

# POTENCIJAL PRIMJENE EKSTRAKTA LISTA MASLINE (ELM) I EKSTRAKTA MAJČINE DUŠICE (EMD) U OPLEMENJIVANJU MLIJEČNIH PROIZVODA

---

Jelinić, Rebeka

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:691900>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

Repository / Repozitorij:

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU  
STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA  
PRERADA MLIJEKA**

**REBEKA JELINIĆ**

**POTENCIJAL PRIMJENE EKSTRAKTA LISTA MASLINE  
(ELM) I EKSTRAKTA MAJČINE DUŠICE (EMD) U  
OPLEMENJIVANJU MLIJEČNIH PROIZVODA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KARLOVAC, 2024**

**Veleučilište u Karlovcu**

Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Prerada mlijeka

Rebeka Jelinić

**Potencijal primjene ekstrakta lista masline (ELM) i ekstrakta  
majčine dušice (EMD) u oplemenjivanju mliječnih proizvoda**

Završni rad

Mentor: Elizabeta Zandona, mag. ing. bioproc., pred.

Broj indeksa studenta: 0314615050

Karlovac, rujan 2024.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, Elizabeti Zandona, mag. ing. bioproc. na strpljenju, stručnoj pomoći, podršci i smjernicama prilikom izrade ovog završnog rada.*

*Također se zahvaljujem svim profesorima koji su nesebično prenosili svoje znanje te njihovom doprinosu da sa uspjehom završim školovanje.*

*Najveću zahvalnost htjela bih izraziti mojim dragim roditeljima, Draženki i Mariju, što su mi bili potpora do samog kraja i omogućili sve ovo. Hvala vam što ste vjerovali u mene.*

## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Rebeka Jelinić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Potencijal primjene ekstrakta lista masline (ELM) i ekstrakta majčine dušice (EMD) u oplemenjivanju sira** rezultat vlastitog rada i istraživanja te se oslanja se na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 26. rujna 2024.

Ime i prezime studenta

REBEKA JELINIĆ

---

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Veleučilište u Karlovcu  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni studij prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### POTENCIJAL PRIMJENE EKSTRAKTA LISTA MASLINE (ELM) I EKSTRAKTA MAJČINE DUŠICE (EMD) U OPLEMENJIVANJU MLIJEČNIH PROIZVODA

*Rebeka Jelinić*

Rad je izrađen na Odjelu prehrambene tehnologije Veleučilišta u Karlovcu u sklopu projekta „Utjecaj primjene biljnih ekstrakata na svojstva i zrenje polutvrđog sira (SIROFONIJA)“, Klasa: 602-01/23-01/392, Ur.br.: 2133-61-01-23-11.

**Mentor:** Elizabeta Zandona, mag. ing. bioproc., pred.

#### **Sažetak**

Začinsko bilje, začini, povrće i drugi začini u biti su arome koje se dodaju siru kako bi se diverzificirao okus sira u komercijalne svrhe. Sir je namirnica koja se konzumira u cijelom svijetu. Njegova proizvodnja od različitih vrsta mlijeka i tehnologija omogućuje ljudima da dobiju stotine varijanti proizvoda. Ovaj rad se bazira na elaboraciji važnosti biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji općenito te s posebnim naglaskom i kroz zasebna poglavlja na lišće masline i majčinu dušicu. Potom će se istražiti 4 inovativne tehnike u ekstrakciji bioaktivnih komponenata i opisati način kako funkcioniraju. Finalni naglasak će se staviti na poglavlje o primjeni ekstrakta lišća masline i ekstrakta majčine dušice u mljekarstvu. Cilj ovoga rada je prikazati dostignuća u primjeni ekstrakata lista masline (ELM) i majčine dušice (EMD) u mljekarstvu u posljednjih 5 godina.

**Broj stranica:** 32

**Broj slika:** 8

**Broj tablica:** 1

**Broj literaturnih navoda:** 91

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** sir, tehnologija, biljni ekstrakti, ekstrakt masline, ekstrakt majčine dušice

**Datum obrane:** 26.9.2024.

#### **Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr. sc. *Bojan Matijević*, prof. struč. stud.
2. dr. sc. *Marijana Blažić*, prof. struč. stud.
3. *Elizabeta Zandona*, mag. ing. bioproc., pred.
4. dr. sc. *Ines Cindrić*, prof. struč. stud. (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J. J. Strossmayera 9, 4700 Karlovac, Hrvatska.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**Karlovac University of Applied Sciences  
Department of Food Technology  
Professional Study of Food Technology**

**Final paper**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences  
Scientific Field: Food Technology**

### **THE POTENTIAL APPLICATION OF OLIVE LEAF EXTRACT (OLE) AND THYME EXTRACT (TE) IN THE ENHANCEMENT OF DAIRY PRODUCTS**

*Rebeka Jelinić*

**Final paper was performed at the Department of Food Technology of Karlovac University of Applied Sciences as part of the project „The impact of plant extracts addition on the ripening process and properties of semi-hard cheese (SIROFONIJA)“, Class: 602-01/23-01/392, Reg. no.: 2133-61-01-23-11.**

**Supervisor:** Elizabeta Zandona, mag. ing. bioproc., pred.

#### **Abstract**

Herbs, spices, vegetables and other seasonings are essentially flavourings added to cheese to diversify the flavour of the cheese for commercial purposes. Cheese is a food that is consumed all over the world. Its production from different types of milk and technologies allows people to get hundreds of varieties of products. This paper is based on the elaboration of the importance of plant extracts in the food industry in general and with special emphasis and through separate chapters on olive leaves and thyme. Then, 4 innovative techniques in the extraction of bioactive components will be investigated and the way they work will be described. The final emphasis will be placed on the chapter on the application of olive leaf extract and thyme extract in dairying. The aim of this paper is to present achievements in the application of olive leaf extracts (ELM) and thyme (EMD) in dairying in the last 5 years.

**Number of pages:32**

**Number of figures:8**

**Number of tables:1**

**Number of references: 91**

**Original in:** Croatian

**Key words:** cheese, technology, plant extracts, olive extract, thyme extract

**Date of the final paper defense:** 26.9.2024.

#### **Reviewers:**

1. Ph.D. *Bojan Matijević*, collage prof.
2. Ph.D. *Marijana Blažić*, collage prof.
3. *Elizabeta Zandona*, MSc, lecturer
4. Ph.D. *Ines Cindrić*, collage prof. (substitute)

**Final paper deposited in: Library of Karlovac University of Applied Sciences, Trg J. J. Strossmayera 9, Karlovac, Croatia.**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Značaj biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji .....	2
2.1.1. Fenolni spojevi.....	3
2.1.2. Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva .....	4
2.1.3. Antimikrobna svojstva fenolnih spojeva .....	5
2.2. List masline .....	6
2.2.1. Bioaktivni profil lista masline.....	7
2.3. Majčina dušica .....	10
2.3.1. Bioaktivni profil majčine dušice .....	11
2.4. Inovativne tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenata.....	13
2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) .....	13
2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) .....	14
2.4.3. Superkrična CO <sub>2</sub> ekstrakcija (SC-CO <sub>2</sub> ).....	15
2.4.4. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE) .....	16
2.5. Primjena ekstrakta lista masline i ekstrakta majčine dušice u mljekarstvu .....	17
2.5.1. ELM i EMD u preradi mlijeka.....	17
2.5.2. ELM i EMD u proizvodnji jogurta i kefira.....	18
2.5.3. ELM i EMD u proizvodnji sira.....	20
<b>3. ZAKLJUČCI</b> .....	22
<b>4. LITERATURA</b> .....	23



# 1. UVOD

Sirevi obogaćeni ljekovitim i začinskim biljem tradicionalno se proizvode u brojnim zemljama, koristeći kravlje, ovčje, kozje ili miješano mlijeko. Mnoge studije ukazuju na upotrebu različitih vrsta bilja i njihovih kombinacija, prilagođenih specifičnostima lokalnog podneblja. Ljekovito bilje, povrće i razni začini prvenstveno se koriste za obogaćivanje okusa sira, čime se povećava njegova privlačnost na tržištu. Ovi aditivi također pridonose boji sira i poboljšavaju njegovu prezentaciju, čineći ga privlačnijim za potrošače. S obzirom na to da su često u obliku prašaka ili sitno sjeckanih čestica, obično se dodaju nakon ocjeđivanja sirutke kako bi se osiguralo ravnomjerno miješanje. Neki sirevi se premazuju začinskim biljem ili začinama, dok drugi sazrijevaju u njihovoj prisutnosti. Važno je da arome budu izvrsne mikrobiološke kvalitete kako ne bi unijele nepoželjne mikroorganizme koji bi mogli narušiti željeni okus i jedinstvenu aromu sira. Uobičajeni dodaci sirevima uključuju crvenu i zelenu papriku (poput paprike, habanero, chipotle, jalapeno, cayenne), crni papar, hren, timijan, klinčić, kumin, kim, peršin, estragon, muškatni oraščić, bosiljak, luk/češnjak i sušene rajčice. Ostali okusi uključuju tekući i prirodni dim, čađu/pepeo, pivo, vino te orašaste plodove poput badema i oraha. Dodaci se obično koriste u količinama manjim od 1% mase gruša, iako se u nekim sirevima koriste i veće količine.

Ovaj rad se fokusira na značaj biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji, s posebnim naglaskom na ekstrakte lista masline i majčine dušice. Detaljno će se istražiti četiri inovativne tehnike za ekstrakciju bioaktivnih komponenata, uz opis njihovog načina funkcioniranja. Posebna pažnja bit će posvećena primjeni ekstrakta lista masline (ELM) i majčine dušice (EMD) u mljekarstvu, uz analizu rezultata istraživanja postojećih studija na tu temu.

