrijeđene pročišćenom vodom prema shemi prikazanoj u Tablici 2., kako bi se dobile 0.5, 1, 3 i 5 %-tne otopine uzorka. Postotak je izračunat kao masa uzorka u odnosu na masu mesa u reakcijskoj smjesi.

Primjer izračuna:

$$\gamma_{\text{stock otopina (komina +CD)}} = \frac{m}{V} = \frac{100 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} = 20 \text{ mg/mL}$$

$$0.5 \% \text{ otopina} \rightarrow 0.5 \text{ mg u } 300 \mu\text{L} \rightarrow \gamma (0.5 \% \text{-tne ot.}) = \frac{0.5 \text{ mg}}{0.3 \text{ ml}} = 1.667 \text{ mg/mL}$$

$$\gamma_{\text{stock otopine}} * V_{\text{stock otopine}} = \gamma_{\text{konačna}} * V_{\text{konačni}}$$

$$20 \text{ mg/mL} * V_{\text{stock otopine}} = 1.67 \text{ mg/mL} * 0.3 \text{ mL}$$

$$V_{\text{stock otopine}} = 0.025 \text{ mL} = 25 \mu\text{L}$$

$V_{\text{pročišćene vode}} = 300 \mu\text{L} - 25 \mu\text{L} = 275 \mu\text{L}$ , isti račun je primijenjen i za ostale koncentracije otopina.

Istraživanje je provedeno prema prethodno optimiziranom protokolu navedenom u poglavlju 4.1. Analize su provedene u dvije paralele, a za svaki od uzoraka pripremljena je i slijepa proba (indikatorska otopina bez mesa) kako bi se isključile interferencije. Najveći stupanj oksidacije je imala negativna kontrola (T) gdje su termički obrađeni uzorci bez dodatka antioksidansa. Stupanj oksidacije se očekivano smanjivao s povećanjem koncentracije antioksidansa.

Tablica 2. Shema pripreme uzoraka

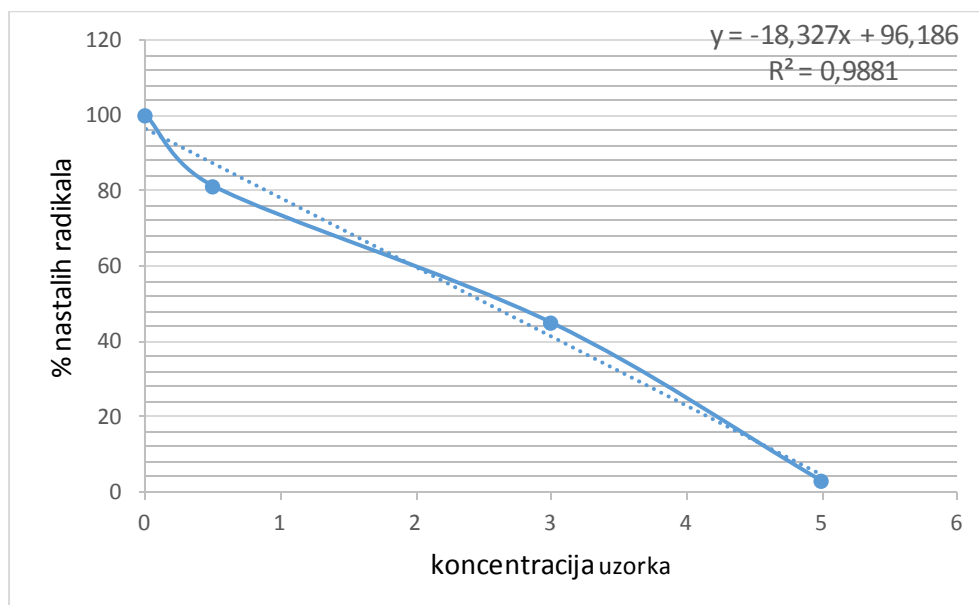
Oznaka uzorka	V(stock otopina ekstrakta)/ $\mu$ L	V(pročišćena voda)/ $\mu$ L	m(meso)/mg
S sirovo meso	0	300	100
T termički obrađeno meso bez dodatka ekstrakta komine	0	300	100
H <sub>0.5</sub> termički obrađeno meso s dodatkom 0.5 % ekstrakta	25	275	100
SP <sub>0.5</sub> slijepa proba za 0.5 %-tne uzorke	25	275	0
H <sub>1</sub> termički obrađeno meso s dodatkom 1 % ekstrakta	50	250	100
SP <sub>1</sub> slijepa proba za 1 %-tne uzorke	50	250	0
H <sub>3</sub> termički obrađeno meso s dodatkom 3 % ekstrakta	150	150	100
H <sub>5</sub> termički obrađeno meso s dodatkom 5 % ekstrakta	250	50	100
SP <sub>5</sub> slijepa proba za 5 %-tne uzorke	250	50	0

Za izradu otopina sa različitim koncentracijama BHA je prvo pripremljena stock otopina koncentracije 0,25 mg/mL nakon čega se dodatno razrijedit pročišćenom vodom kako bi se dobile 0.0001, 0.005, 0.01, 0.02 %-tne otopine (postotak izražen na masu mesa u reakcijskoj smjesi). Višestruka razrjeđenja su potrebna jer je BHA sintetski antioksidans jake aktivnosti (Tablica 3.). Za sve uzorke je korištena slijepa proba SP<sub>0.5</sub> iz Tablice 2.

