

## Polyphenol recovery from olive leaves and evaluation of the microbiological quality and antimicrobial potential of the extracts

### Ekstrakcija ukupnih polifenola iz lista masline, procjena mikrobiološke čistoće i antimikrobne aktivnosti ekstrakata

Mirna MRKONJIĆ FUKA<sup>1</sup> (✉), Slaven JURIC<sup>2</sup>, Luka HAN<sup>1</sup>, Martina GRDIŠA<sup>3</sup>, Marko VINCEKOVIĆ<sup>2</sup>, Irina TANUWIDJAJA<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Department of Microbiology, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Department of Chemistry, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Department of Plant Biodiversity, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>4</sup> Institute of Sanitary Engineering and Water Pollution Control, Department of Water, Atmosphere and Environment, University of Natural Resources and Life Sciences, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

✉ Corresponding author: [mfuka@agr.hr](mailto:mfuka@agr.hr)

Received: April 9, 2024; Accepted: November 27, 2024

#### ABSTRACT

During the production of olive fruit and olive oil, considerable quantities of leaves remain as by-products, which are a rich source of biologically active substances, especially polyphenols, and can therefore be used as a raw material for their extraction. Various methods are used for this purpose. One of them is ultrasound-assisted extraction (UAE), which has proven to be an effective and economically affordable method. This study aimed to compare the efficacy of ultrasound-assisted extraction (UAE) and conventional extraction (CE) in the extraction of total polyphenols from olive leaves using water as a solvent and to determine the antimicrobial activity of extracts as well as the microbiological purity of the olive leaves and the extracts obtained. In ultrasound-assisted extraction, the highest concentrations of polyphenolic compounds were extracted at an amplitude (A) of 100% in an extraction time of 6 min from 6 g leaf powder/L, and this method showed greater efficiency compared to the conventional extraction method. However, olive leaf extracts obtained showed no antimicrobial activity. Using a modified ultrasound-assisted extraction (MUAE) that includes lyophilization, an olive leaf extract with higher concentrations of total polyphenols was obtained, which showed an inhibitory effect on the bacteria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Listeria innocua* (ATCC 33090) at concentrations of 600 and 400 µg total polyphenols per disc, while exhibiting an efficacy of up to 37.0% against conventional antibiotics in controlling infections caused by Gram-negative bacteria, i.e. up to 32.6% against antibiotics for controlling infections caused by Gram-positive bacteria. In addition, this study found that aerobic mesophilic and sporogenic bacteria, bacteria from the *Enterobacteriaceae* family and molds and yeasts make up the natural microbiota of the olive leaf. All extraction methods used had a bactericidal effect on species from the *Enterobacteriaceae* family and a fungicidal effect on molds and yeasts. However, aerobic mesophilic and sporogenic bacteria were found in all extracts, regardless of the extraction method used.

**Keywords:** *Olea europaea* L., ultrasound-assisted extraction, polyphenols, pathogenic microbiota, antibiotics

## SAŽETAK

U proizvodnji plodova masline i maslinovog ulja kao nusprodukti zaostaju značajne količine listova koji predstavljaju bogat izvor biološki aktivnih tvari, posebice polifenola, te se stoga mogu iskoristi kao sirovina za njihovo izdvajanje. U tu svrhu koriste se različite metode, a jedna od njih je i ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UPE), koja se pokazala učinkovitom i ekonomski pristupačnom metodom. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti učinkovitost ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (UPE) i konvencionalne ekstrakciju (KE) u izdvajanju ukupnih polifenola iz lista masline, koristeći vodu kao otapalo, te utvrditi antimikrobno djelovanje ekstrakata kao i mikrobiološku čistoću lista masline i dobivenih ekstrakata. Kod ultrazvukom potpomognute ekstrakcije najviše koncentracije polifenolnih spojeva ekstrahirane su pri amplitudi (A) od 100%, u vremenu trajanja ekstrakcije od 6 minuta iz 6 g praha lista/L te je ova metoda pokazala veću učinkovitost u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakcije. Međutim, ovako dobiveni ekstrakti lista masline nisu pokazali antimikrobno djelovanje. Modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (MUPE) koja uključuje liofilizaciju, dobiven je ekstrakt lista masline s višim koncentracijama ukupnih polifenola koji je djelovao inhibitory na bakterije *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Listeria innocua* (ATCC 33090) pri koncentracijama 600 i 400 µg ukupnih polifenola po disku, prikazujući pritom do 37,0% učinkovitosti konvencionalnih antibiotika koji se koriste u suzbijanju infekcija uzrokovanih Gram- negativnim, odnosno do 32,6% učinkovitosti antibiotika za suzbijanje infekcija Gram- pozitivnim bakterijama. Također, u ovom istraživanju je utvrđeno da aerobne mezofilne i sporogene bakterije, bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* te plijesni i kvasci čine prirodnu mikrobiotu lista masline. Sve primijenjene metode ekstrakcije djelovale su bakteriocidno na vrste iz porodice *Enterobacteriaceae*, odnosno fungicidno na plijesni i kvasce. Međutim, aerobne mezofilne i sporogene bakterije utvrđene su u svim ekstraktima, neovisno o primijenjenoj metodi ekstrakcije.

**Ključne riječi:** *Olea europea* L., ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, polifenoli, patogena mikrobiota, antibiotici

## DETAILED ABSTRACT

The industrial production of olive oil and olives generates a considerable amount of by-products, such as leaves, which represent 10% of the biomass of the fruit that enters the production process. In the past, these residues posed a problem for producers, who were faced with the cost of disposal or even resorted to incineration. However, with growing environmental awareness and demand for sustainable sources of bioactive substances, there is growing interest in the valorization of agricultural waste. Olive leaves are rich in bioactive compounds such as polyphenols, which have been shown to have antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties. The aim of this study was to compare the efficacy of ultrasound-assisted extraction (UAE) and conventional extraction (CE) in the extraction of total polyphenols from olive leaves using water as a solvent and to determine the antimicrobial activity of extracts as well as the microbiological purity of the olive leaves and the extracts obtained. Besides conventional extraction (CE) and ultrasound-assisted extraction (UAE), modified ultrasound-assisted extraction (MUAE), which involved lyophilisation, was applied in order to increase polyphenols concentration to the level that shows antimicrobial activity. The olive leaves were systematically collected in the olive groves in the hinterland of Zadar in Ravni Kotari, whereby a random sample was taken from different cultivars (Orkula, Leccino and Lastovka). The experimentally determined optimal ultrasound-assisted extraction conditions included 100% amplitude (A), 6 g/L mass concentration and 6 minutes' extraction time (t). Since the extracts obtained with CE or/and UAE showed negligible antimicrobial activity, a refined MUAE protocol was applied in which lyophilization was performed after ultrasonic extraction of olive leaves at a mass concentration of 40 g/L. The MUAE extracts were characterized by a concentration of total polyphenols sufficient to show antimicrobial activity against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Listeria innocua* (ATCC 33090) at concentrations of 600 and 400 µg total polyphenols per disc, respectively. The olive leaf extracts did not show antimicrobial activity against beneficial bacteria used in the production of fermented foods at any of the concentrations tested, indicating their suitability for use in this type of food. Compared to conventional antibiotics, the MUAE extracts (600 µg) showed 26.1% efficacy of ciprofloxacin and 37.0% efficacy of ampicillin-sulbactam against *S. enterica* subsp. *enterica*, 23.2% efficacy of ciprofloxacin and 33.0% efficacy of ampicillin-sulbactam against *E. coli*, 28.3% efficacy of

tetracycline and 32.6% efficacy of erythromycin against *L. innocua*. In addition, this study identified the natural microbiota of olive leaves, which consists of aerobic mesophilic and sporogenic bacteria, *Enterobacteriaceae*, molds and yeasts. *Listeria* spp. or *Salmonella* spp. were not present in any of the samples tested. Bactericidal effects on *Enterobacteriaceae* and fungicidal effects on molds and yeasts were observed with all extraction methods used. However, regardless of the extraction method, aerobic mesophilic and spore-forming bacteria were consistently detected in all extracts, underlining the need for caution when handling plant material to avoid contamination and protect consumer health.