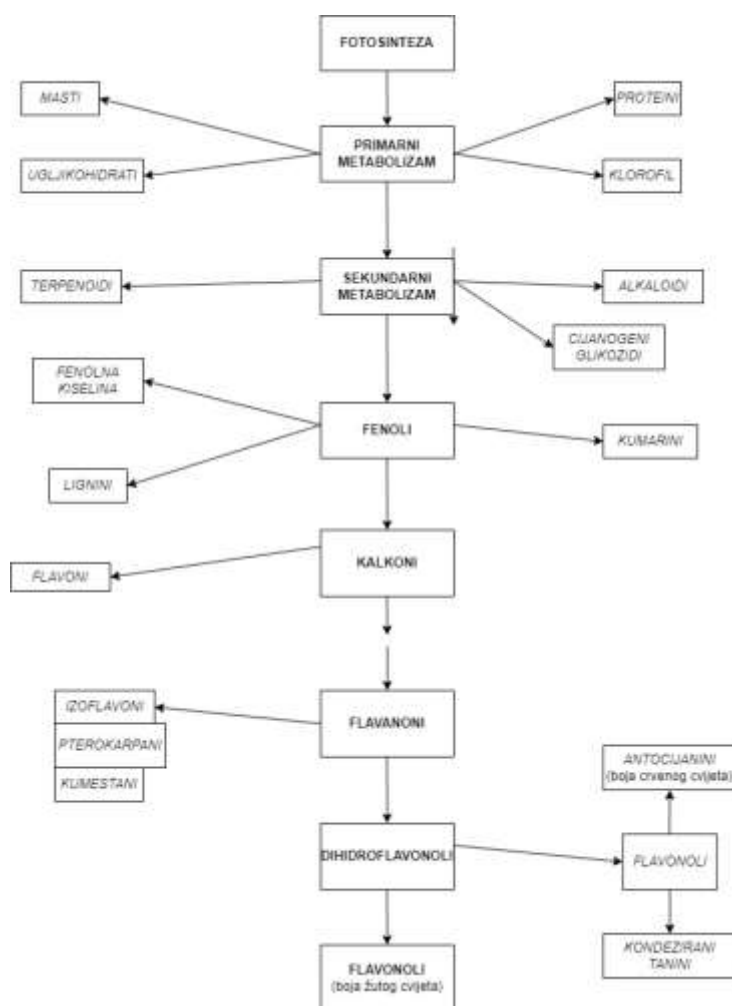
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Značaj biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji

Ekstrakcija je važna operacija u prehrambenom inženjerstvu, jer omogućuje dobivanje vrijednih topivih komponenti iz sirovina. Biljni ekstrakti dobivaju se iz biljnih dijelova kao što su listovi, cvjetovi, plodovi, sjemenke, kore, kora i korijenje. Ekstrakti dobiveni iz različitih izvora i dijelova biljke imaju različite funkcije u prehrambenoj industriji, a najčešće se upotrebljavaju kao antioksidansi, antimikrobna sredstva, sredstva za poboljšanje okusa, sredstva za bojenje, izvor određenih enzima, pojačivači hranjivih tvari i aditivi (Mir i sur, 2022). Zbog sve većih troškova energije i zabrinutosti za očuvanje okoliša, stručnjaci u prehrambenoj industriji teže primjeni poboljšanih tehnika ekstrakcije koje zahtijevaju manje otapala i manju potrošnje energije. Pri tome se naglasak stavlja na primjenu netermalnih tehnika ekstrakcije, iskorištavanje nusproizvoda kao dobrih izvora bioaktivnih komponenata, te na „zero-waste“ i „clean-label“ principe s ciljem smanjenja ekološkog otiska, očuvanja prirodnih resursa i pružanja sigurnijih, prirodnijih proizvoda potrošačima. Ove inovativne metode ne samo da poboljšavaju učinkovitost procesa, već i osiguravaju održivost i odgovornost prema okolišu u prehrambenoj industriji. Inovativne tehnike ekstrakcije, poput ultrazvučne ekstrakcije, ekstrakcije visokim tlakom i superkritične fluidne ekstrakcije, imaju značajnu ulogu u primjeni biljnih ekstrakata u mljekarstvu. Ove tehnike omogućuju učinkovitiju ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz biljaka, smanjujući pritom upotrebu otapala i energiju potrebnu za proces. Primjena biljnih ekstrakata u proizvodnji mliječnih proizvoda može poboljšati nutritivna svojstva, produžiti rok trajanja i obogatiti proizvode funkcionalnim sastojcima koji doprinose zdravlju potrošača. Prema istraživanju koje su proveli Chemat i sur. (2017), inovativne tehnike ekstrakcije značajno doprinose održivosti i kvaliteti prehrambenih proizvoda, omogućujući proizvođačima da odgovore na rastuće zahtjeve za prirodnim i zdravim sastojcima. Biljke su bogati izvori bioaktivnih spojeva koji pomažu u poboljšanju kvalitete i sigurnosti različitih vrsta prehrambenih proizvoda. Bogati su nositelji aromatskih i fenolnih spojeva čiji dodatak može dati karakterističan okus i svojstva određenim namirnicama. Osim što su nositelji spojeva bogatog okusa, biljni ekstrakti često djeluju i kao antioksidansi, antimikrobiotici i mogu imati terapijska svojstva. Bioaktivni spojevi raspoređeni su u biljnim tkivima i stanicama, a njihova koncentracija i svojstva ovise o biljnoj vrsti, korištenom dijelu biljke, stupnju zrelosti, metodama ekstrakcije itd..

### 2.1.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi obuhvaćaju raznovrsne kemijske strukture koje sadrže fenolnu ili hidroksilnu skupinu vezanu na aromatski prsten. Ovi spojevi često se nalaze u biljkama u obliku sekundarnih metabolita poput glikozida ili estera šećera, a smješteni su u vakuolama. Fenolni spojevi su usko povezani sa senzornom i nutritivnom kvalitetom svježe i prerađene biljne hrane. U biljkama se formira veliki broj fenolnih sekundarnih metabolita, a među njima su i spojevi koji se otapaju u organskim otapalima, dok su neki rastvorljivi u vodi, a neki se pojavljuju u obliku velikih, netopivih polimera (Slika 1).



**Slika 1.** Međuodnosi primarnog i sekundarnog metabolizma u biljaka (Reis Giada, 2013).

Fenolni spojevi variraju u strukturi, od jednostavnih molekula poput vanilina, galne i kofeinske kiseline, do složenih polifenola kao što su stilbeni, flavonoidi i različiti polimeri. Ovi spojevi raspoređeni su u tkivima i stanicama biljaka, a njihova brojnost ovisi o vrsti biljke, dijelu biljke koji se koristi za ekstrakciju, stupnju zrelosti, izloženosti svjetlosti, i brojnim

drugim faktorima. (Cheynier, 2012). Najčešće zastupljena skupina fenolnih spojeva su flavonoidi koji biljci služe kao UV zaštitnici u obrani patogena, za komunikaciju biljaka i mikroorganizama i regulaciju reaktivnih vrsta kisika (Ferreyra i sur., 2021). Mnogi fenolni spojevi u biljkama su dobri izvori prirodnih antioksidansa. Veliki je značaj otkrića posljednjih godina da mnogi fenolni spojevi u hrani imaju inhibitorne učinke na mutagenezu i karcinogenezu (Shahidi i sur., 2015).

### **2.1.2. Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva**

Oksidacija hrane, koja rezultira užeglošću, pored mikrobnog kvarenja drugi je najvažniji uzrok kvarenja hrane. Prirodni antioksidansi u voću i povrću hvataju štetne slobodne radikale te tako djeluju zaštitno od oksidacije, poboljšavaju hranjivu vrijednost i sprječavaju kvarenje hrane. Osim toga, oksidativni stres je uključen, kao uzrok ili posljedica, u nastanak i razvoj preko 100 ljudskih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, starenje, rak i neurodegenerativne bolesti. Unosom antioksidansa može spriječiti unutarstaničnu oksidaciju, odnosno smanjiti oksidativni stres i potencijalno prevenirati nastanak većine degenerativnih bolesti (Poljsak i sur, 2021). Prema Tu i sur. (2017) antioksidansi mogu imati dihotomne uloge u proizvodnji reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Lako se oksidiraju i mogu djelovati kao oksidansi uzrokujući oštećenja kada su prisutni u velikim koncentracijama. Međutim, oksidirani oblici prirodnih antioksidansa relativno su inertni prema biomolekulama. Na primjer, oksidirani oblici askorbata (askorbatni radikal i dehidroaskorbat), fenoksilni radikali, tokoferoksilni radikali i likopenski radikali relativno su stabilni i nereaktivni te ne uzrokuju oštećenje stanica niti iniciraju peroksidaciju lipida. Štetni slobodni radikali mogu nastati Fentonovim i Haber-Weissovima reakcijama kada reducirani oblici redoks-aktivnih metalnih iona i vodikovog peroksida u prisutnosti antioksidansa proizvode reaktivne hidroksilne radikale. Ograničavajući faktor unutar stanica je vodikov peroksid koji nastaje tijekom autooksidacije sintetskih antioksidansa poput vitamina C, E i drugih. Može reducirati slobodno željezo  $Fe^{2+}$  i druge metalne ione (krom, kobalt, bakar i vanadij), koji pokreću stvaranje slobodnih radikala kroz Fentonove reakcije.

U svijetu postoji veliki interes za fitokemikalije kao bioaktivne komponente hrane jer njihova konzumacija može prevenirati neke bolesti zahvaljujući visokoj antioksidacijskoj aktivnosti istih. Biljni ekstrakti ne sadrže samo jednu fenolnu komponentu, već su mješavina različitih spojeva, pri čemu koncentracija svakog spoja utječe na ukupnu antioksidacijsku aktivnost, koja je, pak, određena specifičnim sastavom ekstrakta. Dokazi iz epidemioloških

studija pokazuju da dugotrajna konzumacija hrane bogate polifenolima pruža zaštitu od razvoja kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti, raka i dijabetesa (Rienks i sur., 2017) Polifenoli imaju pozitivan utjecaj na zdravlje ljudskog organizma zbog njihovih antioksidacijskih i protuupalnih svojstava. Apsorpcija i metabolizam polifenola opsežno su opisani u brojnim studijama (Rajha i sur.,2021; Zhao i sur., 2021; Saint-Georges-Chaumet, 2016). Crijevna mikrobiota ima ključnu ulogu u procesu apsorpcije. Za osobe koje redovito konzumiraju vino, pivo, kavu i čaj, ova pića predstavljaju glavne izvore prehrambenih polifenola. Sadržaj polifenola u hrani i pićima uvelike ovisi o uzgoju i tehnološkim procesima (Nardini, 2022). Zdravstvena svojstva voća, povrća, kulinarskog bilja i začina također proizlaze iz prisutnosti niskomolekularnih antioksidansa koji štite stanice i njihove strukture od oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja. Uočena je pozitivna korelacija između konzumacije cijelog voća i povrća i prevencije bolesti, poput ateroskleroze, raka, dijabetesa, artritisa, poboljšanog kardiovaskularnog i neurološkog zdravlja, smanjene incidencije raka, produljene dugovječnosti i smanjene ukupne smrtnosti. Nije poznato doprinosi li pojedinačni antioksidans ili sinergija nekoliko različitih antioksidansa (neki od njih možda neotkriveni) u voću i povrću prevenciji bolesti. Uočeni korisni učinci na zdravlje također mogu potjecati od drugih fitokemikalija prisutnih u hrani, poput dijetalnih vlakana, folata, vitamina, polifenola i kalija. Unos namirnica koje su prirodno bogate antioksidansima (dnevni unos od najmanje 400 g voća i povrća) široj javnosti preporučila je Svjetska zdravstvena organizacija kao način zaštite od kroničnih bolesti; međutim, ne postoji službena preporuka za vrstu, broj ili količinu antioksidansa koje treba konzumirati dnevno (Zhan i sur., 2017).