Tablica 3. Shema pripreme uzoraka s BHA

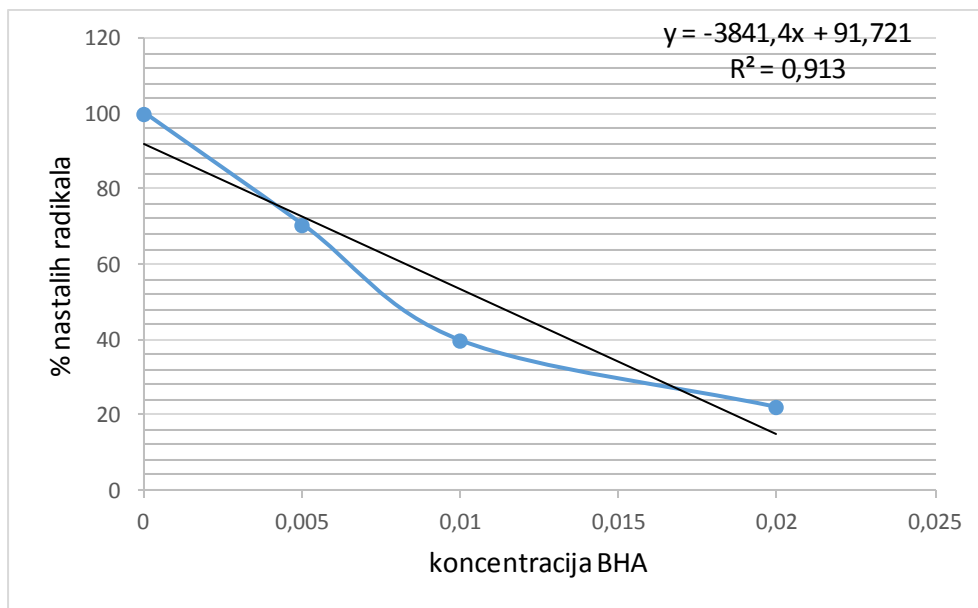
Oznaka uzorka	V(stock otopina BHA)/ $\mu$ L	V(pročišćena voda)/ $\mu$ L	m(meso)/mg
B0.0001 termički obrađeno meso s dodatkom 0.0001 % BHA	4	296	100
B0.005 termički obrađeno meso s dodatkom 0.005 % BHA	20	280	100
B0.01 termički obrađeno meso s dodatkom 0.01 % BHA	40	260	100
B0.02 termički obrađeno meso s dodatkom 0.02 % BHA	80	220	100

Ovisnost lipidne peroksidacije o koncentraciji HP- $\beta$ -a prikazana je na slici 7. -s jednadžbom pravca  $y = -18,327x + 96,186$  i koeficijentom korelacije  $R^2 = 0,9881$ . Iz jednadžbe pravca je očitano da će 3 % uzorak komine dovesti do 50 %-tnog smanjenja oksidacije te je pri daljnjim mjerenjima korištena ta koncentracija uzorka.



Slika 7. Ovisnost lipidne peroksidacije o koncentraciji HP- $\beta$ -a

Jednadžba pravca dobivena za mjerenje ovisnosti koncentracije BHA i oksidativnog stresa je  $y = -3841,4 * x + 91,721$ . Koeficijent korelacije  $R^2$  iznosi 0,913 (slika 8.). Za daljnje analize je odabrana koncentracija  $c(BHA) = 0,01$  jer je ona dovela do 50 % smanjena oksidacije.



Slika 8. Ovisnost lipidne peroksidacije o koncentraciji BHA

#### 4.4. Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakta komine tokom skladištenja

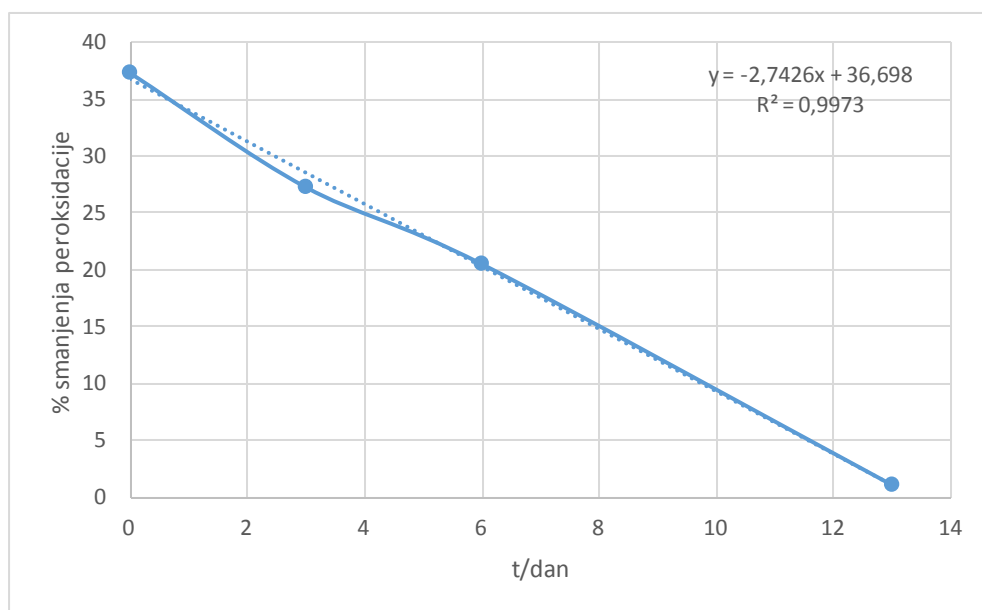
Uzorci mesa skladišteni su u na 4°C uz dodatak antioksidansa (BHA i ekstrakti komine) koji su dodani u koncentracijama utvrđenim u prethodnom poglavlju. Uzorci mesa su analizirani u 0., 3., 6., 10. i 13. danu prema postupku detaljno opisanom u odjeljku 3.2. Nakon mjerenja apsorbancije izračunati su -ekvivalentima nastalog MDA po gramu mesa (prema kalibracijskoj krivulji - Slika 6.). Postotak smanjenja peroksidacije u uzorcima kojima je dodan antioksidans je dobiven iz formule :

$$\% \text{-ak smanjenja peroksidacije} = \frac{\text{mg MDA po 1g mesa (T)} - \text{mg MDA po 1g mesa (uzorka)}}{\text{mg MDA po 1g mesa (T)}} * 100$$

U formuli T označava negativnu probu (termički obrađeni uzorak bez dodatka antioksidansa).