## UVOD

Proizvodnja maslina (*Olea europea* L.) i maslinovog ulja rezultira velikom količinom nusprodukata poput listova koji čine 10% biomase plodova koji ulaze u proizvodni proces (Şahin i Bilgin, 2017). Tradicionalno, ovi ostaci predstavljaju problem za proizvođače, koji se suočavaju s troškovima njihovog zbrinjavanja. Međutim, s rastućom ekološkom sviješću i potražnjom za održivim izvorima biološki aktivnih spojeva, pojavljuje se interes za valorizacijom poljoprivrednog otpada. Listovi masline obiluju biološki aktivnim spojevima poput polifenola, masnih kiselina, pigmenta (klorofili i karotenoidi), tokoferola, fitosterola, skvalena, hlapljivih i aromatičnih spojeva (Roselló-Soto i sur., 2015) te su zbog intenzivnog uzgoja maslina lako dostupan materijal na području Mediterana. Do sada su od biološki aktivnih spojeva najviše istraženi polifenoli za koje je dokazano da djeluju antioksidativno, antimikrobno, protuupalno i antikancerogeno. Također je dokazana njihova učinkovitost u snižavanju kolesterola i zaštiti krvožilnog sustava (Özcan i Matthäus, 2017). Polifenoli se sintetiziraju u biljci kao sekundarni metaboliti pod utjecajem stresnih okolišnih čimbenika poput visokih i niskih temperatura, UV zračenja, suše i prisutnosti različitih patogena (Vogel i sur., 2015). Polifenoli su prisutni u svim dijelovima biljke, no njihova koncentracija i biokemijska svojstva variraju s obzirom na dio biljke iz koje se izdvajaju (Yoon, 2018).

Razni procesi obrade listova masline (npr. ekstrakcija i sušenje) znatno utječu na dostupnost i sadržaj polifenola (Vogel i sur., 2015). Primjena ekstrakta listova masline prvenstveno je vezana uz njihova antioksidativna i antimikrobna svojstva (Özcan i Matthäus, 2017). Slobodni radikali i reaktivne kisikove i dušikove vrste koje se stvaraju kao nusprodukti metaboličkih staničnih procesa uzrokuju

oksidativni stres u stanicama uzrokujući oštećenja membranskih lipida, proteina i DNA stanice (Gorzynik-Debicka i sur., 2018). Polifenoli, poput oleuropeina, vrijedni su antioksidansi koji mogu neutralizirati slobodne radikale i reaktivne čestice te spriječiti oksidaciju staničnih dijelova (Yoon, 2018) te su pokazali značajno antimikrobno djelovanje na bakterije, viruse i mikroskopske gljive (Benavente-García i sur., 2000). Tijekom povijesti čaj od listova masline koristio se za liječenje raznih virusnih i bakterijskih infekcija. U prehrambenoj industriji polifenoli se koriste za sprječavanje oksidacije lipida kod prerade i skladištenja hrane (Şahin i Bilgin, 2017). Također, sve se više istražuju biorazgradivi polimeri u koje je moguće inkorporirati biljne polifenole poput oleuropeina u svrhu produženja roka trajanja i stabilnosti svježih namirnica (da Rosa i sur., 2020). Ekstrakt lista masline nudi se kao prirodni konzervans za prehrambenu industriju i ekološku zaštitu biljaka u poljoprivredi, te kao potencijalno sredstvo u medicini za borbu protiv patogenih mikroorganizama.

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UPE) pokazala se kao učinkovita metoda za izolaciju biološki aktivnih spojeva iz vegetativnih biljnih dijelova (Vilkhu i sur., 2008). Jednostavnost, učinkovitost i niski troškovi čine je vrijednom alternativom drugim metodama ekstrakcije. Mehanički učinak ultrazvuka inducira transport molekula iz biljne stanice u suspenziju, zbog kavitacijskog učinka ultrazvučnog vala na strukturu stanice. Učinkovitost UPE biološki aktivnih spojeva ovisi o raznim parametrima; fizičkim (amplituda, frekvencija, snaga ultrazvučnog vala, temperatura suspenzije), kemijskim (viskozitet, polarnost i molekulska masa otapala) i biološkim (biljna vrsta, biljno tkivo i okolišni uvjeti rasta biljke) (Chemat i sur., 2017).

Budući da listovi masline obiluju raznim biološki aktivnim spojevima pretpostavka je da se različitim metodama ekstrakcije iz lista masline mogu ekstrahirati biološki aktivni spojevi, posebice polifenoli, u koncentraciji dostatnoj za antimikrobno djelovanje, te da vrsta ekstrakcije može utjecati na mikrobnu čistoću ekstrakta. Stoga je cilj ovog rada usporediti ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju (UPE) i konvencionalnu ekstrakciju (KE) u smislu učinkovitosti ekstrakcije ukupnih polifenola iz lista masline uz pomoć vode kao otapala, te ispitati mikrobiološku čistoću lista i dobivenih ekstrakata. Nadalje, cilj rada je odrediti utjecaj ekstrakata lista masline na rast pet potencijalno patogenih vrsta bakterija (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*) i tri korisne bakterije (*Lactobacillus sakei*, *Enterococcus durans* i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) kao i usporediti te kvantificirati djelovanje ekstrakta lista masline u odnosu na konvencionalne antibiotike koji se koriste u liječenju infekcija izazvanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.

## MATERIJALI I METODE

### **Uzorkovanje biološkog materijala (list masline) i priprema uzorka za ekstrakciju ukupnih polifenola**

Listovi masline (*Olea europaea* L.) prikupljeni su u kasno proljeće 2019. u maslinicima Zadarskog zaleđa, na području Ravnih Kotara. Listovi su prikupljeni s tri različita kultivara: Orkula, Leccino i Lastovka. Korištena je metoda nasumičnog uzorkovanja s više različitih stabala. Listovi su osušeni na zraku, izmješani u istim omjerima te potom usitnjeni u laboratorijskom mlinu i prosijani kroz sito od inoksa (promjer 450  $\mu\text{m}$ ). Iz ovako pripremljenog uzorka praha lista masline provedena je ekstrakcija polifenola.

### **Određivanje kinetike ekstrakcije ukupnih polifenola iz lista masline ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (UPE)**

Uzorak praha lista masline (0,6 g) preliven je s 100 mL destilirane vode. Optimalni uvjeti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (UPE) za ekstrakciju polifenola određeni su varijacijom amplitude (A%) rada ultrazvučne

sonde (50%, 75% i 100%) i s vremenom trajanja postupka ekstrakcije (od 1 do 17 minuta) (Hielscher Ultrasonics, Njemačka). Dobiveni ekstrakti profiltrirani su kroz tkaninu (kako bi se uklonile veće čestice), a zatim kroz Whatman No.4 filter papir.