### **2.1.3. Antimikrobna svojstva fenolnih spojeva**

Polifenoli, posebno određene klase poput flavonoida i tanina, sve više privlače pažnju zbog svojih antimikrobnih svojstava koja se mogu pripisati njihovoj sposobnosti da generiraju reaktivne vrste kisika (ROS) koje uzrokuju oksidativni stres u bakterijskim stanicama. Studije su pokazale da polifenoli destabiliziraju bakterijske membrane i ometaju ključne enzimske procese, čime inhibiraju rast patogena, uključujući i one otporne na antibiotike. Na primjer, istraživanje Daglia (2012) ističe kako polifenoli posjeduju snažna antibakterijska svojstva zbog svoje sposobnosti oksidacije. Također, Taguri i sur. (2004) zaključili su da različite vrste polifenola, uključujući katehine i njihove oksidacijske proizvode, proantocijanidine i tanine, imaju antibakterijsko djelovanje protiv četiri skupine bakterija uzročnika kvarenja hrane. Osjetljivost bakterija na polifenole ovisila je o vrsti bakterije i strukturi polifenola, što dodatno potvrđuje potencijal fenolnih spojeva kao prirodnih antimikrobnih agenasa. Sposobnost

inhibiranja rasta mikroorganizama čini fenolne spojeve potencijalno korisnim za razvoj novih konzervansa u prehrambenoj industriji, kao odgovor na sve veći pritisak potrošača za smanjenjem upotrebe sintetičkih aditiva. Osim toga, s obzirom na rastuću otpornost mikroba na konvencionalne antibiotike, polifenoli su istraživani kao inovativni terapijski agensi u liječenju različitih mikrobioloških infekcija (Cushnie i Lamb, 2011; Puupponen-Pimiä i sur, 2001).

## **2.2. List masline**

Proizvodnja maslinovog ulja značajan je izvor ekonomske dobiti za mediteranske zemlje, s oko 98 posto globalne proizvodnje. Upotreba maslinovog ulja dramatično je porasla posljednjih godina, zahvaljujući njegovim organoleptičkim karakteristikama i sve većem poznavanju njegovih zdravstvenih prednosti. Uzgojem i preradom maslina stvaraju se značajne količine otpada, uključujući lišće masline, kominu i otpadne vode sa značajnim organskim opterećenjem. Zbrinjavanje nusproizvoda prerade masline veliki su ekonomski i ekološki problem za prerađivače. Budući da su navedeni nusproizvodi bogati biološki aktivnim komponentama, njihova daljnja prerada mogla bi biti od iznimne važnosti za prehrambenu, kozmetičku industriju, koje doista primjenjuju značajne količine korisnih organskih kiselina, ugljikohidrata, proteina, vlakana, i fenolnih materijala u razvoju proizvoda s dodanom vrijednošću. Međutim, ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz otpadnih materijala potencijalan je problem uslijed visokih troškova ekstrakcije, pročišćavanja te detekcije i kvantifikacije pojedinih komponenata. Kako se povećala svijest o važnosti iskorištavanja nusproizvoda u agrobiotehničkom sektoru, i njihovoj primjeni u prehrambenoj industriji kao izvora važnih bioaktivnih komponenata poput polifenolnih spojeva, sve je više studija koje se bave ovom tematikom. Stabla masline mogu živjeti stotinama godina, a lišće masline se kroz povijest koristilo kao narodni lijek za suzbijanje groznice i drugih bolesti, poput malarije te su razlogom niske učestalost kardiovaskularnih bolesti i raka u mediteranskim zemljama (Benavente-Garcia i sur., 2000). Pozornost istraživača privukla je i mediteranska prehrana koja se sastoji od maslina, a smatra se da su proizvodi od maslina jedan od razloga za to. Iskorištavanje lišća masline zaostalog u procesu uzgoja i prerade masline također je privuklo značajan broj istraživača jer, osim ploda masline, list je također bogat fenolnim spojevima i potencijalan je materijal za njihovu ekstrakciju. Struktura i visoki antioksidativni kapacitet ovih fenola omogućuju korištenje ekstrakta lista masline u razvoju lijekova, kozmetičkih preparata, dodataka prehrani i razvoju funkcionalne hrane.

### 2.2.1. Bioaktivni profil lista masline

Bioaktivni spojevi prisutni u voći i povrću poput polifenola, karotenoida i antocijana, svojim potencijalnim antioksidativnim djelovanjem nude brojne zdravstvene prednosti uključujući zaštitu od kardiovaskularnih bolesti i raka. Glavni bioaktivni sastojci ploda masline, poput hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), njegovg estera s glikozidom elenolne kiseline (oleuropein ili oleuropeozid) i srodnih derivata, mogu biti razlog zašto lišće masline predstavlja važnu komponentu u prehrambenoj industriji.

**Tablica 1.** Antioksidativni kapaciteti fenolnih spojeva u ekstraktu lišća masline (prema Benavente-Garcia i sur., 2000)

FENOLNI SPOJEVI	UDIO (%suhe tvari)	ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET (mM TEAC)
Ekstrakt	-	1,58 ±0,06
Oleuropein	24,54	0,88±0,09
Hidroksitirozol	1,46	1,57±0,12
Luteolin-7-glukozid	1,38	0,71±0,04
Apigenin-7-glukozid	1,37	0,42±0,03
Verbaskozid	1,11	1,02±0,07
Tirosol	0,71	0,35±0,35
Vanilinska kiselina	0,63	0,67±0,09
Diosmetin-7-glukozid	0,54	0,64±0,09
Kafeinska kiselina	0,34	1,37±0,08
Luteolin	0,21	2,25±0,11
Rutin	0,05	2,75±0,05
Diosmetin	0,05	1,42±0,07
Vanilin	0,05	0,13±0,01
Katehin	0,04	2,28±0,04

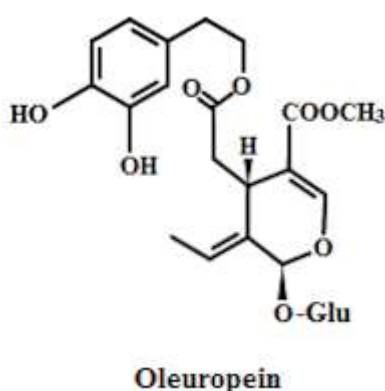
\*TEAC – Antioksidativni kapacitet ekvivalentan Troloxu

Bioaktivni spojevi lišća masline uključuju sekoiridoide (oleuropein, oleuropeinaglikon, ligstrozid, dimetiloleuropein, oleozid i dialdehide elenolne kiseline), flavonoide (luteolin 7,4'-O-diglukozid, luteolin 7-O-glukozid, apigenin 7-O-rutinozid, luteolin 4'-O-glukozid, kvercitrin, apigenin, kemferol, luteolin, rutin i diosmetin) i fenolne spojeve (kafeinska kiselina,

tirozol i hidroksitirozol) (Tablica 1) (Rahmanian, 2015). Najzastupljeniji fenolni spojevi prisutni u lišću masline su oleuropein i hidroksitirozol (Erbay i Icier, 2010).

### 2.2.1.1. Oleuropein

Oleuropein je glavni sastojak porodice sekoiridoidea. To je gorki spoj koji se ponajviše nalazi u nezrelim plodovima masline, a njegova se količina smanjuje tijekom sazrijevanja uslijed pretvorbe u hidroksitirozol. Oleuropein su u maslinama prvi put otkrili Bourquelot i Vintilesco (1908), ali njegovu kemijsku strukturu (Slika 2.) dodijelili su Panizzi i dr. (1960). Specificirana je kao heterozidni ester elenolne kiseline i dihidroksifeniletanola.



**Slika 2.** Strukturni prikaz oleuropeina (Zorić, 2017)

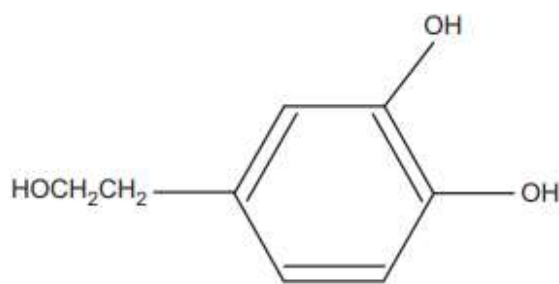
Spojevi koji imaju ortodifenolnu (kateholnu) poznati su po svom snažnom antioksidativno djelovanju. U slučaju oleuropeina njegova visoka antioksidativna aktivnost pripisuje se prisutnosti o-dihidroksi (katehol) strukture. Ipak, čisti oleuropein ima ograničen antioksidativni kapacitet, dok ekstrakt maslinovog lista pokazuje znatno veću antioksidativnu aktivnost, koja nadmašuje i vitamine C i E, kao i čisti hidroksitirozol, inače snažan antioksidans (Benavente - Garcia i sur., 2000). Ova razlika u antioksidativnom kapacitetu može se objasniti na dva načina. Prvo, moguće je da se oleuropein tijekom hidrolize pretvara u hidroksitirozol, čime se povećava antioksidativna aktivnost ekstrakta. Drugo, sinergistički učinak različitih fenolnih spojeva prisutnih u maslinovom lišću također može pridonijeti poboljšanom antioksidativnom kapacitetu (Erbay i Icier, 2010). Oleuropein, bioaktivni spoj iz lišća masline pokazuje širok spektar antimikrobnog djelovanja protiv različitih patogena, uključujući bakterije, gljivice i viruse. Istraživanja su otkrila da oleuropein može spriječiti sporulaciju *Bacillus cereus* te djeluje antimikrobno protiv *Salmonella enteritidis* (Borjan i sur. 2020). Osim toga, dokazano je da je učinkovit i protiv rodova *Klebsiella* i *Pseudomonas* koji su poznati po otpornosti na



antibiotike. Dodatno, oleuropein ima antimikrobni učinak protiv gljivice *Candida albicans* (Esfandiary i sur., 2024; Zorić i sur., 2022.). Daljnja istraživanja naglašavaju antivirna svojstva oleuropeina posebno protiv virusa herpes mononukleoze, virusa hepatitisa, rotavirusa i drugih (Micol i sur., 2005). Oleuropein također pokazuje antimikrobno djelovanje protiv nekoliko značajnih kliničkih bakterijskih sojeva, uključujući *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus* i *Staphylococcus aureus* (Bisignano i sur., 1999). Posebnu pažnju privlače studije usmjerene na anti-HIV potencijal oleuropeina i hidroksitirozola, sojeva izoliranih iz masline (Lee-Huang i sur., 2003). Ovi spojevi su dokazali sposobnost da višestruko djeluju protiv HIV-a, sprječavajući ulazak virusa u stanice i njegovu integraciju u stanično okruženje, čime se ističu kao potencijalno rješenje protiv virusne opasnosti (Erbay i Icier, 2010). Sve ove studije ukazuju na značajan potencijal oleuropeina i srodnih spojeva kao prirodnih antimikrobnih sredstava sa širokim spektrom djelovanja, što ih čini obećavajućim kandidatima za daljnji razvoj i primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

#### 2.2.1.2. Hidroksitirozol

Hidroksitirozol je jedan od najvažnijih fenolnih spojeva koji se nalaze u maslinama i maslinovom lišću, te se smatra jednim od najsnažnijih prirodnih antioksidanasa. Ovaj spoj nastaje kao primarni produkt razgradnje oleuropeina, koji je ključna komponenta maslina odgovorna za mnoge zdravstvene prednosti. Kako masline sazrijevaju, koncentracija hidroksitirozola raste, čime se povećava njegova prisutnost u zrelim maslinama i maslinovom ulju. Kemijska struktura hidroksitirozola (3,4-dihidroksifenil etanol) prikazana je na slici 3. i prikazuje njegovu jednostavnu, ali učinkovitu strukturu za neutralizaciju slobodnih radikala. Hidroksitirozol se apsorbira u crijevima, a njegov transport odvija se dvosmjerno mehanizmom pasivne difuzije (Manna i sur., 2000). Zbog svojih snažnih antioksidativnih svojstava, hidroksitirozol je predmet brojnih istraživanja koja istražuju njegov potencijal u prevenciji oksidativnog stresa povezanog s razvojem kardiovaskularnih bolesti, raka i neurodegenerativnih poremećaja (Zhang i sur., 2021). Antioksidativni kapacitet hidroksitirozola je čak veći od kapaciteta vitamina C i vitamina E, što ga čini izuzetno vrijednim spojem u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Međutim, ova jaka antioksidativna svojstva predstavljaju izazov pri ekstrakciji čistog hidroksitirozola iz prirodnih izvora, stoga procesi ekstrakcije moraju biti pažljivo kontrolirani kako bi se spriječila oksidacija i degradacija spoja, što zahtijeva specijalizirane metode i tehnologije.