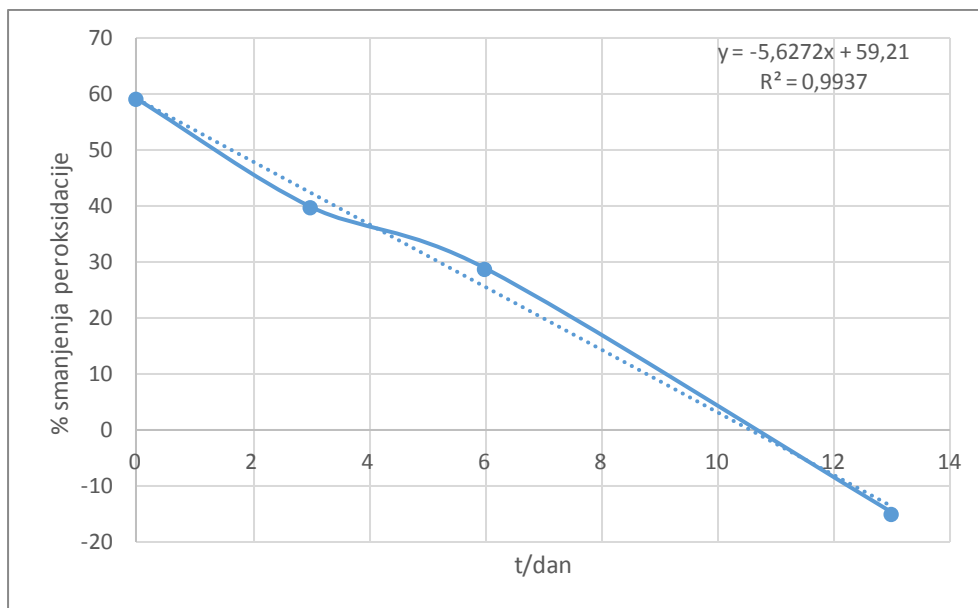
Podaci o stupnju lipidne peroksidacije za svaki od skladištenih uzoraka u različitim vremenskim točkama uzorkovanja korišteni su za dobivanje grafa koji pokazuje ovisnosti postotka smanjenja peroksidacije o vremenu skladištenja (Slike 9-12). Iz dobivenih linearnih ovisnosti moguće je odrediti vrijeme skladištenja tokom kojeg će doći do 20 %-tnog smanjenja peroksidacije (EC<sub>20</sub>), te usporediti učinkovitosti analiziranih uzoraka.

Slika 9. prikazuje pravac dobiven za nativni uzorak komine masline s koeficijentom korelacije 0,9973. Dobiven je iz rezultata mjerenja nultog, trećeg, šestog i trinaestog dana. Vidljivo je da se s povećanjem vremena skladištenja povećava peroksidacija odnosno da se tokom vremena smanjuje antioksidacijski učinak komine. Nultoga dana je nativni uzorak uspio smanjiti peroksidaciju za 37 % u usporedbi s kontrolom gdje nije dodan antioksidans, dok je trinaestog dana smanjenje peroksidacije u usporedbi s kontrolom bilo neznatno i iznosilo 1 %.



Slika 9. Ovisnost % smanjenja peroksidacije o vremenu skladištenja za nativni uzorak

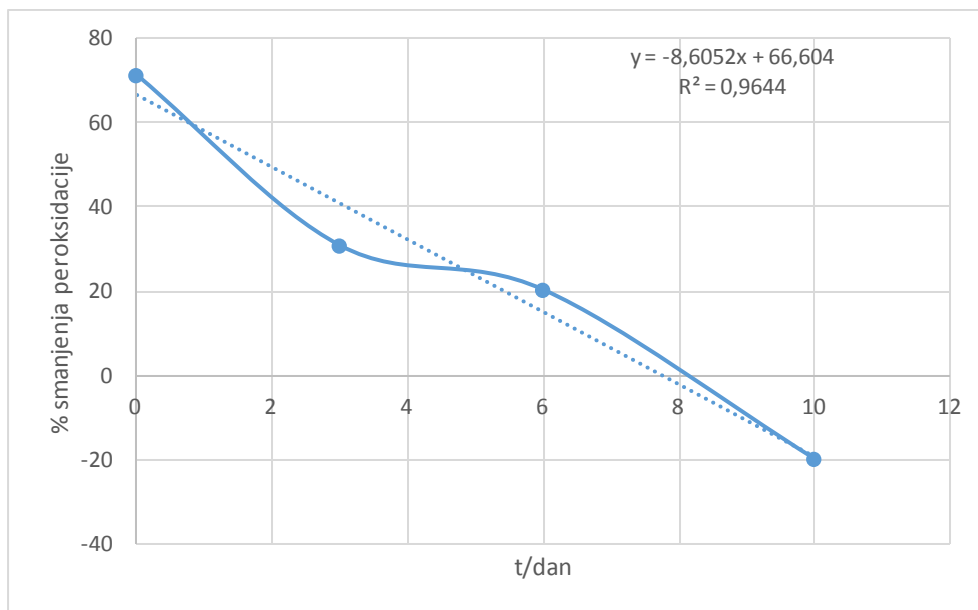
Slika 10. prikazuje ovisnosti postotka smanjenja peroksidacije o vremenu skladištenja za HP- $\beta$ . Koeficijent korelacije je zadovoljavajući i iznosi 0,9937. Iz točki na grafu možemo očitati da je postotak smanjenja peroksidacije nultog dana iznosio 59 %, trećeg dana 40 %, a šestog dana 29 %. Vidljivo da HP- $\beta$ , kako u nultom danu tako i tokom skladištenja, ima veći antioksidativni učinak nego li nativni uzorak. Kod HP- $\beta$ -a također dolazi do porasta peroksidacije s dužim skladištenjem uzorka. Trinaestoga dana je pak postotak smanjena peroksidacije iznosio -15 %, što znači da je u usporedbi s kontrolom HP- $\beta$  pokazao 15 % veći stupanj oksidacije. Možemo zaključiti da je kod mjerenja trinaestog dana HP- $\beta$  uzrokovao oksidaciju. Moguće objašnjenje toga je da HP- $\beta$  nije stabilan u tako dugom vremenskom rasponu.