### **Konvencionalna metoda ekstrakcije (KE)**

Odvagano je 2 g praha lista masline i preliveno s 180 mL kipuće destilirane vode (100 °C). Ovako pripremljena otopina ostavljena je da stoji 5 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzija je potom profiltrirana kroz muslin (kako bi se uklonile veće čestice), a zatim kroz Whatman No. 4 filter papir. Ekstrakcija je provedena u triplikatu.

### **Modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (MUPE) i ukoncentriravanje ekstrakta lista masline te liofilizacija**

S obzirom na to da ekstrakti lista masline koji su sadržavali najviše koncentracije polifenola, a koji su dobiveni primjenom UPE (uvjeti:  $\gamma = 6 \text{ g/L}$ ,  $A = 100\%$ ,  $t = 6 \text{ min}$ ) nisu pokazali antimikrobno djelovanje, listovi masline podvrgnuti su modificiranoj ultrazvukom potpomognutoj ekstrakciji (MUPE). Provedena je ekstrakcija u prethodno određenim optimalnim uvjetima UPE ( $A = 100\%$ ,  $t = 6 \text{ min}$ ), ali s promjenjivom početnom masenom koncentracijom lista masline (10-40 g/L).

Nadalje, ekstrakt dobiven pri uvjetima:  $\gamma = 40 \text{ g/L}$ ,  $A = 100\%$ ,  $t = 6 \text{ min}$ , podvrgnut je i postupku ukoncentriravanja uz pomoć rotacijskog isparivača (Heidolph, Njemačka). Uz pomoć rotacijskog isparivača pri brzini od 150-200 rpm i temperaturi od 70 °C (niža temperatura zbog moguće degradacije biološki aktivnih spojeva) uklonjeno je otapalo (voda) u ekstraktu. Dobiveni koncentrat podvrgnut je procesu liofilizacije te je 1 g liofiliziranog ekstrakta otopljen u 5 mL destilirane vode. Ekstrakcije su provedene u triplikatu.

### **Određivanje ukupnih polifenola u ekstraktima**

Ukupni polifenoli određeni su modificiranom Folin-Ciocalteu metodom uz korištenje Folin-Ciocalteu reagensa (Sigma-Aldrich, Njemačka). U staklenu epruvetu otpipetirano je 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 7,9 mL destilirane vode,

500 µL Folin-Ciocalteu reagensa (1:2 H<sub>2</sub>O) i 1,5 mL 20%-tne (w/v) otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Slijepa proba je pripremljena na isti način kao i ispitivani uzorci. Vrijednosti ukupnih polifenola očitane su nakon 2 sata na UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu, Japan) pri valnoj duljini od 765 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline po litri ekstrakta (mg EGK/L) (Komes i sur., 2016).

#### **Određivanje mikrobiološke čistoće lista i ekstrakta lista masline**

Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline određena je kako je propisano Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/2008) i Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2011). Određen je ukupan broj aerobnih mezofilnih (AMB) i aerobnih spirogenih (ASB) bakterija (ISO 4833-2:2013), bakterija *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2017), bakterija roda *Listeria* (ISO 11290-2:2017) i *Salmonella* (ISO 6597-1:2017) te plijesni i kvasaca (ISO 21527-2:2008).

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

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

#### **Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata masline**

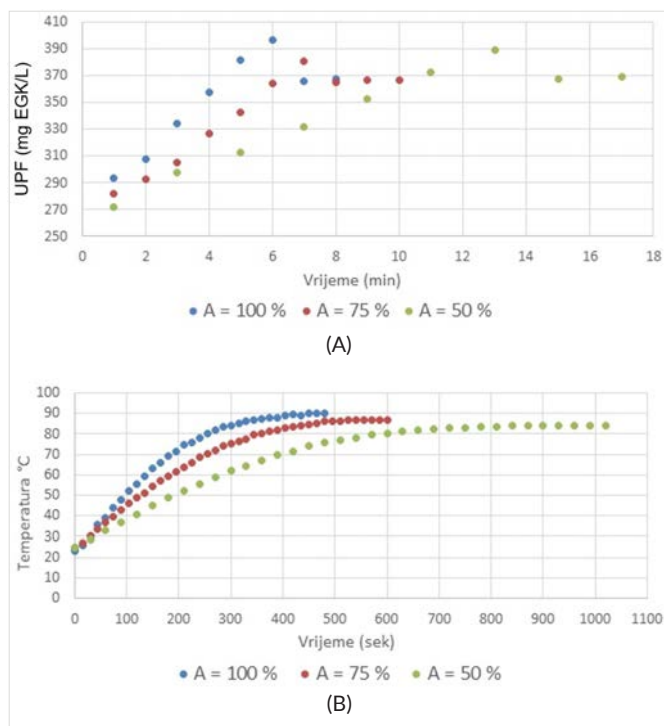
Antimikrobno djelovanje ekstrakta lista masline ispitano je disk difuzijskom metodom i aplikacijom ekstrakta na sterilne celulozne diskove (Bio-Rad, Francuska). Prije aplikacije svi ekstrakti sterilno su filtrirani kroz membranski filter promjera pora 0,22 µm (VWR International, Belgija). Aplicirani su ekstrakti dobiveni UPE i KE, koncentracije 5, 50, 100 i 250 te 300, 400 i 600 µg ukupnih polifenola po disku za MUPE. Nakon aplikacije ekstrakta diskovi su inkubirani pri 30 °C tijekom 30 min kako bi se olakšala difuzija ekstrakta u celulozni disk. Testne bakterijske kulture suspendirane su u 0,85% fiziološkoj otopini do turbiditeta koji odgovara 0,5 McFarland standarda (1,5x10<sup>8</sup> CFU/mL). Ovako dobivene suspenzije svakog izolata razrijeđene su u 0,85% fiziološkoj otopini kako bi se pripremila biomasa od 10<sup>6</sup> CFU/mL koja je sterilnim vatenim štapićem razmazana na Müller-Hinton agar prije aplikacije celuloznih diskova.

U svrhu određivanja antimikrobnog djelovanja ekstrakta lista masline u odnosu na konvencionalne antibiotike (%), testirani izolati pripremljene su na isti način, s time da su umjesto celuloznih diskova s ekstraktom listova masline korišteni konvencionalni antibiotici i to: eritromicin (15 µg, BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) i tetraciklin (30 µg, BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) za Gram-pozitivne i ampicilin-sulbaktam (10/10 µg, BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) i ciprofloksacin (5 µg, BBL™ Sensi-Disc™, Francuska) za Gram-negativne izolate. Testiranja su provedena u tri ponavljanja. Podloge su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije izmjereni su radijusi zone inhibicije rasta oko diskova i izraženi su kao srednje vrijednosti promjera zona inhibicije rasta bakterija.

## **REZULTATI I RASPRAVA**

#### **Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija ukupnih polifenola iz lista masline**

U ovom radu, tijekom UPE praćena je kinetika ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lista masline pri varijabilnoj amplitudi (A = 50 do 100%) uz konstantnu masenu koncentraciju od 6 g/L (Grafikon 1A.).