**Slika 3.** Kemijska struktura hidroksitirozola (Erbay i Icier, 2010).

### 2.3. Majčina dušica

Majčina dušica (timijan, *lat. Thymus*) je višegodišnji divlji grm iz obitelji *Lamiaceae* i podrijetlom iz mediteranske regije, a danas je rasprostranjena po cijelom svijetu (slika 4.). Najpoznatije vrste su vrtni timijan ili prava majčina dušica (*T. vulgaris*) i poljski timijan (*T. serpyllum*).



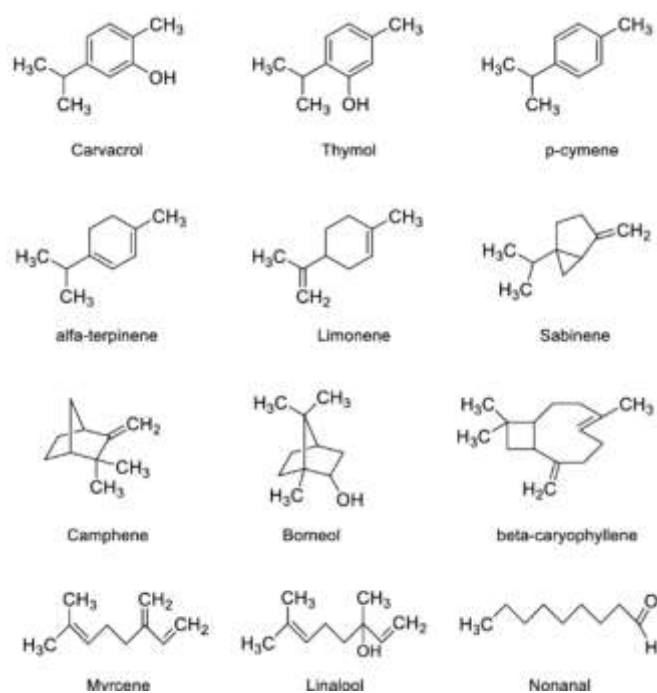
**Slika 4.** Majčina dušica (Anonymus, 2016)

Prava majčina dušica (*T. vulgaris*) smatra se važnom samoniklom jestivom biljkom koja je proučavana stoljećima zbog svoje jedinstvene važnosti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Bogata je fitonutrijentima, mineralima i vitaminima, gorkog je okusa, a opet bogata vlagom, proteinima, sirovim vlaknima, mineralima i vitaminima. Njen kemijski sastav može varirati ovisno o geografskom položaju, ali uglavnom se sastoji od flavonoida i antioksidansa. Studije pokazale su terapijske učinke majčine dušice i njenih eteričnih ulja, posebno timola i karvakrola, protiv raznih bolesti (Mancini i sur., 2015). To se pripisuje njegovim multifarmakološkim svojstvima koja uključuju antioksidativno, protuupalno i antineoplastično djelovanje. Štoviše, majčina dušica je odavno poznata po svom antivirusnom, antibakterijskom, antifungalnom i antiseptičkom djelovanju, te učinkovita u suzbijanju mikrobnih biofilmova (Tohidi i sur., 2017; Borugă i sur., 2014 ). Osim toga, u periodu pandemije SARS-CoV2 virusa (COVID-19) istraživana je i potencijal nekih sastojaka majčine

dušice u vezivanju virusa. Majčina dušica ima širok raspon funkcionalnih mogućnosti u hrani, lijekovima i drugim poljima te je značajan nutraceutik (Hammoudi i sur., 2022). Do sada objavljena literatura pokazuje da izravan dodatak prirodnih antioksidansa iz majčine dušice može spriječiti razvoj užeglosti u različitim vrstama namirnica. U tom kontekstu, provedena su brojna istraživanja s ciljem potvrđivanja antioksidativnog potencijala različitih ekstrakata majčine dušice.

### 2.3.1. Bioaktivni profil majčine dušice

Glavni spojevi u ulju majčine dušice su ugljikovodični i fenolni spojevi kao što su borneol, karvakrol, cimol, linalol, timol, tanin, apigenin, luteolin, saponini i triterpenska kiselina. Prevladavajuće komponente ulja *T. vulgaris* su timol i karvakrol (20%–54% od ukupnog sadržaja) (Yapici i sur, 2023). Eterična ulja dobivena iz majčine dušice pokazuju antiseptičko, antigljivično, antiparazitsko i antibakterijsko djelovanje. Majčina dušica sadrži karvakrol i timol kao bioaktivne spojeve, posebno u klasi fenolnih spojeva. Osim njih, sadrži i p-cimen,  $\alpha$ -terpinen, cimol, borneol, kariofilen, mircen, limonen, kamfen, linalol, sabinen, karen (Slika 5.).



**Slika 5.** Kemijska struktura odabranih bioloških aktivnih komponenata porijeklom iz majčine dušice (Yapici i sur, 2023).

### 2.3.1.1. Timol

Timol je fenolni spoj koji se prirodno nalazi u biljci majčine dušice (*Thymus vulgaris*), a također je prisutan i u manjim količinama u nekim drugim biljkama iz porodice usnača. Poznat je po svom intenzivnom, pikantnom mirisu i gorkom okusu, što ga čini vrijednim dodatkom prehrani za poboljšanje okusa, posebno u proizvodima poput sireva, mesnih prerađevina i likera. Osim kao dodatak prehrani, koristi se i kao prirodni konzervans, zahvaljujući svojim snažnim antimikrobnim svojstvima koja pomažu u produljenju trajnosti hrane. U narodnoj medicini, cijenjen je zbog svojih ljekovitih svojstava. Tradicionalno se koristi u liječenju respiratornih infekcija, upala grla i kašlja, te kao prirodni antiseptik za dezinfekciju rana. Brojne znanstvene studije dodatno potvrđuju širok spektar farmakoloških djelovanja timola. Dokazano je da posjeduje antiseptička, antibakterijska, antifungalna, antivirusna, antioksidativna, antireumatska i antikancerogena svojstva (Tohidi i sur., 2020; Salehi i sur., 2018; Li i sur., 2017; Codruta i sur., 2020; Tariq i sur., 2019; Schnitzler i sur., 2019). Njegova antiseptička svojstva čine ga korisnim u formulacijama za oralnu higijenu, poput vodica za ispiranje usta, gdje pomaže u smanjenju bakterijskog plaka i sprječavanju bolesti desni. Antifungalno djelovanje timola također ga čini učinkovitim u tretmanu gljivičnih infekcija, poput onih uzrokovanih *Candida* vrstama. Nadalje, pokazuje potencijal u inhibiranju rasta različitih patogenih bakterija, uključujući rezistentne sojeve, što ga čini relevantnim u istraživanjima antibiotske rezistencije (Sienkiewicz i sur., 2012). Osim toga, koristi se i u veterinarskoj medicini, osobito za kontrolu parazita kod pčela i domaćih životinja, što dodatno ukazuje na njegovu svestranost i učinkovitost u različitim područjima primjene.

### 2.3.1.2. Karvakrol

Karvakrol je prirodni fenolni spoj koji se primarno nalazi u esencijalnim uljima biljaka kao što su timijan (*Thymus vulgaris*) i origano (*Origanum vulgare*). Njegova prisutnost daje ovim biljkama njihov karakterističan, intenzivan miris i okus, koji se često koristi u kulinarstvu. Osim što doprinosi aromatičnim svojstvima, karvakrol je predmet intenzivnog istraživanja zbog svojih brojnih zdravstvenih koristi. Poznato je da ima širok spektar pozitivnih učinaka na zdravlje zahvaljujući snažnim antioksidativnim, protuupalnim, antibakterijskim i antifungalnim svojstvima (Aeschbach i sur., 1994). Antioksidativno djelovanje karvakrola pomaže u neutralizaciji slobodnih radikala u tijelu, čime se smanjuje oksidativni stres koji može doprinijeti razvoju kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti i raka. Antibakterijsko djelovanje istražuje se u kontekstu borbe protiv raznih patogenih bakterija, uključujući i one otporne na antibiotike. Karvakrol djeluje na način da narušava stanične

membrane bakterija, uzrokujući gubitak staničnog sadržaja i na kraju smrt bakterijskih stanica. Ovo čini karvakrol potencijalnim prirodnim konzervansom u prehrambenoj industriji, ali i važnim kandidatom za razvoj novih antimikrobnih terapija (Nostro i Papalia, 2012).

#### **2.4. Inovativne tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenata**

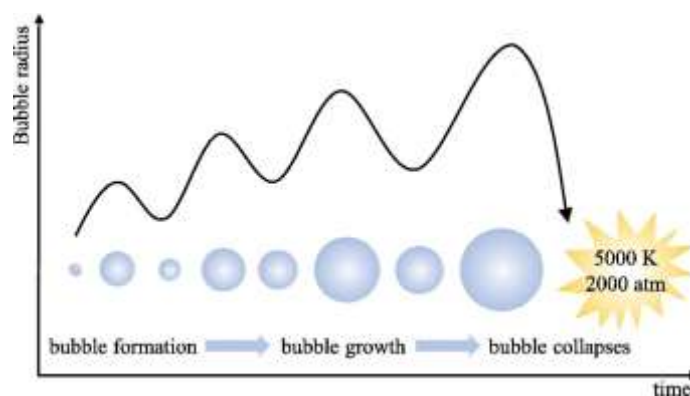
Danas u industriji parfema, kozmetike, hrane, biogoriva, lijekova i finih kemikalija rijetko postoji proizvodni proces koji ne uključuje neku vrstu ekstrakcije prirodnih spojeva (Chemat i sur., 2012). Ekstrakcija omogućuje izdvajanja određenih tvari iz čvrste (krute) tvari ili tekuće smjese odgovarajućim otapalom u kojem su te tvari topljive ili se bolje otapaju od preostalih sastojaka u smjesi. Princip ekstrakcije temelji se na molekularnoj difuziji pri čemu dolazi do izjednačavanja koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni kontakt. Ovaj proces se opisuje prvim Fickovim zakonom. Spoj dobiven ekstrakcijom izdvaja se u čistom obliku iz dobivene otopine kristalizacijom ili otparavanjem otapala (Lianfu i Zelong, 2008). Iako su konvencionalne metode široko primjenjive na industrijskoj razini imaju nekoliko nedostataka, uključujući nepotpuno iskorištenje ekstrakta, visoku potrošnju organskih otapala te visoku potrošnju energije, uzrokovanih izrazito dugim vremenom ekstrakcije i intenzivnim zagrijavanjem i/ili miješanje tijekom ekstrakcije (Rombaut i sur., 2014).