Slika 10. Ovisnost % smanjenja peroksidacije o vremenu skladištenja za HP-β

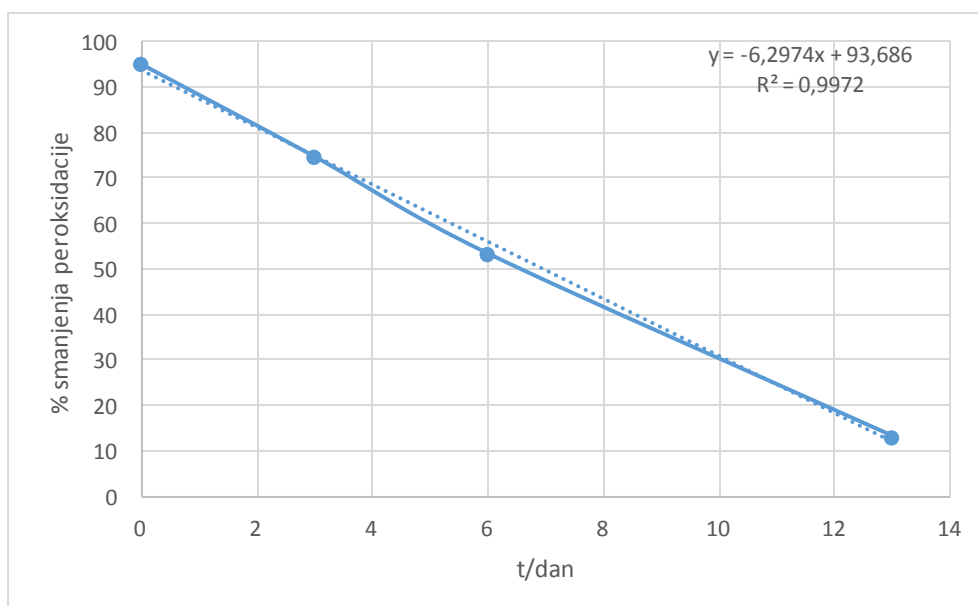
Na Slici 11. je prikazan postotak smanjenja peroksidacije u ovisnosti o vremenu skladištenja za RAMEB. Pravac koeficijenta korelacije 0,9937 je dobiven iz mjerenja nultog, trećeg, šestog i desetog dana. RAMEB je uspio nultog dana smanjiti peroksidaciju za 71 % u odnosu na kontrolu te se tog dana pokazao bolji od nativnog uzorka i HP-β-a. Očekivano je znatno manje smanjio peroksidaciju u odnosu na BHA kroz sve dane.. Trećeg dana je RAMEB smanjio peroksidaciju 31 % te i dalje za 4 % bio bolji od nativnog uzorka ali za 9 % lošiji od HP-β-a. Šestog dana je nativni uzorak sa smanjenjem peroksidacije 21 % bio neznatno bolji od RAMEB-a koji je smanjio peroksidaciju 20 %. HP-β je pak smanjio peroksidaciju 29 % te i u šestom danu bio bolji antioksidans. Trinaestog dana je RAMEB o odnosu na kontrolu imao veću stopu peroksidacije iz čega zaključujemo da je poput HP-β-a nestabilan kroz duži period, te da je pridonio oksidaciji.





Slika 11. Ovisnost % smanjenja peroksidacije o vremenu skladištenja za RAMEB

Slika 12. prikazuje postotak smanjenja peroksidacije o vremenu za BHA. Vidljivo je da je ovisnost linearna te je koeficijent korelacije najbolji kod ovog uzorka i iznosi 0,9972. U usporedbi s kontrolom BHA ima 95 % smanjenje peroksidacije u nultom danu. I kod BHA se smanjuje antioksidacijski učinak s vremenom te je postotak smanjenja trećeg dana 75 %, šestog dana 53 % a trinaestog 13 %. BHA se očekivano pokazao kao najbolji antioksidans, kako u nultom danu, tako i kroz skladištenje.



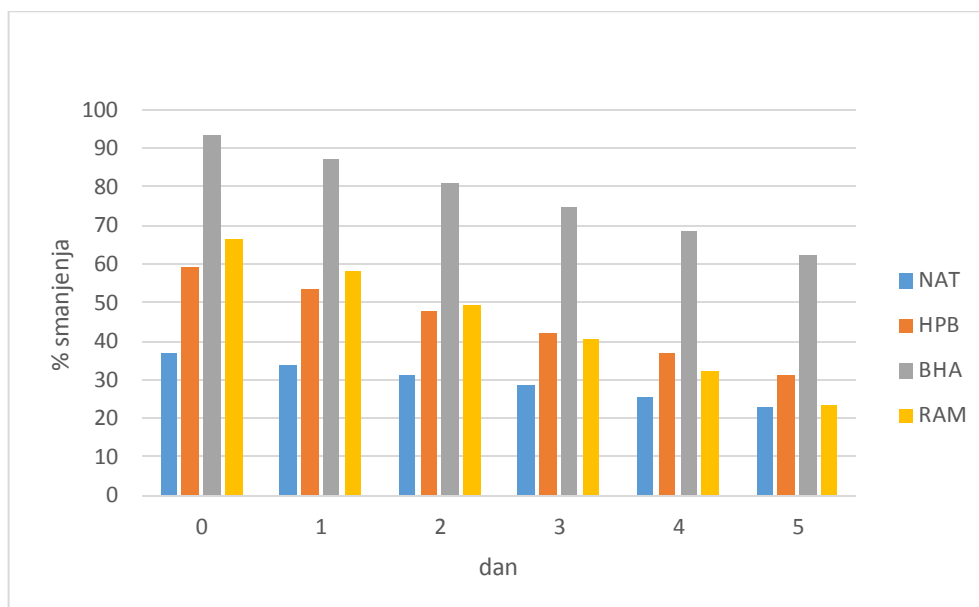
Slika 12. Ovisnost % smanjenja peroksidacije o vremenu skladištenja za BHA