**Figure 1.** Total polyphenolic content (TPC mg EGK/L) in the extract following UAE with variable amplitude and operating time of the ultrasound probe at  $\gamma$  (olive leaf powder) = 6 g/L (A) and temperature profile with variable amplitude (50 - 100%) (B)

**Grafikon 1.** Ukupni polifenoli (UPF mg EGK/L) određeni u ekstraktu nakon UPE pri varijabilnoj amplitudi i vremenu rada UZV sonde pri  $\gamma$  (prah lista masline) = 6 g/L (A) i temperaturni profil UPE pri varijabilnoj amplitudi (50 - 100%) (B)

Usporedno, analiziran je i temperaturni profil tijekom procesa ekstrakcije (Grafikon 1B.), s obzirom na to da temperatura ima značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije, uključujući brzinu ekstrakcije i konačnu koncentraciju spojeva u ekstraktu. Nadalje, visoka temperatura može značajno utjecati na degradaciju termolabilnih spojeva tijekom ekstrakcije.

Učinkovitosti UPE pri višoj amplitudi rezultirala je i relativno bržom ekstrakcijom ukupnih polifenola (6 min - 396,44 mg EGK/L). Najveća primijenjena amplituda od 100%, koja se pokazala kao optimalna, uzrokovala je najbrži porast temperature. S druge strane, primjena niže amplitude rezultirala je sporijom ekstrakcijom ukupnih polifenola i nešto nižom učinkovitošću. Primarno, sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu ovisi o početnoj masenoj koncentraciji, ali značajno ovisi i o drugim uvjetima UPE, a primarno amplitudi. Amplituda utječe na kavitaciju u

suspenziji, odnosno rast amplitudnog vala ultrazvuka je proporcionalan veličini mjehura koji se stvara u suspenziji pod utjecajem rada sonde. Amplituda je direktno povezana s ultrazvučnim intenzitetom rada sonde, a intenzitet utječe na povećanje temperature u suspenziji (Chemat i sur., 2017).

Dobrinčić i sur. (2020) su također dokazali da pri maksimalnoj amplitudi dolazi do najvećeg transfera mase biološki aktivnih tvari s obzirom na to da dolazi do značajnog oštećenja biljnih stanica. Nakon ekstrakcije od 6 minuta došlo je do smanjenja ukupnih polifenola u ekstraktu, što se može objasniti kritičnom temperaturom polifenola, odnosno degradacijom uslijed povišene temperature (Irakli i sur., 2018). Slično su utvrdili Kolar i sur. (2022) za UPE polifenolnih spojeva iz lista stevije, koristeći vodu kao otapalo. U njihovom istraživanju, najviše koncentracije polifenolnih spojeva ekstrahirane su pri amplitudi od 75%, u vremenu trajanja ekstrakcije od 9 minuta iz 6 g praha lista/L.

Nadalje, analizirane vrijednosti ukupnih polifenola pokazuju linearnu zavisnost s vremenom tretmana, gdje nakon određenog vremena, dolazi do pada koncentracije polifenola uslijed degradacije na povišenim temperaturama. Istraživanja su pokazala da vrijeme ekstrakcije utječe na koncentraciju ekstrahiranih polifenola, a optimalni uvjeti UPE u skladu su s literaturom. Primjerice, rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima gdje povećanjem amplitude dolazi i do bolje učinkovitosti ekstrakcije biološki aktivnih spojeva (Chemat i sur., 2017).

Ahmad-Qasem i sur. (2013) su dokazali da s povećanjem trajanja vremena ekstrakcije, dolazi i do povećanja koncentracije ekstrahiranih polifenola, te da je povećanje konstantno kroz 15 minuta trajanja UPE. Irakli i sur. (2018) nisu utvrdili značajne razlike u sadržaju polifenola u ekstraktima kod različitog vremena trajanja ekstrakcije od 10, 30 i 60 min. Međutim, u istom radu kao otapalo korišten je aceton, a nakon 30 min zabilježen je značajan pad u koncentraciji polifenola.

Općenito, dulje vrijeme izlaganja UPE poboljšava učinkovitost ekstrakcije čime dolazi do raspadanja stanične stijenke biljnog materijala te se omogućuje

difuzija biološki aktivnih spojeva (Irakli i sur., 2018). Uzevši u obzir sva tri temperaturna profila (Grafikon 1B.) i točke infleksije nakon kojih je utvrđeno smanjenje sadržaja ekstrahiranih polifenola, može se utvrditi da je prosječna kritična temperatura degradacije polifenola 84,7 °C kod  $\gamma = 6$  g/L. Rostagno i sur. (2007) dokazali su da do degradacije polifenolnih spojeva dolazi pri temperaturama višim od 60 °C. Teh i Birch (2014) su utvrdili da je 70 °C optimalna temperatura za ekstrakciju polifenola iz sjemenki konoplje. U konačnici, povećanje temperature suspenzije značajno utječe na fizikalno-kemijske parametre odgovorne za UPE (Ahmad-Qasem i sur., 2013).

#### **Usporedba konvencionalne metode ekstrakcije (KE) i ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (UPE)**

Ispitana je i učinkovitost konvencionalne metode ekstrakcije (KE) s vrućom destiliranom vodom (100 °C) (Komes i sur., 2016), a koja predstavlja tradicionalnu pripremu infuza. Rezultati usporedbe ekstrakcija prikazani su u Tablici 1. Iako je u KE korištena vruća voda (100 °C) polifenoli nisu u potpunosti degradirali. Razlog tome je veća početna masena koncentracija (11 g/L) što je i rezultiralo većim iskorištenjem ekstrakcije ukupnih polifenola. Prema iskorištenju, konvencionalnom metodom ekstrakcije pri  $\gamma = 11$  g/L dobiveno je 46,85 mg EKG/g s.tv. Isto je komparabilno s UPE, ali pri drugačijim uvjetima (A75%, 3 min) u odnosu na optimalne (48,83 mg EKG/g s.tv.). Ako usporedimo optimalne uvjete UPE u odnosu na UPE koji je komparabilan s KE, dobiveno je 66,07 mg EKG/g s.tv, odnosno 35% više iskorištenje.

Stoga se prema dobivenim rezultatima, a izračunato prema iskorištenju direktno može usporediti učinkovitost KE i UPE. Usporedbom dobivenih rezultata s onima dostupnim u znanstvenoj literaturi utvrđen je relativno visok sadržaj polifenola, s obzirom na to da je kao otapalo korištena samo voda. Druga istraživanja pokazala su visoki raspon sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima lista masline dobivenih UPE i to 20,37 mg EGK/g (Şahin i Şamli, 2013), 66 mg EGK/g (Ahmad-Qasem i sur., 2013) te 92,49 mg EGK/g (Dobrinčić i sur., 2020). Također, važno je napomenuti da se korištenjem mješavina organskih otapala kao ekstrakcijskog medija postiže veća učinkovitost ekstrakcije u odnosu na čista otapala (Jurić i sur., 2019). Nadalje, dokazano je da topljivost polifenolnih spojeva značajno ovisi o polarnosti otapala koje se koristi. Veća molekulska masa otapala omogućuje lakšu ekstrakciju tvari koje su slične molekulske mase kao i samo otapalo (Mokrani i Madani, 2016).