U ovom poglavlju analizirane su četiri ključne tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz biljnog materijala koje se temelje na načelima zelene kemije i zelene ekstrakcije. Ove tehnike usmjerene su na optimizaciju procesa kako bi se smanjila potrošnja energije, promovirala uporaba ekološki prihvatljivih i održivih otapala, te osigurala visoka kvaliteta i sigurnost dobivenih ekstrakata. Svaka od ovih tehnika doprinosi očuvanju okoliša i povećanju učinkovitosti ekstrakcije, istovremeno minimizirajući štetne utjecaje na zdravlje ljudi i ekosustav.

##### **2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom**

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE; *eng. Ultrasound-assisted extraction*) temelji se na mehanizmu kavitacije, gdje ultrazvučni valovi niske frekvencije (oko 20 kHz) uzrokuju stvaranje, rast i kolaps kavitacijskih mjehurića. Ovaj proces generira lokalno visoke temperature, tlakove i smična naprezanja, što rezultira permeabilizacijom staničnih stijenki i povećanim prinosom željenih spojeva. UAE ima mnoge prednosti, uključujući jednostavnost postupka, kraće vrijeme ekstrakcije, manju potrošnju otapala te mogućnost provođenja na sobnoj temperaturi, čime se smanjuje rizik od oksidacije i razgradnje ciljnih spojeva. UAE se često koristi za izolaciju bioaktivnih spojeva iz različitih prirodnih izvora. Ključni čimbenici

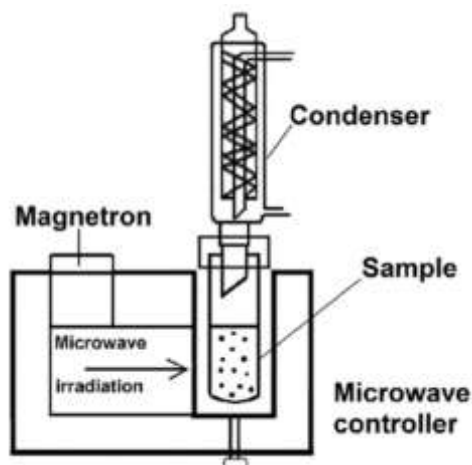
koji utječu na učinkovitost UAE su vrijeme ekstrakcije, sastav otapala i ulazna snaga, a optimizacija uvjeta može se provesti korištenjem modela prostorne krivulje. U usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom, polifenoli izdvojeni iz *Salvia officinalis* L. korištenjem UAE pokazali su 20% veći prinos, trostruko kraće vrijeme obrade i znatno manju potrošnju otapala (Rajha i sur., 2015). Provedene su brojne studije koje primjenjuju UAE za ekstrakciju bioaktivnih spojeva (npr. karotenoidi i masne kiseline) iz biomase različitih mikroalgi korištenjem UAE, a koje detaljno opisuju metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva, uključujući optimizaciju uvjeta i usporedbe s konvencionalnim metodama (Vintila i sur., 2022; Rodrigues i sur., 2018; Bin Latheef i Ngadi, 2011).



Slika 6. Kavitacijski učinak ultrazvuka (Shen i sur., 2023).

#### 2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE; eng. *Microwave-assisted extraction*) je postupak u kojem se mikrovalna energija koristi za zagrijavanje otapala koje je u kontaktu s uzorkom, što omogućava oslobađanje analita iz matrice uzorka u otapalo. Glavna prednost MAE je sposobnost brzog i ravnomjernog zagrijavanja smjese otapala i uzorka, što ovu tehniku čini posebno pogodnom za brzu ekstrakciju, uključujući ekstrakciju toplinski nestabilnih tvari. Detaljno su o tome pisali Chemat i Cravotto (2023), koji su obradili temeljne mehanizme, uključujući dielektrično zagrijavanje, te objasnili kako mikrovalna energija olakšava proces ekstrakcije promjenom struktura stanica. Također su raspravljali o optimizacijskim čimbenicima poput dielektrične konstante otapala, ulazne snage i temperature, pružajući uvid u učinkovitost metode za ekstrakciju bioaktivnih spojeva. MAE se često koristi kao konvencionalna tehnika za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz ljekovitog bilja. Prilikom razvoja metoda za ekstrakciju bioaktivnih komponenata, potrebno je optimizirati nekoliko parametara MAE-a, uključujući polaritet i volumen ekstrakcijskog otapala, veličinu uzorka, temperaturu i vrijeme ekstrakcije te snagu mikrovalova (Kataoka, 2019).



Slika 7. Shematski prikaz MAE ekstrakcije (Nemes, 2008).

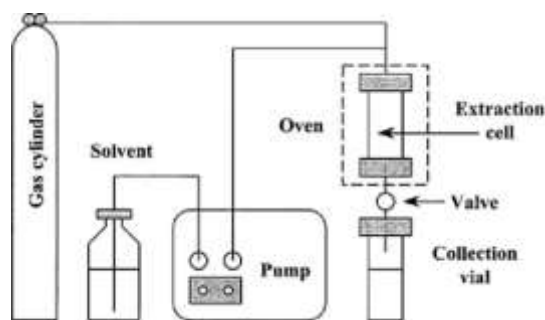
### 2.4.3. Superkrična CO<sub>2</sub> ekstrakcija

Superkrična CO<sub>2</sub> ekstrakcija (SC-CO<sub>2</sub>; eng. *Supercritical carbon dioxide extraction*) često se koristi za odvajanje različitih komponenata iz biljaka, jer omogućava proizvodnju čistih, bezpriekornih i sigurnih proizvoda. Ova metoda koristi ugljikov dioksid u superkričnom stanju, što je stanje materije u kojem tvar ima svojstva i plina i tekućine. U ovom stanju, CO<sub>2</sub> ima nisku viskoznost i visoku difuzivnost poput plina, ali također i gustoću poput tekućine, što mu omogućuje učinkovitu penetraciju u materijal i otapanje bioaktivnih spojeva. Superkrični CO<sub>2</sub> koristi se za izolaciju određenih komponenti iz različitih materijala, uključujući biljni materijal, začine, kavu, ulja i druge organske proizvode. Ključna prednost ove metode je mogućnost kontroliranja selektivnosti ekstrakcije promjenom pritiska i temperature, što omogućava prilagodbu procesa za ciljane spojeve. Osim toga, CO<sub>2</sub> je netoksičan, ne ostavlja štetne ostatke, i može se jednostavno ukloniti iz finalnog proizvoda isparavanjem. Prednosti SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije uključuju visoku selektivnost, nisku radnu temperaturu koja štiti osjetljive spojeve od degradacije, te ekološku prihvatljivost jer koristi CO<sub>2</sub> kao otapalo koje se može reciklirati. Ova metoda također omogućuje finu kontrolu nad ekstrakcijskim parametrima, što dovodi do visokog prinosa i čistoće ekstrakta. Primjeri primjene SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije uključuju proizvodnju esencijalnih ulja, dekafeinaciju kave, te izolaciju aktivnih spojeva iz ljekovitog bilja (Vidović i sur., 2021; Molnar i sur., 2017; Aladić i sur., 2015). Ključni parametri koji utječu na SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciju su temperatura, pritisak, te dodatak su otapala koje može povećati učinkovitost ekstrakcije polarnih spojeva. Na primjer, pritisak iznad 73.8 bara i temperatura iznad 31.1°C omogućuju CO<sub>2</sub> da postigne superkrično

stanje, gdje može učinkovito otopiti nepolarne spojeve, dok dodatak etanola kao suotapala može pomoći u ekstrakciji polarnih spojeva.

#### 2.4.4. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE; eng. *Pressurized liquid extraction*) je tehnika ekstrakcije kruto-tekuće koja koristi temperature i tlakove u rasponu od 50 do 200 °C odnosno 35 do 200 bara. Ova metoda koristi otapala blizu superkritičnog područja, što omogućuje povećanu topljivost i bržu difuziju analita. Temperatura i tlak u PLE su ključni parametri jer omogućuju otapalu da efikasnije penetrira u matricu i ekstrahira ciljne spojeve. PLE je metoda poznata po svojoj učinkovitosti i ekološkoj prihvatljivosti u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz različitih prirodnih izvora, posebno zbog mogućnosti korištenja manjih količina otapala i brzine postupka. Ekološka prihvatljivost je dodatno pojačana time što se mogu koristiti manje toksična otapala. Koristi se za analizu i identifikaciju širokog spektra analita u uzorcima hrane. Postupak ekstrakcije započinje ravnomjernim raspršivanjem uzorka inertnim materijalom (npr. sredstvom za sušenje ili pijeskom) u posudi za ekstrakciju, čime se poboljšava kontakt otapala s uzorkom i povećava učinkovitost ekstrakcije. Ekstrakcija se sastoji od statičkog koraka, tijekom kojeg otapalo ostaje u kontaktu s uzorkom 0,5 do 20 minuta bez protoka, i dinamičkog koraka, gdje otapalo teče kroz uzorak, omogućujući prikupljanje ekstrakta. Ova kombinacija osigurava maksimalno iskorištenje analita. Postupak se može ponoviti ako je potrebno za povećanje iskorištenja analita. Iako nije nužna, viša temperatura se često koristi u PLE kako bi se ubrzala ekstrakcija i smanjile interakcije između analita i matrice. Viša temperatura može smanjiti viskoznost otapala, povećavajući difuziju analita u otapalo (Alvarez-Rivera i sur, 2020).



**Slika 8.** Shematski prikaz PLE ekstrakcije (de Koning, i sur., 2009).



## **2.5. Primjena ekstrakta lista masline i ekstrakta majčine dušice u mljekarstvu**

Pod pojmom „mliječni proizvodi“ ubrajamo namirnice kao što su mlijeko, jogurt, kefir, sir, sirutka itd. Mlijeko i mliječni proizvodi sadrže prehrambene i zaštitne tvari koje su organizmu potrebne za normalno funkcioniranje, uključujući hranjive tvari poput ugljikohidrata, bjelančevina, masti, vitamina i minerala. Prema podacima Organizacije za prehranu i poljoprivredu (FAO) na svjetskoj razini, više od 6 milijardi ljudi konzumira mlijeko i mliječne proizvode (FAO, 2021). Pozitivni učinci konzumacije mliječnih proizvoda su značajni, budući da sadrže sastojke koji su esencijalni za prehranu i zdravlje (Heaney, 2000). Mliječni proizvodi mogu se obogatiti dodatkom začina (cimet, klinčić, kurkuma, paprika, i dr.), biološki aktivnim komponentama (probiotici, prebiotici) (Iravani i sur., 2013), biljnim ekstraktima (matcha, majčina dušica, ekstrakt lista masline) (Palmeri i sur., 2019), vitaminima i mineralima (kalcij, vitamin D, željezo) (Zehedirad i sur., 2019). Mliječni proizvodi poput sira i fermentiranog mlijeka smatraju se jednim od najpopularnijih funkcionalnih prehrambenih matrica zbog njihovog značajnog udjela na tržištu mliječnih proizvoda, učestale konzumacije i prihvaćenosti među potrošačima koji su svjesni važnosti zdravlja. Osim toga, pogodan su medij za obogaćivanje prehrambeno vrijednim spojevima, posebno biljnim ekstraktima koji sadrže fenolne spojeve koji su odsutni u mlijeku i mliječnim proizvodima. Sve veći interes za konzumaciju mliječnih proizvoda potaknuo je istraživanja o obogaćivanju začinicima i biološki aktivnim komponentama s ciljem poboljšanja nutritivne i funkcionalne vrijednosti. Biljni ekstrakti sve se više koriste u istraživanjima kao dodaci mliječnim proizvodima zbog svojih polifenolnih spojeva, koji posjeduju jaka antimikrobna i antioksidativna svojstva (El Sayed i Youssef, 2019). Smatra se da njihov dodatak doprinosi poboljšanju funkcionalnosti i sigurnosti mliječnih proizvoda. U idućim poglavljima obuhvaćeni su primjeri suplementacije ekstrakta lista masline i ekstrakta majčine dušice u sektoru mljekarstva.