#### 4.5. Usporedba antioksidativnog učinka različitih uzoraka komine i BHA

Slika 13. prikazuje usporedbu antioksidativne aktivnosti nativnog uzorka, HP- $\beta$  -a, BHA-a i RAMEB-a kroz pet dana. Odabran je taj vremenski period jer je relevantan u ovom istraživanju s obzirom da nije preporučljivo skladištiti meso duže od tog perioda. Iz njega je vidljivo kako različiti uzorci komine masline djeluju na stopu smanjenja peroksidacije ako ih usporedimo sa BHA (standardno primjenjivanim antioksidansom). Upotreba nusprodukata kao antioksidansa na modelima mesa je već proučavana. Rad Andresaa i sur. (2017) govori o upotrebi nusprodukata pri proizvodnji vina i masline kao potencijalnih antioksidansa na uzorku skladištene sirove janjetine. Njihovi rezultati sugeriraju da se, kao zamjena natrij askorbatu, mogu koristiti ekstrakti dobiveni iz komine vina i masline. U njihovom radu je ekstrakt masline i grejpa jednako je učinkovito kao i natrij askorbat usporio diskoloraciju janjećih odrezaka tijekom skladištenja. Također, ekstrakti masline i grejpa su pokazali veći antioksidativni učinak nego li askorbat. U radu Tanabe i sur. (2002) su ekstrakti kadulje, timijana, cimeta, bosiljka, crnog i bijelog papar, u koncentracijskom rasponu od 0.5 % do 2.5 % učinkovito spriječili oksidaciju lipida u svinjskom mesu. Također je dokazano da ekstrakti iz ružmarina i kadulje imaju snažan antioksidacijski učinak u hrani i modelima hrane (Cuvelier i sur., 1994). Ekstrakti ružmarina su dosta proučavani zbog njihovih antioksidativnih svojstava i smislu mogućnosti industrijske i komercijalne upotrebe. Ekstrakti kadulje pak sadrže šest glavnih spojeva prisutnih i u ružmarinu (Cuvelier i sur., 1994) te imaju sve veću primjenu kao antioksidansi u hrani. Ovi biljni ekstrakti, kombinirani s alfa-tokoferolom, djeluju sinergistički i poboljšavaju antioksidativnu aktivnost u modelima hrane (Wada i Fang, 1992). Biljke koje sadrže likopen, poput rajčice i crvenog papra, su pokazale značajnu antioksidativnu aktivnost (Sa'nchez-Escalante i sur., 2001). Katehini iz čaja (Tang i sur., 2001) i razni karotenoidi (Viljanen i sur., 2002) također mogu spriječiti oksidaciju lipida. Fasseas i sur. (2007) su u svom radu dokazali da eterična ulja origana i kadulje značajno smanjuju oksidaciju mesa. U njihovom je radu uloga antioksidansa bila značajnija u kuhanom, nego li u sirovom mesu.

Iz prethodno prikazanih rezultata ovog rada je vidljivo da svi uzorci ekstrakata komine masline imaju antioksidativni učinak jer su pokazali smanjenje peroksidacije u odnosu kontrolu gdje mesu nije bio dodan antioksidans. Usporedbom rezultata slijedi da je očekivano BHA imao najbolji antioksidativni učinak tokom cijelog skladištenja i najviše je smanjio nastanak MDA. Najmanje smanjenje peroksidacije je pokazao nativni uzorak (pripremljen bez ciklodekstrina). S obzirom da su uzorci pripremljeni sa ciklodekstrinima imali veću stopu

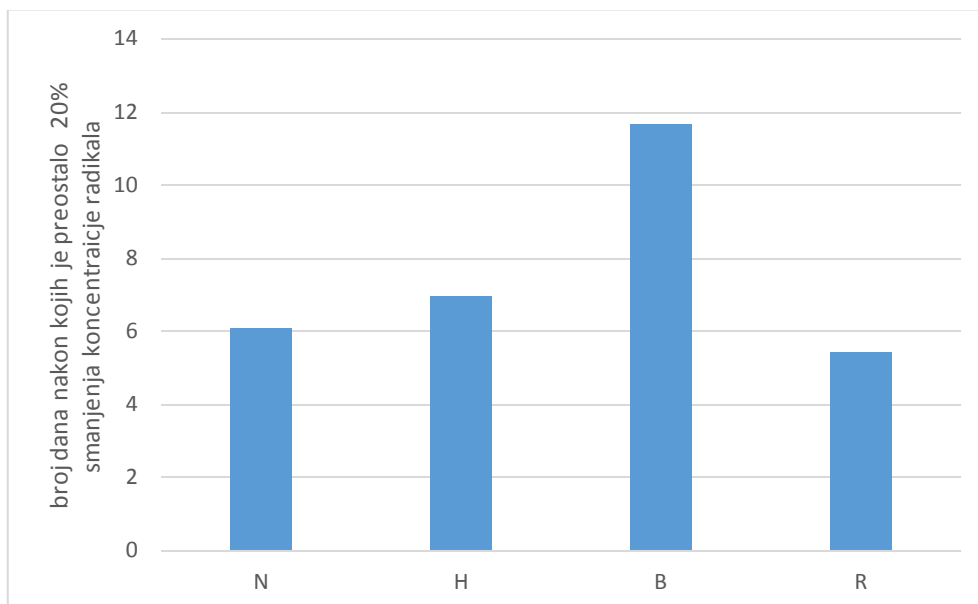
smanjenja peroksidacije od nativnog može se zaključiti da ciklodekstrini, osim što doprinose stabilnosti suhih ekstrakta, povećavaju antioksidacijsku aktivnost uzoraka u modelu mesa. Usporedbom uzoraka ekstrakta komine pripremljene s RAMEB-om i HP- $\beta$ -om, boljim se pokazao RAMEB u nultom, prvom i drugom danu dok je četvrtog i petog dana HP- $\beta$  bio bolji.



Grafikon 1. Usporedba antioksidativnog učinka različitih uzoraka komine masline i BHA