#### **Modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (MUPE)**

S obzirom na to da ekstrakti lista masline koji su sadržavali najviše koncentracije polifenola, a koji su dobiveni primjenom UPE (optimalni uvjeti:  $\gamma = 6$  g/L, A = 100%, t = 6 min) nisu pokazali antimikrobno djelovanje, primijenjena je modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (MUPE).

Primarno, provedena je ekstrakcija u prethodno određenim optimalnim uvjetima UPE (6 min/A100%), ali s promjenjivom početnom koncentracijom (10-40 g/L) lista masline kako bi se povećao sadržaj ukupnih polifenola u konačnom ekstraktu (Tablica 2).

**Table 1.** Comparison of the polyphenol content obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction, and calculated on the yield basis

**Tablica 1.** Usporedba sadržaja polifenola dobivenih konvencionalnom i ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom, a izračunato prema iskorištenju

Extraction type Tip ekstrakcije	Extraction conditions Uvjeti ekstrakcije	Total polyphenols (mg GAE/g dm) Ukupni polifenoli (mg EKG/g s.tv.)
Conventional extraction (CE) Konvencionalna ekstrakcija (KE)	$\gamma = 11$ g/L, 100 °C, 5 min	46,85
Ultrasound-assisted extraction (UAE)	$\gamma = 6$ g/L, A75%, 3 min	48,83
Ultrasound-assisted extraction (UPE)	$\gamma = 6$ g/L, A100%, 6 min	66,07

**Table 2.** Experimental determination of extraction conditions for the increase of polyphenol concentration in extracts**Tablica 2.** Eksperimentalno određivanje uvjeta ekstrakcije za dobivanje veće koncentracije polifenola u ekstraktima

Conditions Uvjeti	$\gamma$ (olive leaf powder) (g/L) $\gamma$ (prah lista masline) (g/L)	Total polyphenols (mg GAE/L) Ukupni polifenoli (mg EGK/L)
6 min/A100%	10	505,11±8,27 <sup>e</sup>
6 min/A100%	15	789,50±11,01 <sup>d</sup>
6 min/A100%	20	1030,89±6,57 <sup>c</sup>
6 min/A100%	30	1462,74±11,29 <sup>b</sup>
6 min /A100%	40	1839,41±21,42 <sup>a</sup>

Values labelled with the same letter are not statistically significantly different according to the Tukey *posthoc t*-test ( $P < 0.05$ )

Vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey *posthoc t*-testu ( $P < 0,05$ )

Povećanjem masene koncentracije (40 g/L) došlo je i do značajnog povećanja udjela ukupnih polifenola u ekstraktu. Masena koncentracija od 40 g/L rezultirala je ekstrakcijom 1839,41 mg EGK/L polifenola. S obzirom na iskorištenje, smanjenjem mase u odnosu na volumen koncentracijski gradijent sustava bi trebao biti veći prema principima pasivnog transporta omogućujući veću difuziju biološki aktivnih spojeva (Şahin i Şamli, 2013). Tako je npr. ekstrakcija pri nižoj testiranoj masenoj koncentraciji ( $\gamma = 10$  g/L) rezultirala s relativnom nižom koncentracijom ukupnih polifenola (505,11 mg EGK/L) u ekstraktu (Tablica 2). U slučaju kada je masena koncentracija vrlo visoka, dolazi do ekstrakcije visokog udjela polifenola, a u odnosu na volumen otapala. Povećanjem masene koncentracije osigurava se veća dostupna količina biološki aktivnih spojeva koji mogu difundirati u otapalo, no sustav se može dovesti do zasićenja (difuzija) i time negativno utjecati na ekstrakciju (Prasad i sur., 2009). Hannachi i sur. (2019) su također potvrdili da se povećanjem mase naspram volumena otapala dobiva i veća koncentracija ukupnih polifenola u suspenziji.

Nadalje, ekstrakt dobiven pri uvjetima:  $\gamma = 40$ g/L, A = 100%, t = 6 min, podvrgnut je modifikaciji i postupku ukoncentriravanja uz pomoć rotacijskog isparivača. Dobiveni koncentrat je liofiliziran te je 1 g liofiliziranog ekstrakta otopljeno u 5 mL destilirane vode. Ukupni polifenoli određeni u tom ekstraktu (MUPE - modificirana ultrazvučna ekstrakcija) iznosili su 23519,78 mg EGK/L,

odnosno 587,99 mg EGK/g s.tv. Delgado-Adámez i sur. (2016) također su liofilizirali ekstrakt lista masline nakon prethodne ekstrakcije u vrućoj vodi i smrzavanja na -28 °C. Navedenim postupkom utvrdili su 3404 mg ekvivalenata kafeinske kiseline/L otapala. Orak i sur. (2012) ekstrahirali su biološki aktivne spojeve iz lista masline pomoću kipuće vode i magnetske miješalice te su ekstrakt podvrgnuli zamrzavanju na -40 °C i liofilizaciji. Međutim, utvrđeni sadržaj ukupnih polifenola bio je znatno manji od sadržaja utvrđenog u ovom istraživanju, i iznosio je 102,69 mg EGK/g s.tv.

#### **Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline**

U svrhu utvrđivanja utječe li metoda ekstrakcije na brojnost i strukturu bakterijskih zajednica prirodno prisutnih na listu masline ispitana je mikrobiološka čistoća polaznog materijala (lista masline) kao i ekstrakata lista masline dobivenih konvencionalnom (KE), ultrazvukom potpomognutom (UPE) te modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (MUPE). U svim uzorcima određen je ukupan broj aerobnih mezofilnih (AMB) i sporogenih bakterija (ASB), enterobakterija, bakterija rodova *Listeria* i *Salmonella* te plijesni i kvasaca (Tablica 3.).

Na listovima masline najbrojnije su bile AMB ( $1,2 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$  CFU/g), kvasci i plijesni ( $2,9 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^2$ ) te bakterije porodice *Enterobacteriaceae* ( $1,7 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^2$  CFU/g), dok su ASB bile prisutne u 1-2 log puta manjem broju ( $3,5 \times 10^2 \pm 2,1 \times 10^2$  CFU/g). Brojnost AMB, kvasaca



i plijesni na listovima masline bila je 1-2 log puta veća od brojnosti koje su Sofo i sur. (2014.) utvrdili na suhim listovima masline. Nekoliko čimbenika može objasniti ovakvu razliku u brojnosti. Poznato je da kolonizacija biljaka i posljedična brojnost mikroorganizmima, ovisi o čimbenicima kao što su vrsta tkiva, razvojni stadij, fiziološko stanje, genotip biljke i poljoprivredna praksa (Hardoim i sur., 2008; Singh, 2009). Nadalje, mikroorganizmi mogu dospjeti na biljku putem vode i tla, te tijekom prikupljanja, obrade i skladištenja (Katušin-Ražem i sur., 2001; Bhat i sur., 2010).

Osim na listu masline, AMB i ASB, utvrđene su i u svim ekstraktima. Međutim, iako su sve ispitane metode ekstrakcije utjecale na smanjenje brojnosti aerobnih mezofilnih bakterija ( $P < 0,01$ ), preživljavanje bakterija ovisio je o korištenoj metodi. Najviše AMB preživjelo je KE (48,9%) uz redukciju broja za oko 1 log, što je u skladu sa istraživanjem koje su proveli Ukuku i sur. (2004). Iako se kod klasične metode ekstrakcije razvijaju temperature od 100 °C, kod UPE i MUPE se uz temperaturu od 60 °C

koja je značajno niža, istovremeno primjenjuje ultrazvuk (A 100%, 6 min) za kojeg je poznato da uspješno inaktivira mikroorganizme u rasponu frekvencije od 20-100 kHz (Gao i sur., 2014). Tako je najmanje preživljavanje AMB zabilježeno kod UPE (3,6%) te je kod obje metode ekstrakcije (UPE i MUPE) detektirana znatno veća redukcija brojnosti (2 log) u odnosu na KE.