### **2.5.1. ELM i EMD u preradi mlijeka**

Prerada mlijeka je najvažniji proces u mliječnoj industriji, koji obuhvaća niz postupaka bitnih za poboljšanje sigurnosti, trajnosti, nutritivnih i funkcionalnih svojstava mlijeka (Walstra, 1999). Pasterizacija je jedan od ključnih procesa u proizvodnji mlijeka. Ova metoda uključuje zagrijavanje mlijeka na temperaturu od 72°C tijekom određenog vremena, s ciljem uništavanja patogenih organizama poput bakterija, virusa i parazita, uz minimalan utjecaj na hranjive vrijednosti i okus mlijeka (Fox i sur., 1998). Sterilizacija, s druge strane, uključuje izlaganje mlijeka višim temperaturama iznad 100°C, što uništava sve vrste mikroorganizama,

ali može uzrokovati promjene u okusu i sastavu mlijeka, iako sterilizirano mlijeko ima dulji rok trajanja (Reena, 2021). U novije vrijeme, sve veći značaj imaju metode obogaćivanja mlijeka prirodnim ekstraktima i dodacima koji mogu poboljšati nutritivnu vrijednost i produžiti trajnost na prirodan način. Istraživanja su pokazala da ekstrakt lista masline može učinkovito očuvati kvalitetu mlijeka, djelujući kao antimikrobno sredstvo, posebno protiv *Bacillus cereus*, te da može produljiti rok trajanja i stabilizirati nutritivni profil mlijeka smanjenjem aktivnosti enzima  $\alpha$ -glukozidaze (Palmeri i sur., 2019).

## 2.5.2. ELM i EMD u proizvodnji jogurta i kefira

### 2.5.2.1. ELM i EMD u proizvodnji jogurta

Jogurt je jedan od najpopularnijih fermentiranih mliječnih proizvoda, koji se proizvodi fermentacijom mlijeka uz dodatak specifičnih bakterijskih kultura, najčešće *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus* (Samaržija, 2014). Jogurti se mogu klasificirati na tekuće i čvrste, ovisno o njihovoj konzistenciji. Osnovni tehnološki procesi u proizvodnji jogurta uključuju pripremu mlijeka, homogenizaciju, toplinsku obradu, fermentaciju, hlađenje i pakiranje proizvoda. Priprema mlijeka uključuje prilagodbu udjela suhe tvari i mliječne masti. Homogenizacija ne samo da usitnjava i ravnomjerno raspoređuje mliječnu mast, već također povećava viskoznost i poboljšava konzistenciju proizvoda, što doprinosi punijem okusu i boljoj probavljivosti, te poboljšava strukturu gruš (Tratnik, 2012). Nakon homogenizacije slijedi toplinska obrada, koja ima za cilj uništavanje patogenih mikroorganizama i inaktivaciju enzima u mlijeku. Hlađenje nakon toplinske obrade priprema mlijeko za inokulaciju, koja uključuje dodavanje specifičnih mikrobnih kultura pri optimalnim temperaturama za njihov rast. Hlađenje i pakiranje jogurta variraju ovisno o vrsti proizvoda koji se proizvodi. Pakiranje se obično vrši u plastičnim čašicama ili kartonskoj ambalaži pod hermetičkim i aseptičnim uvjetima (Tratnik, 2012). Prema istraživanju Barkučić i sur. (2022), dodavanje ekstrakta lista masline u jogurt povećava antioksidativni kapacitet i smanjuje pH vrijednost jogurta, iako ekstrakt nije pokazao značajna antimikrobna svojstva. Organoleptička svojstva jogurta s ekstraktom lista masline pokazala su značajne promjene u okusu, boji i mirisu. Peker i Arslan (2016) zaključili su da je dodatak ekstrakta lista masline u jogurtu od marelice imao pozitivan utjecaj na fizičko-kemijska svojstva, uključujući sadržaj suhe tvari, pH vrijednost, proteine i pepeo. Također su primijetili povećanje broja *Streptococcus thermophilus* tijekom skladištenja, te poboljšanu antioksidativnu aktivnost jogurta. Zoidou i sur. (2017) istražili su dodatak oleuropeina, bilo u čistom obliku ili u obliku ELM, u kravlje mlijeko i jogurt s ciljem proizvodnje novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Njihovi rezultati pokazali su da je

oleuropein stabilan tijekom toplinske obrade, fermentacije i skladištenja, te da dodavanje ELM ili čistog oleuropeina u mlijeko i jogurt poboljšava njihovu čvrstoću, viskoznost i kapacitet zadržavanja vode, uz očuvanje svojstava poput pH, titracijske kiselosti i rasta bakterija mliječne kiseline, dok su senzorska svojstva proizvoda ostala prihvatljiva i slična konvencionalnim. Prema Pourghorban i sur. (2022) jogurt obogaćen maslinovim listom u prahu ili ekstraktom maslinovog lista može se smatrati funkcionalnom hranom i komercijalnim nutraceutikom zbog visokog sadržaja fenolnih spojeva i drugih bioaktivnih komponenti. Rezultati njihovog istraživanja ukazuju na poboljšanje antioksidativnih svojstava, produžavanje rok trajanja jogurta, te povećavanje održivosti *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, a nije potvrđen značajni učinak na *S. thermophilus*. Studija Akan i sur. (2022) pokazala je da se vodeni EMD može uspješno koristiti u proizvodnji probiotičkog jogurta, bez negativnog utjecaja na reološka i mikrobiološka svojstva. Međutim, jasno je da bi se senzorska svojstva proizvoda trebala poboljšati, s obzirom na to da senzorski okus jogurta s dodatkom ekstrakta opada kako se razdoblje skladištenja produžuje. Iako su ELM i EMD prepoznati po svojim antioksidativnim svojstvima i sposobnosti produženja roka trajanja, istraživanja ukazuju na to da njihova primjena može negativno utjecati na senzorska svojstva mliječnih proizvoda, poput okusa i teksture, što može smanjiti prihvatljivost proizvoda među potrošačima (Zoidou i sur., 2017).

#### 2.5.2.2. ELM i EMD u proizvodnji kefira

Kefir je fermentirani mliječni proizvod blagog kiselkastog okusa, proizveden fermentacijom mliječne kiseline i alkohola pomoću mezofilnih bakterija i kvasaca (Ahmed i sur., 2013). Konzumacija kefira ljudskom organizmu može donijeti niz zdravstvenih prednosti. Bogat je probioticima, vitaminima i mineralima. Može pozitivno djelovati u liječenju hipertenzije, artritisa, stresa i depresije te smanjenju kolesterola (John i sur., 2015). Proizvodnja kefira je proces fermentacije mlijeka uz pomoć kefirnih zrnaca. Mlijeko se pasteurizira radi uklanjanja neželjenih bakterija te se potom hladi na temperaturu 20°C-25°C koja je pogodna za fermentaciju. U mlijeko se zatim dodaju kefirna zrnca, te počinje fermentacija. U fermentaciji koja traje 12-24 sata mlijeko se pretvara u kefir uz stvaranje mliječne kiseline, alkohola i ugljičnog dioksida. Poslije fermentacije izdvajaju se kefirna zrnca koja se ponovno mogu koristiti, a kefir se pakira i hladi.

Primjena biljnih ekstrakata u proizvodnji kefira, poput ekstrakta lista masline i majčine dušice, može poboljšati nutritivne i funkcionalne karakteristike kefira, uključujući antioksidativne sposobnosti i senzorska svojstva te na taj način doprinijeti proizvodnji

zdravijeg i kvalitetnijeg konačnog proizvoda. U posljednje vrijeme provedeno je više studija koje se bave ovom tematikom. Ökur (2022) ispitali su potencijalni učinak na kvalitetu (fizikalno-kemijska svojstva, senzorska svojstva, sadržaj fenola i antioksidativne osobine) uzoraka kefira tijekom skladištenja na 4°C tijekom 21 dana te zaključili da kefir s dodatkom ELM može poslužiti kao funkcionalni kefir koji je koristan za ljudsko zdravlje. Marhamatizadeh i Goosheh (2016) ispitali su učinak različitih doza ekstrakata majčine dušice i različitih koncentracija *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum* na smanjenje fiksne količine aflatoksina u kefiru. Rezultati su pokazali da ekstrakti majčine dušice smanjuju količinu aflatoksina M1, a kombinacija ekstrakta majčine dušice s probiotskim bakterijama bila je učinkovitija u smanjenju aflatoksina M1 nego samostalni ekstrakt majčine dušice.