Grafikon 2. prikazuje broj dana nakon kojih se 80 % radikala uspjelo osloboditi, odnosno broj dana nakon kojih će smanjenje peroksidacije iznositi 20%. Odabrane su te vrijednosti za prikaz jer se već u nultom danu kod nativnog uzorka uspjelo osloboditi 63 % radikala te je smanjenje peroksidacije iznosilo 37 %, Iz tog razloga nije bilo moguće prikazati grafikon s danom u kojem je došlo do 50 %-tnog smanjenja peroksidacije za pojedini uzorak. Iz grafikona se može vidjeti kakva je učinkovitost antioksidansa tokom skladištenja odnosno koji je od uzoraka ekstrakta komine najbolji za skladištenje. Kao što je i pretpostavljeno BHA je imao najbolji antioksidativni učinak te se 80 % radikala uspjelo osloboditi tek 12. dan. U uzorku ekstrakta komine kojem je dodan RAMEB se već u 5. danu uspjelo osloboditi 80 % radikala što navodi na zaključak da bi trebalo povećati koncentraciju RAMEB-a kako bi njegov antioksidativni učinak bio nalik antioksidativnom učinku BHA. U nativnom uzorku se u 6. danu oslobodilo 80 % radikala što ga čini boljim antioksidansom od RAMEB-a ali lošijim od HP- $\beta$  -a gdje je do 80 %-tnog oslobođenja radikala došlo u 7. danu. HP- $\beta$  je za dan više nego li nativni uzorak i za dva dana više nego li RAMEB zaštitio meso od 80 %-tne peroksidacije. Iako je HP- $\beta$  bio bolji od ostalih uzoraka komine masline, njegova

antioksidativna aktivnost je i dalje značajno manja no što je antioksidativna aktivnost BHA-a. U usporedbi s HP- $\beta$  -om je BHA za pet dana više uspio spriječiti 80 %-tno oslobodjenje radikala. Može se zaključiti da bi bilo potrebno povećati koncentraciju HP- $\beta$  -a ako se želi primijeniti kao zamjena sintetskom antioksidansu BHA-u.



Grafikon 2. Broj dana nakon kojih je preostalo 20 % smanjenje koncentracije radikala za različite uzorke ekstrakta komine i BHA

## 5. ZAKLJUČAK

Peroksidacija lipida je smanjena u svim ispitivanim uzorcima koji su se skladištili sa suhim ekstraktima komine masline što je ispitano praćenjem antioksidativne aktivnosti korištenjem modela mesa.

Najslabiji antioksidativni učinak tokom skladištenja je pokazao nativni uzorak (pripremljen bez ciklodekstrina) iz čega slijedi da primjena ciklodekstrina u formulaciji ekstrakta komine masline povećava stabilnost i antioksidacijska svojstva

Uspoređujući ekstrakte, onaj koji je sadržavao RAMEB imao je najjači antioksidativni učinak u nultom, prvom i drugom danu te se može izdvojiti kao dobar izbor za zaštitu mesa od lipidne peroksidacije tijekom kratkotrajnog skladištenja

Ekstrakt komine masline koji je sadržavao HP –  $\beta$  ciklodekstrin u četvrtom i petom danu iskazao je veću antioksidativnu aktivnost od uzorka koji je sadržavao RAMEB

Uzorak s HP –  $\beta$  je stabilniji antioksidans od uzorka s RAMEB-om te je bolji izbor antioksidansa za duži period skladištenja mesa

Sintetski antioksidans BHA iskazuje jaku antioksidativnu aktivnost u znatno manjoj koncentraciji od ekstrakata komine masline

Primijenjeni u visokim koncentracijama ekstrakti komine masline nude alternativu sintetskim antioksidansima koji potencijalno imaju štetan učinak na ljudsko zdravlje. Ipak, potrebna su daljnja istraživanja da bi se stavili u upotrebu

## 6. LITERATURA

Ahn DW, Wolf FH, Sim JS, Kim DH. Packaging cooked turkey meat patties while hot reduces lipid oxidation. *J food Sci Off Publ Inst Food Technol*, 1992, 57, 1075-1077.

Andrés AI, Petrón MJ, Adámez JD, López M, Timón M. Food by-products as potential antioxidant and antimicrobial additives in chill stored raw lamb patties, *Meat Sci*, 2017, 129, 62-70.

Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014, 1-31.

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith A, Breslin PA, Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005, 437, 45–46.

Bouaziz M, Fki I, Jemai H, Ayadi M, Sayadi S. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chem*, 2008, 108, 253–262.

Buckley DJ, Morrissey PA, Gray JJ. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *J Anim Sci*, 1995, 73, 3122-3130.

Cardinali A, Cicco N, Linsalata V, Minervini F, Pati S, Pieralice M, Biological activity of high molecular weight phenolics from olive mill wastewater, *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 8585-8590.

Cheng JH, Lipid Oxidation in Meat, *J Nutri Food Sci*, 2016, 6, 12-14.

Cioffi G, Pesca MS, De Caprariis P, Braca A, Severino L, De Tommasi N. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem*, 2010, 121, 105-111.

Cuvelier, M, Berset, C, Richard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem*, 1994, 31, 665-669.

Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem*, 2013, 48, 1532-1552.

Fasseas MK, Mountzouris KC, Tarantilis PA, Polissiou M, Zervas G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chem*, 2007, 106, 1188-1194.

Fernandez J, Perez-Alvarez JA, Fernandez-Lopez JA. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem*, 1997, 59, 345-353.

Fito M, de la Torre R, Covas MI. Olive oil and oxidative stress. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51, 1215-1224.

Gray JI, Pearson AM. Rancidity and warmed-over flavor. U: *Advances in Meat Research. Restructured Meat and Poultry Products*. Pearson AM, Dutson TR, New York, Van Nostrand Reinhold Compan, 1987, str. 22.

Igene JO, Pearson AM, Dugan LR, Price JF. Role of triglycerides and phospholipids on development of rancidity in model meat systems during frozen storage. *Food Chem*, 1980, 5, 263-265.

Igene JO, Pearson AM, Gray JI. Effects of length of frozen storage, cooking and holding temperatures upon component phospholipids and fatty acid composition of meat triglycerides and phospholipids. *Food Chem*, 1981, 7, 289-303.

Kahl R, Kappus H. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1993, 196, 29-38.

Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Abdallah DM., Nassar NN, Okpany SN, Kreuter MH. Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME Induced Hypertension in Rats. *Arzneimittel-Forschung*, 2002, 52, 797-802.

Lee SK, Mei L, Decker EA. Lipid oxidation in cooked turkey as affected by added antioxidant enzymes. *J Food Sci*, 1996, 61, 726-728.

Lopez Pineiro A, Albarran A, Rato Nunes JM, Pena D, Cabrera D. Long-term impacts of de-oiled two-phase olive mill waste on soil chemical properties, enzyme activities and productivity in an olive grove. *Soil Sci Soc Am J*, 2011, 114, 175-182.