Primijenjene metode ekstrakcije, nasuprot tome, dodatno su stimulirale aerobne sporogene bakterije (ASB) koje su bile do 2 log puta brojnije u ekstraktima nego na listu masline ( $P < 0,01$ ). ASB se odlikuju sposobnošću formiranja spora u nepovoljnim uvjetima što im daje prednost u preživljavanju u odnosu na druge bakterije. Sakanaka i sur. (2000) dokazali su da bakterije roda *Bacillus* formiraju spore pri temperaturama višim od 50 do 60 °C. Budući da su u ovom istraživanju primijenjene temperature više ili jednake 60 °C ne iznenađuje i zamijećen trend povećanja broja sporulirajućih bakterija prirodno prisutnih na biljnom tkivu tijekom procesa ekstrakcije.

**Table 3.** Microbiological purity of leaf and olive leaf extracts obtained by different extraction methods. The mean values of the total number of microorganisms with the corresponding standard deviations are shown

**Tablica 3.** Mikrobiološka čistoća lista i ekstrakata lista masline dobivenih različitim metodama ekstrakcije. Prikazane su srednje vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama s pripadajućim standardnim devijacijama

Microorganisms	Olive leaf [CFU/g]	CE* [CFU/mL]	UAE** [CFU/mL]	MUAE*** [CFU/mL]
Mikroorganizmi	List masline [CFU/g]	KE* [CFU/mL]	UPE** [CFU/mL]	MUPE*** [CFU/mL]
AMB	$1,2 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$ <sup>(a)</sup>	$5,8 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^2$ <sup>(b)</sup>	$4,3 \times 10^2 \pm 1,1 \times 10^2$ <sup>(c)</sup>	$1,1 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^2$ <sup>(d)</sup>
ASB	$3,5 \times 10^2 \pm 2,1 \times 10^2$ <sup>(a)</sup>	$4,1 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^1$ <sup>(b)</sup>	$3,0 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^4$ <sup>(c)</sup>	$2,0 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$ <sup>(d)</sup>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$1,7 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^2$ <sup>(a)</sup>	$0,0 \pm 0,0$ <sup>(b)</sup>	$0,0 \pm 0,0$ <sup>(b)</sup>	$0,0 \pm 0,0$ <sup>(b)</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
<i>Listeria</i> spp.	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Plijesni i kvasci	$2,9 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^2$ <sup>(a)</sup>	$0,0 \pm 0,0$ <sup>(b)</sup>	$0,0 \pm 0,0$ <sup>(b)</sup>	$0,0 \pm 0,0$ <sup>(b)</sup>

AMB = aerobic mesophilic bacteria, ASB = aerobic sporogenic bacteria

\*CE - conventional extraction, \*\*UAE - ultrasound-assisted extraction, \*\*\*MUAE - modified ultrasound-assisted extraction

<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup>, <sup>(c)</sup> and <sup>(d)</sup> in the same row indicate statistically significant differences in abundance of the tested microbial group depending on the extraction method, at significance level  $P = 0,01$

AMB = aerobne mezofilne bakterije, ASB = aerobne sporogene bakterije

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

<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup>, <sup>(c)</sup> i <sup>(d)</sup> u istom redu označavaju statistički značajne razlike u brojnosti ispitivane grupe mikroorganizama ovisno o metodi ekstrakcije, na razini značajnosti  $P = 0,01$

Enterobakterije ( $1,7 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^2$  CFU/g), plijesni i kvasci ( $2,9 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^2$  CFU/g) pronađeni su samo na listu masline. U oba slučaja, uvjeti pod kojima su ekstrahirani biološki aktivni spojevi, djelovali su bakteriocidno odnosno fungicidno. S druge strane, patogene bakterije rodova *Listeria* i *Salmonella* nisu detektirane na listu masline, kao ni u ekstraktima. Ukuku i sur. (2004) pokazali su da tretiranje bakterija porodice *Enterobacteriaceae* početne biomase 3 log CFU/mL, vrućom vodom temperature 70 °C i 97 °C u potpunosti inaktivira sve prisutne stanice, dok kod početne biomase 6 log CFU/mL isti učinak pokazuju tretman vrućom vodom temperature 70 °C u kombinaciji s dodatnim stresom i tretman samo vrućom vodom temperature 97 °C. Plijesni i kvasci osjetljiviji su na povišene temperature od bakterija, pa tako već djelovanje temperature od 50 do 60 °C kroz 10 do 40 s može u potpunosti inhibirati rast različitih vrsta plijesni (Karabulut i sur., 2001).

Prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2011) i Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) za kategorije "Začini, začinske biljke i njihove mješavine", prah lista masline zadovoljava obavezne i preporučene kriterije, dok prema kategoriji "Ekstrakti začina i prehrambene arome i boje" samo ekstrakt lista masline dobiven UPE je unutar propisanih referentnih vrijednosti za AMB. Kod ekstrakata dobivenih KE i MUPE broj AMB prelazi dozvoljene referentne vrijednosti. Zbog relativno visoke početne biomase AMB u prahu lista masline, kratkotrajan utjecaj visoke temperature vjerojatno nije bio dovoljan da reducira broj AMB kod KE, dok je kod MUPE koncentriranje ekstrahiranih polifenola dovelo do dodatne manipulacije te je vjerojatno došlo do naknadne kontaminacije ekstrakata. Zbog svega navedenog potreban je dodatni oprez u manipulaciji biljnim materijalom koji se koristi u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji kako ne bi došlo do kontaminacije i do ugrožavanja zdravlja potrošača (Kosalec i sur., 2009).

#### **Antimikrobno djelovanje ekstrakata**

Poznato je da djelovanje polifenola ovisi o primijenjenoj koncentraciji. Visoke koncentracije polifenola precipitiraju i denaturiraju stanične proteine,

oštećuju staničnu stijenku i staničnu membrane, dok niže, subletalne koncentracije, utječu na aktivnosti enzima uključenih u stanični metabolizam (Furneri i sur., 2002). U ovom radu dostatne koncentracije ukupnih polifenola za antimikrobno djelovanje dobivene su samo modificiranom metodom ekstrakcije (MUPE).

Kako bi se usporedilo djelovanje ekstrakata s djelovanjem antibiotika, napravljen je antibiogram testiranih bakterija. Utvrđeno je da su svi ispitivani Gram-pozitivni izolati osjetljivi na tetraciklin (30 µg) i eritromicin (15 µg), a Gram-negativni na ciprofloksacin (5 µg) i ampicilin-sulbaktam (10/10 µg) prema BBL standardima (Tablica 4.).

Antimikrobno djelovanje ekstrakta lista masline dobivenog KE i UPE ispitano je u rasponu koncentracija 5, 50, 100 i 250 µg/disk. Međutim, nijedna ispitana koncentracija nije djelovala bakteriostatski na korisne i potencijalno patogene bakterije.