### 2.5.3. ELM i EMD u proizvodnji sira

Prema definiciji iz Pravilnika o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/2009), sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti, koji se dobivaju odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka, obranog ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, sirutke ili kombinacijom ovih proizvoda. Proizvodnja sira složen je proces koji obuhvaća niz koraka, počevši od pripreme mlijeka pa sve do zrenja sira. Svaki korak u proizvodnji može se optimizirati kako bi se poboljšala kvaliteta i specifične karakteristike konačnog proizvoda. Osnovni procesi u proizvodnji svih vrsta sireva uključuju koagulaciju mlijeka (sirenje), sušenje grušta te oblikovanje sirnog zrna. Postoji širok raspon sireva koji se razlikuju po teksturi, okusu i načinu proizvodnje, uključujući tvrde sireve poput parmezana, meke sireve poput briea i polutvrde sireve poput gaude. Sirevi pripadaju u skupinu hrane bogate nutrijentima jer su izvor visokokvalitetnih proteina, lipida, vitamina i minerala. Osim toga, smatraju i bogatim izvorom bioaktivnih peptida, to su specifični fragmenti proteina koji osim nutritivne vrijednosti pozitivno pridonose i određenim fiziološkim funkcijama (Rafiq i sur., 2020). Dodavanje ekstrakata s ciljem poboljšanja okusa, nutritivnih svojstava ili produženja roka trajanja proizvoda može se provoditi u različitim fazama proizvodnje sira. Prema rezultatima istraživanja koje su proveli Zandona i sur. (2024) dodatak ELM značajno je povećao koncentraciju ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativnu aktivnost u svim uzorcima sira, osobito pri višim koncentracijama. Također je utvrđeno da je enzimsko koagulacija mlijeka prethodno obogaćenog s ELM optimalan način proizvodnje sira kako bi se postigla željena svojstva sira. . Noori i sur. (2020) istražili su utjecaj ELM na preživljavanje *Lactobacillus casei* u UF siru tijekom 10 tjedana skladištenja u hladnim uvjetima. Rezultati su pokazali da je dodatak ekstrakta lista masline značajno povećao broj bakterija *L. casei* u siru, pri čemu su

uzorci s dodatkom 0,5% ekstrakta pokazali najbolja senzorska svojstva i najpoželjniji okus. Istraživanje koje su proveli Bleoanč i sur. (2016) potvrdilo je da se ekstrakt majčine dušice može koristiti u kombinaciji s visokim tlakom za inaktivaciju *L. monocytogenes* u svježem siru. Ubrzana inaktivacija postignuta je kada su visoki tlak i ekstrakt majčine dušice primijenjeni zajedno, u usporedbi s primjenom samo visokog tlaka. Ovi rezultati sugeriraju da primjena ekstrakta majčine dušice omogućuje upotrebu nižih tlakova za postizanje istog učinka, što je važno jer visoki tlak može negativno utjecati na strukturu svježeg sira, a kombinacija s ekstraktom može umanjiti taj nedostatak. U diplomskim radovima Lovrić (2018) i Hrvatin (2018) izrađenima na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu istraživan je utjecaj dodatka ekstrakta majčine dušice i protektivne kulture na svojstva i trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka. Rezultati su pokazali da primijenjeni ekstrakti produljuju trajnost proizvoda. Rezultati navedenih istraživanja upućuju na potencijalni pozitivan učinak EMD na produljenu trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka. Sir sa dodatkom EMD u oba primjera imao je značajno veći antioksidacijski kapacitet, koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva te duži rok trajnosti u usporedbi s kontrolnim uzorcima sira Karam-Allah i sur. (2024) istražili su učinak EMD na svojstva i kvalitetu bijelog mekog sira. Rezultati su pokazali da je EMD djelovao kao snažan antioksidans s vrijednostima DPPH ( $17,05 \pm 0,15$  mg TE/g), ukupnim fenolima ( $25,18 \pm 0,05$  mg GAE/g) i ukupnim flavonoidima ( $17,29 \pm 0,47$  mg CE/g). Ekstrakt u koncentraciji od 50 mg/ml pokazao je najjače antimikrobne učinke protiv ispitivanih patogenih bakterija, uključujući *Bacillus cereus* i *Pseudomonas aeruginosa*, dok je imao značajan utjecaj na smanjenje broja aerobnih mezofilnih i psihrofilnih bakterija. Tijekom 30 dana skladištenja, EMD poboljšalo je senzorska svojstva sira, pri čemu je sir obogaćen ekstraktom majčine dušice dobio najviše ocjene za okus.

Dodavanje biljnih ekstrakata poput ekstrakta lista masline (ELM) i ekstrakta majčine dušice (EMD) u proizvodnji sira pokazuje značajan potencijal za poboljšanje nutritivnih svojstava, antioksidativne aktivnosti, te produženje trajnosti proizvoda. Rezultati istraživanja ukazuju na to da kombiniranje ovih ekstrakata s odgovarajućim metodama koagulacije može optimizirati kvalitetu sira, obogaćujući ga fenolnim spojevima i poboljšavajući senzorska svojstva, što otvara mogućnosti za razvoj funkcionalnih sireva. Međutim, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se optimirale koncentracije fenolnih komponenata te njihova retencija u siru i stabilnost tijekom procesa zrenja (za sireve koji dozrijevaju) s ciljem postizanja zadovoljavajućih funkcionalnih i organoleptičkih svojstava.

### 3. ZAKLJUČCI

Na temelju dosad objavljenih publikacija u području primjene ekstrakta lista masline (ELM) i ekstrakta majčine dušice (EMD) može se zaključiti sljedeće:

1. ELM i EMD su bogati fenolnim spojevima, imaju značajna antioksidativna i antimikrobna svojstva, što ih čini pogodnim za primjenu u mliječnoj industriji.
2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), mikrovalovima (MAE), superkrična CO<sub>2</sub> ekstrakcija (SC-CO<sub>2</sub>) i ubrzana ekstrakcija otapalima (PLE) pokazale su se kao ključne metode za dobivanje ekstrakata visoke čistoće i bioaktivnosti.
3. Istraživanja su potvrdila da ELM i EMD, dobiveni ovim naprednim tehnikama, imaju značajna antioksidativna i antimikrobna svojstva, što ih čini pogodnima za primjenu
4. Primjena ELM-a i EMD-a u proizvodima poput sira, jogurta i kefira pokazala je pozitivne učinke na kvalitetu i trajnost proizvoda.
5. Povećanje antioksidativnog kapaciteta i produženje roka trajanja mliječnih proizvoda potvrđuje korisnost ovih biljnih ekstrakata u suvremenoj prehrambenoj industriji, osobito u kontekstu sve veće potražnje za prirodnim dodacima hrani.
6. Postoje izazovi vezani uz senzorska svojstva proizvoda obogaćenih biljnim ekstraktima, posebno kada je riječ o okusu i teksturi, što može utjecati na prihvatljivost kod potrošača.
7. ELM i EMD pokazuju veliki potencijal kao prirodni dodaci koji mogu poboljšati sigurnost i funkcionalnost mliječnih proizvoda. Daljnja istraživanja usmjerena na optimizaciju senzorskih karakteristika bit će ključna za širu primjenu ovih ekstrakata u prehrambenoj industriji.

## 4. LITERATURA

1. Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and chemical toxicology*, 32(1), 31-36.
2. Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. (2013). Kefir and health: a contemporary perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(5), 422-434.
3. Akan, E., Yerlikaya, O., Bayram, O. Y., & Kinik, O. (2022). Viability of probiotics, rheological and the sensorial properties of probiotic yogurts fortified with aqueous extracts of some plants. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94(3), e20211274.
4. Aladić, K., Jarni, K., Barbir, T., Vidović, S., Vladić, J., Bilić, M., & Jokić, S. (2015). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Industrial crops and products*, 76, 472-478.
5. Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J. A., & Ibañez, E. (2020). Pressurized liquid extraction. In *Liquid-phase* ISBN 9780128169117, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>
6. Anonymus (2016). *Majčina dušica* <https://www.agroklub.com/hortikultura/majcina-dušica-ljekoviti-grm-koji-voli-susu/26500/> Pristupljeno: 21.08.2024
7. Barukčić, I.; Filipan, K.; Lisak Jakopović, K.; Božanić, R.; Blažić, M.; Repajić, M. The Potential of Olive Leaf Extract as a Functional Ingredient in Yoghurt Production: The Effects on Fermentation, Rheology, Sensory, and Antioxidant Properties of Cow Milk Yoghurt. *Foods* 2022, 11, 701. <https://doi.org/10.3390/foods11050701>
8. Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A. D. R. J., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food chemistry*, 68(4), 457-462.
9. Bin Latheef, M., & Ngadi, M. O. (2011, September). ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF LIPIDS FROM MICROALGAE. In *JOURNAL OF PHYCOLOGY* (Vol. 47, pp. S85-S85). COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA: WILEY-BLACKWELL.
10. Bleoancă, I., Saje, K., Mihalcea, L., Oniciuc, E. A., Smole-Mozina, S., Nicolau, A. I., & Borda, D. (2016). Contribution of high pressure and thyme extract to control *Listeria monocytogenes* in fresh cheese-A hurdle approach. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 7-14.

11. Borjan, D.; Leitgeb, M.; Knez, Ž.; Hrnčič, M.K. Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules* 2020, 25, 5946. <https://doi.org/10.3390/molecules25245946>
12. Borugă, O.; Jianu, C.; Mișcă, C.; Goleț, I.; Gruia, A.T.; Horhat, F.G. *Thymus vulgaris* Essential Oil: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *J. Med. Life* 2014, 7, 56–60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4391421/>
13. Bourquelot, E., & Vintilesco, J. (1908). Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retré de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci. Paris*, 147, 533-535.
14. Chemat, F., & Cravotto, G. (Eds.). (2012). *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice* (Vol. 4). Springer Science & Business Media.
15. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of foo and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 34, Pages 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
16. Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8615-8627.
17. Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry reviews*, 11(2), 153-177
18. Codruta, H.S.; Lorena, F.; Oliviu, V.; Cristina, M.; Doina, M.; Adela, I.C.; Mirela, M. Essential Oil-Bearing Plants from Balkan Peninsula: Promising Sources for New Drug Candidates for the Prevention and Treatment of Diabetes Mellitus and Dyslipidemia. *Front. Pharmacol.* 2020, 11, 989 <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2020.00989/full>
19. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2), 99-107.
20. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
21. de Koning, S., Janssen, H. G., & Brinkman, U. A. T. (2009). Modern methods of sample preparation for GC analysis. *Chromatographia*, 69, 33-78. <https://link.springer.com/article/10.1365/s10337-008-0937-3>



22. El-Sayed, S. M., & Youssef, A. M. (2019). Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon*, 5(6).
23. Esfandiary, M. A., Khosravi, A. R., Asadi, S., Nikaein, D., Hassan, J., & Sharifzadeh, A. (2024). Antimicrobial and anti-biofilm properties of oleuropein against *Escherichia coli* and fluconazole-resistant isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *BMC microbiology*, 24(1), 1-12.
24. FAO (2021). "The State of Food Security and Nutrition in the World 2021." Food and Agriculture Organization of the United Nations.
25. Ferreyra, M. L. F., Serra, P., & Casati, P. (2021). Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia plantarum*, 173(3), 736-749. doi: 10.1111/ppl.13543. Epub 2021 Sep 9. PMID: 34453749.
26. Fox, P. F., McSweeney, P. L., & Paul, L. H. (1998). Dairy chemistry and biochemistry.
27. Giuseppe Bisignano, Antonio Tomaino, Rossella Lo Cascio, Giuseppe Crisafi, Nicola Uccella, Antonella Saija, On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 51, Issue 8, August 1999, Pages 971–974,
28. Hammoudi Halat D, Krayem M, Khaled S, Younes S. A Focused Insight into Thyme (2022) Biological, Chemical, and Therapeutic Properties of an Indigenous Mediterranean Herb. *Nutrients*; 14(10):2104. doi: 10.3390/nu14102104. PMID: 35631245; PMCID: PMC9147557.
29. Heaney, R. P. (2000). Calcium, dairy products and osteoporosis. *Journal of the American college of nutrition*, 19(sup2), 83S-99S.
30. Hrvatin, L. (2018). Utjecaj dodatka ekstrakta majčine dušice i protektivne kulture na svojstva i trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:35991>
31. Irvani, S., Korbekandi, H., & Mirmohammadi, S. V. (2014). Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4679–4696. doi:10.1007/s13197-014-1516-2
32. Jalloul, A.B.; Ayadi, N.; Klai, A.; Abderrabba, M. (2022) Functionalization of Pasteurized Milk Using Rosemary, Thyme, and Ammoides Aqueous Extracts for Better Microbial Quality and an Improved Antioxidant Activity. *Molecules*, 27, 3725. <https://doi.org/10.3390/molecules27123725>