Lorent L, Martín MM, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez A, Labarta L, Díaz C, Solé-Violán J, Ferreres J, Cabrera J, Igeño JC, Jiménez A. Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients: a multicenter study. *PLoS One*, 2013, 8.

Japón-Luján R, Luque de Castro. Static-dynamic superheated liquid extraction of hydroxytyrosol and other biophenols from, *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 3629-34.

Maslina, 2015., <https://www.plantea.com.hr/maslina/>, pristupljeno 20.08.2018.

Miao J, Wei K, Li X, Zhao C, Chen X, Mao X, Huang H, Gao W. Effect of boiling and drying process on chemical composition and antioxidant activity of *Chaenomeles speciosa*. *J Food Sci Technol*, 2017, 54, 2758–2768

Micol V, Caturla N, Perez-Fons L, Mas V, Perez L, Estepa A, The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir Res*, 2005, 66, 129–136.

Nunes MA, Pimentel FB, Costa ASG, Alves RC, Oliveira MBPP. Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innov Food Sci Emerg*, 2016, 35, 139-148.

Obied HK, Prenzler PD, Ryan, Servili M, Taticci A, Esposto S, Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L., *Nat Prod Rep*, 2008, 25, 1167-1179.

Pereira PA, Ferreira I, Marcelino F, Valentao P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, 2007, 12, 1156-1160.

Rubio-Senent F, Rodríguez-Gutiérrez G, Lama-Muñoz A, Fernández-Bolaños J. New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil byproduct alperujo and their antioxidative activities, *Food Chem*, 2012, 60, 1175-86

Sa'nchez-Escalante A, Torrescano G, Djenane D, Beltra'n JA, Roncale's P. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere, *Meat Sci*, 2001, 58, 421-429.

Sochr J, Cinkova K and Svorc L, Degradation Markers in Nutritional Products a Review, *J Anal Pharm Chem*, 2014, 1, 1005.

Stoick SM, Gray JI, Booren AM, Buckley DJ. Oxidative stability of restructured beef steaks processed with oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate. *J Food Sci*, 1991, 56, 597-600.



Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice, *Medicina Fluminensis*, 2007 ,43, 84-93.

Talhaoui N, Taamalli A, Gómez-Caravaca AM, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits, *Food Res Internat*, 2015, 77, 92-108.

Tanabe H, Yoshida M, Tomita N. Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat *Anim Sci J*, 2001, 73, 389 – 393.

Tang SZ, Sheehan D, Buckley DJ, Morrissey PA, Kerry JP. Antioxidative effect of dietary tea catechins on lipid oxidation of long-term frozen stored chicken meat, *Meat Sci*, 2001 ,57, 331-336.

Viljanen K, Sundberg S, Ohshima T, Heinonen M. Carotenoids as antioxidants to prevent photooxidation, *Eur J Lipid Sci Technol*, 2002, 104, 353-359.

Visioli F, Bellomo G, Galli C, Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247, 60–64.

Vossen P, Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. *Hortic Sci*, 2007, 42, 1093-1100.

Wada S, Fang X. The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and a-tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. *J Food Process Preserv*, 1992, 16, 263-274.

Wong JW, Hashimoto K, Shibamoto T. Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts and Vitamin E in a Model Meat System. *J Agric Food Chem*, 1995, 43, 2707-2712.

## 7. SAŽETAK

U proizvodnji maslinovog ulja u otpadnim produktima zaostaje veliki udio fenolnih spojeva. Jedan od otpadnih produkata je komina masline koja sadrži polifenole odgovorne za antioksidativni učinak te ima potencijal da zamijeni sintetske antioksidanse u prehrambenim proizvodima. Lipidna peroksidacija u mesu jedan je od glavnih razloga njegovog kvarenja jer radikali, prisutni u procesu oksidacije, dovode do stvaranja aldehida odgovornih za promjenu boje i okusa mesa. Antioksidansi doniraju vodika radikalima i time učinkovito zaustavljaju proces lipidne peroksidacije. Meso različitih vrsta životinja sadrži različite omjere nezasićenih masnih kiselina zbog čega može biti osjetljivije na oksidaciju lipida. Pokazatelj peroksidacije je MDA koji se tijekom peroksidacije lipida stvara u malim količinama. U ovom radu je na modelu mesa ispitana antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata komine masline tokom skladištenja mesa te je uspoređena sa sintetskim antioksidansom BHA-om. Za određivanje učinkovitosti ekstrakata komine kao antioksidansa je korišten tiobarbiturni test. Rezultati dobiveni mjerenjem antioksidacijske aktivnosti su pokazali da svi uzorci ekstrakata komine masline imaju antioksidativni učinak. Najmanji antioksidativni učinak tokom skladištenja je pokazao nativni uzorak (pripremljen bez ciklodekstrina) dok je najbolji antioksidativni učinak u nultom, prvom i drugom danu imao uzorak koji je sadržavao RAMEB, a u četvrtom i petom danu uzorak koji je sadržavao HP- $\beta$ . Uzorak s HP –  $\beta$  je stabilniji antioksidans od uzorka s RAMEB-om te je bolji izbor antioksidansa za duži period skladištenja mesa. Usprkos tome učinkovitost ekstrakata komine je bila značajno niža u usporedbi sa sintetičkim antioksidansom BHA-om. Kako bi se sa ekstraktima komine masline postigao antioksidativni učinak sličan onom postignutim sa BHA potrebno je znatno povećati njihovu količinu što dovodi do poskupljenja prehrambenog proizvoda. Ipak komina masline predstavlja alternativu sintetskim antioksidansima s obzirom na trendove primjene prirodnih antioksidansa.