Antimikrobno djelovanje ekstrakta lista masline dobivenog MUPE ispitano je u koncentracijama 300, 400 i 600 µg/disk. Antimikrobno djelovanje bilo je isključivo evidentirano prema potencijalno patogenim mikroorganizmima dok na korisnu mikrobiotu niti jedna koncentracija ekstrakta nije djelovala inhibitorno.

MUPE ekstrakti pokazali su inhibitorno djelovanje prema *S. enterica* subsp. *enterica* u koncentraciji ekstrakta od 600 µg/disk pri kojoj je evidentirano 26,1% učinkovitosti ciprofloksacina i 37,0% učinkovitosti ampicillin-sulbaktama, dok je pri 400 µg/disk detektirano 20,4% učinkovitosti ciprofloksacina i 29,0% učinkovitosti ampicillin-sulbaktama. Pri 600 µg/disk antimikrobno djelovanje detektirano je u odnosu na *E. coli* pokazujući 23,2% učinkovitosti ciprofloksacina i 33,0% učinkovitosti ampicillin-sulbaktama i *L. innocua* s 28,3% učinkovitosti tetraciklina i 32,6% učinkovitosti eritromicina. Općenito, najizraženiji antimikrobni učinak utvrđen je je pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, s time da je taj učinak bio najizraženiji za izolat *L. innocua* (Tablica 4).

**Table 4.** Antimicrobial activity of olive leaf extracts obtained by modified ultrasound-assisted extraction (MUAE). The values are expressed as the mean values of the diameter of the growth inhibition zone with the corresponding standard deviations

**Tablica 4.** Antimikrobno djelovanje ekstrakta lista masline dobivenog modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (MUPE). Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti promjera zone inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama

Isolates Izolati	Growth inhibition zone (mm) Zona inhibicije rasta (mm)						
	TPC* (300 µg) UPF* (300 µg)	TPC* (400 µg) UPF* (400 µg)	TPC* (600 µg) UPF* (600 µg)	Tetracycline (30 µg) Tetraciklin (30 µg)	Erythromycin (15 µg) Eritromicin (15 µg)	Ciprofloxacin (5 µg) Ciprofloksacin (5 µg)	Ampicillin-sulbactam (10/10 µg) Ampicilin-sulbaktam (10/10 µg)
<i>Lb. sakei</i> LS0296	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	44,0 ± 1,4	40,5 ± 0,7	n.p.	n.p.
<i>E. durans</i> ED004	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	35,5 ± 0,7	42,5 ± 0,7	n.p.	n.p.
<i>Lc. lactis</i> LL8307	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	23,5 ± 0,7	25,5 ± 0,7	n.p.	n.p.
<i>S. aureus</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	33,0 ± 1,4	29,0 ± 1,4	n.p.	n.p.
<i>B. cereus</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	34,5 ± 0,7	17,5 ± 0,7	n.p.	n.p.
<i>L. innocua</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	11,8 ± 0,4	41,5 ± 2,1	36,0 ± 4,2	n.p.	n.p.
<i>E. coli</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,3 ± 0,4	n.p.	n.p.	35,5 ± 0,7	25,0 ± 0,0
<i>S. enterica</i>	0,0 ± 0,0	7,3 ± 0,4	9,3 ± 0,4	n.p.	n.p.	35,5 ± 0,7	25,0 ± 1,4

\*TPC = total polyphenol content

n.p. = not applicable

\*UPF = ukupni polifenoli

n.p. = nije primjenjivo

Sve djelotvorne koncentracije (400 i 600 µg/disk) su značajno više od koncentracija zabilježenih u literaturi (Sudjana i sur., 2009; Liu i sur., 2017) gdje su za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišteni komercijalno dostupni ekstrakti točno poznatog sastava ili čisti oleuropein.

Za razliku od MUPE ekstrakata lista masline, konvencionalni antibiotici djeluju antimikrobno pri znatno nižim koncentracijama. Međutim, za razliku od antibiotika, kod biljnih ekstrakata koje sadrže više različitih bioaktivnih spojeva nije zabilježena pojava razvoja rezistencije (Vaou i sur., 2021). Dobiveni rezultati idu u prilog činjenici da bi se ekstrakti lista masline, mogli potencijalno primijeniti u raznim industrijama kao prirodni konzervansi te učinkoviti i jeftini izvori vrijednih antioksidansa bez razvoja rezistencije tipične za antibiotike.

## ZAKLJUČCI

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UPE) kao i konvencionalna ekstrakcija (KE) omogućuju ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz listova masline uz pomoć vode kao otapala. Uvjeti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (vrijeme, masa lista masline, otapalo, amplituda rada ultrazvučne sonde) utječu na udio polifenola u ekstraktu, pa je potrebno eksperimentalno odrediti optimalne uvjete za svaku ekstrakciju. KE i UPE nisu rezultirale ekstraktom koji pokazuje antimikrobna svojstva te je primijenjena modificirana ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (MUPE) koja je omogućila dobivanje dovoljnih količina polifenola za antimikrobni učinak. Ekstrakt lista masline dobiven MUPE djelovao je samo na potencijalne patogene bakterije, dok na potencijalno korisne bakterije nije zamijećeno antimikrobno djelovanje. Iz toga razloga, moguće je korištenje ekstrakta i u fermentiranim namirnicama za koje je nužno osigurati nesmetan rast i aktivnost korisnih, a inhibirati rast potencijalno patogenih mikroorganizama. Ekstrakt lista masline dobiven modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom djelovao je antimikrobno na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* u koncentracijama od 400 i 600 µg/disk, dok je na *Escherichia coli* i *Listeria innocua* djelovanje zamijećeno samo pri koncentraciji od 600

µg/disk. Ekstrakt dobiven modificiranom ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (600 µg/disk) pokazuje 26,1% učinkovitosti ciprofloksacina i 37,0% učinkovitosti ampicilin-sulbaktama za *S. enterica* subsp. *enterica*, 23,2% učinkovitosti ciprofloksacina i 33,0% učinkovitosti ampicilin-sulbaktama za *E. coli* i 28,3% učinkovitosti tetraciklina i 32,6% učinkovitosti eritromicina za *L. innocua*. Aerobne mezofilne i sporogene bakterije, *Enterobacteriaceae* te plijesni i kvasci čine prirodnu mikrobiotu lista masline. Sve metode ekstrakcije djelovale su bakteriocidno na enterobakterije, odnosno fungicidno prema kvascima i plijesnima. Brojnost aerobnih mezofilnih bakterija (AMB) se značajno smanjila ovisno o metodi ekstrakcije i najmanja redukcija broja aerobnih mezofilnih bakterija zabilježena je konvencionalnom metodom ekstrakcije. Sve metode ekstrakcije stimulirale su sporulaciju i utjecale su na porast broja aerobnih sporogenih bakterija (ASB) u ekstraktima u odnosu na list masline. Zbog toga je nužan dodatni oprez u manipulaciji biljnog materijala koji se koristi u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji, a kako ne bi došlo do kontaminacije i do ugrožavanja zdravlja potrošača.