33. John, S. M., & Deeseenthum, S. (2015). Properties and benefits of kefir-A review. *Songklanakar Journal of Science & Technology*, 37(3).
34. Karam-Allah, A. A. K., Fathy Mohamed, D. M., & Kholif, A. M. (2024). Effect of Thyme Extract on Antioxidant, Antimicrobial Properties, and Nutritional Value of White Soft Cheese. *Egyptian Journal of Chemistry*, 67(8), 609-621.
35. Kataoka, H. (2019) *Pharmaceutical Analysis | Sample Preparation*☆, Editor(s): Paul Worsfold, Colin Poole, Alan Townshend, Manuel Miró, *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, Academic Press, Pages 231-255, ISBN 9780081019849, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14358-6>.
36. L.Panizzi, M.L.Scarpati, G.Oriente, *Gazz.ChimJtal*, 90,1449 (1960)
37. Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P. L., Chang, Y. T., & Huang, P. L. (2003). Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(4), 1029-1037.
38. Li, Y., Wen, J. M., Du, C. J., Hu, S. M., Chen, J. X., Zhang, S. G., ... & Ding, K. F. (2017). Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 491(2), 530-536.
39. Lianfu Z., Zelong L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem*, 15(5): 731-737.
40. Lovrić, K. (2018). Utjecaj dodatka ekstrakata majčine dušice i cvjetova bazge na svojstva i trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:043196>
41. Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., & De Feo, V. (2015). Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules*, 20(7), <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/12016>
42. Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S., & Zappia, V. (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS letters*, 470(3), 341-344. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01350-8. PMID: 10745093

43. Marhamatizadeh, M. H., & Goosheh, S. R. (2016). The combined effect of thymus vulgaris extract and probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) on aflatoxin M<sup>1</sup> concentration in kefir beverage. *Italian Journal of Food Science*, 28(3), 517.
44. Marhamatizadeh, M. H., & Goosheh, S. R. (2016). The combined effect of thymus vulgaris extract and probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) on aflatoxin M<sup>1</sup> concentration in kefir beverage. *Italian Journal of Food Science*, 28(3), 517.
45. Micol V, Caturla N, Pérez-Fons L, Más V, Pérez L, Estepa A. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res.* 2005 Jun;66(2-3):129-36. doi: 10.1016/j.antiviral.2005.02.005. Epub 2005 Apr 18. PMID: 15869811.
46. Mir, S. A., Shah, M. A., & Manickavasagan, A. (2022). Sources of plant extracts. In *Plant extracts: applications in the food industry* (pp. 1-22). Academic Press.
47. Molnar, M., Jerković, I., Suknović, D., Bilić Rajs, B., Aladić, K., Šubarić, D., & Jokić, S. (2017). Screening of six medicinal plant extracts obtained by two conventional methods and supercritical CO<sub>2</sub> extraction targeted on coumarin content, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity and total phenols content. *Molecules*, 22(3), 348.
48. Nardini M. (2022) Phenolic Compounds in Food: Characterization and Health Benefits. *Molecules*; 27(3):783. doi: 10.3390/molecules27030783. PMID: 35164044; PMCID: PMC8839921.
49. Narodne novine (2009). Pravilnika o sirevima i proizvodima od sireva. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_02\\_20\\_446.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_02_20_446.html) Pristupljeno: 29.08.2024
50. Nemes, S. (2008). Microwave-assisted extraction (MAE) of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) from flaxseed. [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-focused-MAE-system\\_fig5\\_30001935](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-focused-MAE-system_fig5_30001935) Pristupljeno: 5.9.2024
51. Noori, N., Rajabian, M., Nasrabadi, H. G., & Soofiani, M. R. A. (2020). Effect of *Olea europaea* Leaf Extract as A Prebiotic on Survival of *Lactobacillus casei* in UF Cheese During Cold Storage. *Journal of Veterinary Research/Majallah-i Tahqīqāt-i Dāmpizishkī University*, 75(1).
52. Nostro, A., & Papalia, T. (2012). Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 7(1), 28-35.

53. Okur, Ö. D. (2022). An evaluation of the quality characteristics of kefir fortified with olive (*Olea europaea*) leaf extract. *British Food Journal*, 124(5), 1727-1736.
54. Palmeri, R., Parafati, L., Trippa, D., Siracusa, L., Arena, E., Restuccia, C., & Fallico, B. (2019). Addition of olive leaf extract (OLE) for producing fortified fresh pasteurized milk with an extended shelf life. *Antioxidants*, 8(8), 255.
55. Peker, H., & Arslan, S. (2017). Effect of olive leaf extract on the quality of low fat apricot yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13107. doi:10.1111/jfpp.13107
56. Poljsak B, Kovač V, Milisav I. (2021) *Antioxidants, Food Processing and Health. Antioxidants (Basel)*; 10(3):433. doi: 10.3390/antiox10030433. PMID: 33799844; PMCID: PMC8001021.
57. Pourghorban, S., Yadegarian, L., Jalili, M., & Rashidi, L. (2022). Comparative physicochemical, microbiological, antioxidant, and sensory properties of pre-and post-fermented yoghurt enriched with olive leaf and its extract. *Food Science & Nutrition*, 10(3), 751-762.
58. Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, 90(4), 494-507.
59. Rafiq, S., Gulzar, N., Sameen, A., Huma, N., Hayat, I., & Ijaz, R. (2021). Functional role of bioactive peptides with special reference to cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 74(1), 1-16.
60. Rahmanian, N., Seid Mahdi Jafari, Touseef Ahmed Wani (2015) Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 42, Issue 2, Pages 150-172, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.009>.
61. Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2015). Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field, high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. *Separation and Purification Technology*, 146, 243-251.
62. Reena, K. A. (2021). Thermal and non-thermal treatment of milk: A review. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 8(5), 2330-2332.
63. Reis Giada, M. L. (2013) Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants; DOI: 10.5772/51687

64. Rienks, J., Barbaresco, J., & Nöthlings, U. (2017). Association of polyphenol biomarkers with cardiovascular disease and mortality risk: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutrients*, 9(4), 415.
65. Rodrigues, R. D. P., de Castro, F. C., de Santiago-Aguiar, R. S., & Rocha, M. V. P. (2018). Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* using protic ionic liquids as solvent. *Algal research*, 31, 454-462.
66. Rombaut, N., Tixier, A.S., Bily, A., Chemat, F. (2014) Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuel. Bioprod. Bior.* 8, 530 – 544.
67. Saint-Georges-Chaumet Y, Edeas M. Microbiota-mitochondria inter-talk: consequence for microbiota-host interaction. *Pathog Dis.* 2016 Feb;74(1):ftv096. doi: 10.1093/femspd/ftv096. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26500226.
68. Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., ... Sharifi-Rad, J. (2018). *Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. Phytotherapy Research.* doi:10.1002/ptr.6109
69. Samaržija, D. (2014). Fermentirani mliječni proizvodi. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
70. Schnitzler, P. (2019). *Essential Oils for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. Chemotherapy*, 1–7. doi:10.1159/000501062
71. Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
72. Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., ... & Ren, X. (2023). A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 106646. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417723003589> Pristupljeno: 5.9.2024
73. Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2012). The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microbial drug resistance*, 18(2), 137-148.
74. Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 1965-1969.

75. Tariq, S.; Wani, S.; Rasool, W.; Shafi, K.; Bhat, M.A.; Prabhakar, A.; Shalla, A.H.; Rather, M.A. A Comprehensive Review of the Antibacterial, Antifungal and Antiviral Potential of Essential Oils and Their Chemical Constituents Against Drug-Resistant Microbial Pathogens. *Microb. Pathog.* 2019, *134*, 10358
76. Tohidi, B.; Rahimmalek, M.; Arzani, A. Essential Oil Composition, Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of *Thymus* Species Collected from Different Regions of Iran. *Food Chem.* 2017, *220*, 153–161.
77. Tohidi, B.; Rahimmalek, M.; Arzani, A.; Trindade, H. Sequencing and variation of terpene synthase gene (TPS2) as the major gene in biosynthesis of thymol in different *Thymus* species. *Phytochemistry* **2020**, *169*, 112126. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112126>
78. Tratnik Lj., Božanić R. (2012). Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb
79. Tu Y.J., Njus D., Schlegel H.B. (2017) A theoretical study of ascorbic acid oxidation and HOO/O 2-Radical scavenging. *Org. Biomol. Chem.*;15:4417–4431. doi: 10.1039/C7OB00791D.
80. Vidović, S., Tomšik, A., Vladić, J., Jokić, S., Aladić, K., Pastor, K., & Jerković, I. (2021). Supercritical carbon dioxide extraction of *Allium ursinum*: Impact of temperature and pressure on the extracts chemical profile. *Chemistry & biodiversity*, *18*(4), e2100058.
81. Walstra, P. (1999). Dairy technology: principles of milk properties and processes. CRC Press.
82. Yapici, İsmail & İzol, Ebubekir. (2023). Bioactive components of some thyme (*thymus*) species and their effects on health.
83. Zahedirad, M., Asadzadeh, S., Nikooyeh, B., Neyestani, T. R., Khorshidian, N., Yousefi, M., & Mortazavian, A. M. (2019). Fortification aspects of vitamin D in dairy products: A review study. *International Dairy Journal*, *94*, 53-64.
84. Zandona, E., Vranković, L., Pedisić, S., Vukušić Pavičić, T., Dobrinčić, A., Marušić Radovčić, N., ... & Barukčić Jurina, I. (2024). Production of Acid and Rennet-Coagulated Cheese Enriched by Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract—Determining the Optimal Point of Supplementation and Its Effects on Curd Characteristics. *Foods*, *13*(4), 616.
85. Zhan J., Liu Y.J., Cai L.B., Xu F.R., Xie T., He Q.Q. (2017) Fruit and vegetable consumption and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective cohort

- studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*;57:1650–1663. doi: 10.1080/10408398.2015.1008980.
86. Zhang, X., Chen, X., Xu, Y. *et al.* Milk consumption and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses in humans. *Nutr Metab (Lond)* **18**, 7 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00527-y>
87. Zhao Y, Jiang Q. Roles of the Polyphenol-Gut Microbiota Interaction in Alleviating Colitis and Preventing Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Adv Nutr.* 2021 Mar 31;12(2):546-565. doi: 10.1093/advances/nmaa104. PMID: 32905583; PMCID: PMC8009754.
88. Zoidou, E., Melliou, E., Moatsou, G., & Magiatis, P. (2017). Preparation of functional yogurt enriched with olive-derived products. In *Yogurt in health and disease prevention* (pp. 203-220). Academic Press.
89. Zoidou, E., Melliou, E., Moatsou, G., & Magiatis, P. (2017). Preparation of functional yogurt enriched with olive-derived products. In *Yogurt in health and disease prevention* (pp. 203-220). Academic Press.
90. Zorić, N. (2017). Antifungalni i antigenotoksični učinci oleuropeina (Disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:098754>
91. Zorić, N., Kosalec, I. (2022). The Antimicrobial Activities of Oleuropein and Hydroxytyrosol. In: Rai, M., Kosalec, I. (eds) *Promising Antimicrobials from Natural Products*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-83504-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-83504-0_5)