## SUMMARY

In the production of olive oil, a large share of phenolic compounds stays in the waste products. One of the waste products is olive pomace which contains polyphenols that are responsible for the antioxidant effect and they have potential to replace synthetic antioxidants in food products. Lipid peroxidation in meat is one of the main reasons for meat degradation because the radicals formed in the oxidation process lead to formation of aldehydes responsible for changing color and taste of meat. Antioxidant donates hydrogen to the radical and effectively stops the process of lipid peroxidation. Meat of different animal species contains different ratios of unsaturated fatty acids and can be more sensitive to lipid oxidation. The peroxidation indicator is MDA which is produced in small amounts during lipid peroxidation. In this paper, antioxidative activity of various olives extracts was studied in the meat model during meat storage and it was compared to synthetic antioxidant BHA. A thiobarbituric test was used to determine the efficacy of extracts of olive pomace as antioxidant. The results obtained by measuring antioxidant activity have shown that all samples of olive pomace extracts have an antioxidant effect. The lowest antioxidant effect during storage was demonstrated by a native sample (prepared without cyclodextrin) while the best antioxidant effect in the null, first and second day had sample that contained RAMEB, and the fourth and fifth day sample that contained HP- $\beta$  had the best result. Sample with HP -  $\beta$  is more stable antioxidant than the sample with RAMEB and it is better choice of antioxidant for a longer storage of meat. In spite of this, the efficacy of olive pomace extracts was significantly lower compared to synthetic antioxidant BHA. In order to achieve similar antioxidant effect with olive pomace extracts to that obtained with BHA, it is necessary to significantly increase their amount, which leads to an increase in price of food. However, olive pomace extracts are an alternative to synthetic antioxidants because there is a trend of using natural antioxidants.

## 8. Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za kemiju prehrane  
Biokemija prehrane  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UČINKOVITOST EKSTRAKTA KOMINE MASLINE U ZAŠTITI MESA OD OKSIDATIVNOG KVARENJA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Marija Knežević

#### SAŽETAK

U proizvodnji maslinovog ulja u otpadnim produktima zaostaje veliki udio fenolnih spojeva. Jedan od otpadnih produkata je komina masline koja sadrži polifenole odgovorne za antioksidativni učinak te ima potencijal da zamijeni sintetske antioksidanse u prehrambenim proizvodima. Lipidna peroksidacija u mesu jedan je od glavnih razloga njegovog kvarenja jer radikali, prisutni u procesu oksidacije, dovode do stvaranja aldehida odgovornih za promjenu boje i okusa mesa. Antioksidansi doniraju vodika radikalima i time učinkovito zaustavljaju proces lipidne peroksidacije. Meso različitih vrsta životinja sadrži različite omjere nezasićenih masnih kiselina zbog čega može biti osjetljivije na oksidaciju lipida. Pokazatelj peroksidacije je MDA koji se tijekom peroksidacije lipida stvara u malim količinama. U ovom radu je na modelu mesa ispitana antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata komine masline tokom skladištenja mesa te je uspoređena sa sintetskim antioksidansom BHA-om. Za određivanje učinkovitosti ekstrakata komine kao antioksidansa je korišten tiobarbiturni test. Rezultati dobiveni mjerenjem antioksidacijske aktivnosti su pokazali da svi uzorci ekstrakata komine masline imaju antioksidativni učinak. Najmanji antioksidativni učinak tokom skladištenja je pokazao nativni uzorak (pripremljen bez ciklodekstrina) dok je najbolji antioksidativni učinak u nultom, prvom i drugom danu imao uzorak koji je sadržavao RAMEB, a u četvrtom i petom danu uzorak koji je sadržavao HP- $\beta$ . Uzorak s HP- $\beta$  je stabilniji antioksidans od uzorka s RAMEB-om te je bolji izbor antioksidansa za duži period skladištenja mesa. Usprkos tome učinkovitost ekstrakata komine je bila značajno niža u usporedbi sa sintetičkim antioksidansom BHA-om. Kako bi se sa ekstraktima komine masline postigao antioksidativni učinak sličan onom postignutim sa BHA potrebno je znatno povećati njihovu količinu što dovodi do poskupljenja prehrambenog proizvoda. Ipak komina masline predstavlja alternativu sintetskim antioksidansima s obzirom na trendove primjene prirodnih antioksidansa.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 37 stranica, 14 grafičkih prikaza, 4 tablice i 42 literatuma navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Gljučne riječi: komina masline, metoda skladištenja, model mesa, lipidna peroksidacija, antioksidans

Mentor: **Prof. Dr.sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Prof. Dr.sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Prof. Dr.sc. Anita Hafner**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Doc. Dr.sc. Loworka Vujić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Food Chemistry  
Food Biochemistry  
Domagojeva 2, 1000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### EFFICIENCY OF THE OLIVE POMACE EXTRACTS IN PROTECTION OF MEAT FROM OXIDATIVE DEGRADATION DURING STORAGE

**Marija Knežvić**

#### SUMMARY

In the production of olive oil, a large share of phenolic compounds stays in the waste products. One of the waste products is olive pomace which contains polyphenols that are responsible for the antioxidant effect and they have potential to replace synthetic antioxidants in food products. Lipid peroxidation in meat is one of the main reasons for meat degradation because the radicals formed in the oxidation process lead to formation of aldehydes responsible for changing color and taste of meat. Antioxidant donates hydrogen to the radical and effectively stops the process of lipid peroxidation. Meat of different animal species contains different ratios of unsaturated fatty acids and can be more sensitive to lipid oxidation. The peroxidation indicator is MDA which is produced in small amounts during lipid peroxidation. In this paper, antioxidative activity of various olives extracts was studied in the meat model during meat storage and it was compared to synthetic antioxidant BHA. A thiobarbituric test was used to determine the efficacy of extracts of olive pomace as antioxidant. The results obtained by measuring antioxidant activity have shown that all samples of olive pomace extracts have an antioxidant effect. The lowest antioxidant effect during storage was demonstrated by a native sample (prepared without cyclodextrin) while the best antioxidant effect in the null, first and second day had sample that contained RAMEB, and the fourth and fifth day sample that contained HP- $\beta$  had the best result. Sample with HP -  $\beta$  is more stable antioxidant than the sample with RAMEB and it is better choice of antioxidant for a longer storage of meat. In spite of this, the efficacy of olive pomace extracts was significantly lower compared to synthetic antioxidant BHA. In order to achieve similar antioxidant effect with olive pomace extracts to that obtained with BHA, it is necessary to significantly increase their amount, which leads to an increase in price of food. However, olive pomace extracts are an alternative to synthetic antioxidants because there is a trend of using natural antioxidants.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 37 pages, 14 figures, 4 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace, storage method, meat model, lipid peroxidation, antioxidant

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Anita Hafner, Ph.D.** *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: september 2018.