## LITERATURA

- Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V. (2013) Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 120-129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.008>
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Río, J. A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68 (4), 457-462. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6)
- Benussi-Skukan, A., Boroš, K., Brlek-Gorski, D., Grizelj, N., Hegedušić, P., Hengl, B., Humski, A., Karačić, T., Kovaček, I., Majić, K., Palčić-Jakopović, K., Putnik, P., Vazdar, R. (2011) Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Available at: <https://poljoprivreda.gov.hr/> [Accessed 19 February 2024]
- Bhat, R., Rai, R. V., Karim, A. A. (2010) Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (1), 57-81. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

- da Rosa, G. S., Vanga, S. K., Garipey, Y., Raghavan, V. (2020) Development of Biodegradable Films with Improved Antioxidant Properties Based on the Addition of Carrageenan Containing Olive Leaf Extract for Food Packaging Applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 28 (1), 123–130.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01589-7>
- Delgado-Adámez, J., Bote, E., Parra-Testal, V., Martín, M. J., Ramírez, R. (2016) Effect of the Olive Leaf Extracts In Vitro and in Active Packaging of Sliced Iberian Pork Loin. *Packaging Technology and Science*, 29, 649–660. DOI: <https://doi.org/10.1002/pts.2267>
- Dobrinčić, A., Repajić, M., Elez Garofulić, I., Tuđen, L., Dragović-Uzelac, V., Levaj, B. (2020) Comparison of Different Extraction Methods for the Recovery of Olive Leaves Polyphenols. *Processes*, 8 (9), 1008. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr8091008>
- Furneri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N., Bisignano, G. (2002) In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20 (4), 293–296.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00181-4)
- Gao, S., Hemar, Y., Ashokkumar, M., Paturel, S., Lewis, G. D. (2014) Inactivation of bacteria and yeast using high-frequency ultrasound treatment. *Water Research*, 60, 93–104.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.038>
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Gammazza, A. M., Knap, N., Wozniak, M., Gorska-Ponikowska, M. (2018) Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (3), 686.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>
- Hannachi, H., Benmoussa, H., Saadaoui, E., Saanoun, I., Negri, N., Elfalleh, W. (2019) Optimization of ultrasound and microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves by response surface methodology. *Research Journal of Biotechnology*, 14 (7), 28–37.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., van Elsland, J. D. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16 (10), 463–471.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Irakli, M., Chatzopoulou, P., Ekateriniadou, L. (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 124, 382–388.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.070>
- ISO 11290-2:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 2: Enumeration method. Geneva: International Organization for Standardization, 2017.
- ISO 21527-2:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95. Geneva: International Organization for Standardization, 2008.
- ISO 21528-2:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony-count technique. Geneva: International Organization for Standardization, 2017.
- ISO 4833-2:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique. Geneva: International Organization for Standardization, 2013.
- ISO 6597-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. Geneva: International Organization for Standardization, 2017.
- Jurić, S., Ferrari, G., Velikov, K. P., Donsi, F. (2019) High-pressure homogenization treatment to recover bioactive compounds from tomato peels. *Journal of Food Engineering*, 262, 170–180.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.06.011>
- Karabulut, O. A., Lurie, S., Droby, S. (2001) Evaluation of the use of sodium bicarbonate, potassium sorbate and yeast antagonists for decreasing postharvest decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*, 23 (3), 233–236.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00151-X)
- Katuščin-Ražem, B., Novak, B., Ražem, D. (2001) Microbiological decontamination of botanical raw materials and corresponding pharmaceutical products by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 62 (2–3), 261–275.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00190-6](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00190-6)
- Kolar, S., Jurić, S., Marijan, M., Vlahoviček-Kahlina, K., Vinceković, M. (2022) Applicability of alginate-based composite microspheres loaded with aqueous extract of Stevia rebaudiana Bertoni leaves in food and pharmaceutical products. *Food Bioscience*, 50 (A), 101970. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101970>
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Jurić, S., Bušić, A., Vojvodić, A., Durgo, K. (2016) Consumer acceptability of liquorice root (*Glycyrrhiza glabra* L.) as an alternative sweetener and correlation with its bioactive content and biological activity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67 (1), 53–66.  
DOI: <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1126563>
- Kosalec, I., Cvek, J., Tomić, S. (2009) Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60 (4), 485–501.  
DOI: <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-2005>
- Liu, Y., McKeever, L. C., Malik, N. S. A. (2017) Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8, 113.  
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00113>
- Mokrani, A., Madani, K. (2016) Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.). *Separation and Purification Technology*, 162, 68–76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>
- Mrkonjić Fuka, M., Tanuwidjaja, I., Žgomba Maksimović, A., Zunabović-Pichler, M., Kublik, S., Hulak, N., Domig, K. J., Schlotter, M. (2020) Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures. *LWT-Food Science and Technology*, 118, 108782. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108782>
- Mrkonjić Fuka, M., Wallisch, S., Engel, M., Welzl, G., Havranek, J., Schlotter, M. (2013) Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses. *PLoS ONE*, 8 (11), e80734.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080734>
- Narodne novine (2008) Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Zagreb: Narodne novine (NN 74/2008). Available at: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008\\_06\\_74\\_2454.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_06_74_2454.html) [Accessed 19 February 2024]
- Orak, H. H., Isbilir, S. S., Yagar, H. (2012) Determination of Antioxidant Properties of Lyophilized Olive Leaf Water Extracts Obtained from 21 Different Cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 21 (4), 1065–1074. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0138-6>

- Özcan, M. M., Matthäus, B. (2017) A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243 (1), 89–99.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2726-9>
- Prasad, K. N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M., Jiang, Y. (2009) Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10 (2), 155–159.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.007>
- Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R. P., Saraiva, J. A., Boussetta, N., Grimi, N., Barba, F. J. (2015) Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 45 (2), 296–310.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.003>
- Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G. (2007) Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, 597 (2), 265–272.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.006>
- Şahin, S., Bilgin, M. (2017) Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98 (4), 1271–1279.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8619>
- Şahin, S., Şamli, R. (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (1), 595–602.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.029>
- Sakanaka, S., Juneja, L. R., Taniguchi, M. (2000) Antimicrobial Effects of Green Tea Polyphenols on Thermophilic Spore-Forming Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (1), 81–85.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80038-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80038-9)
- Singh, M. P. (2009) Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profiling of closely related fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 77 (1), 102–108.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.014>
- Sofo, A., Ciarfaglia, A., Scopa, A., Camele, I., Curci, M., Crecchio, C., Xiloyannis, C., Palese, A. M. (2014) Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. *Soil Use and Management*, 30 (1), 160–167.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/sum.12097>
- Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T. V., Hammer, K. A. (2009) Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), 461–463.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026>
- Teh, S.-S., Birch, E. J. (2014) Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 346–353. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.002>
- Ukuku, D. O., Pilizota, V., Sapers, G. M. (2004) Effect of Hot Water and Hydrogen Peroxide Treatments on Survival of *Salmonella* and Microbial Quality of Whole and Fresh-Cut Cantaloupe. *Journal of Food Protection*, 67 (3), 432–437.  
DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.3.432>
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E. (2021) Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9 (10), 2041.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9 (2), 161–169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
- Vogel, P., Machado, I. K., Garavaglia, J., Zani, V. T., de Souza, D., Dal Bosco, S. M. (2015) Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L.) to human health. *Nutricion Hospitalaria*, 31 (3), 1427–1433.  
DOI: <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8400>
- Yoon, S. K. (2018) Oleuropein as an Antioxidant and Liver Protect. In: Patel, V. B., Rajendram, R., Preedy, V. R., eds. *The Liver: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Boston, MA: Academic Press, 323–335. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803951-9.00027-6>