

FENOLNI SPOJEVI I MINERALI U LISTOVIMA MASLINE SORTE 'LECCINO': UTJECAJ ROKA UZORKOVANJA

PHENOLIC COMPOUNDS AND MINERALS IN THE LEAVES OF OLIVE CULTIVAR 'LECCINO': EFFECT OF SAMPLING TIME

**S. Bernobić, D. Ban, Marija Polić Pasković, Smiljana Goreta Ban,
N. Major, I. Palčić, I. Dlačić, I. Pasković**

SAŽETAK

Maslina (*Olea europaea* L.) predstavlja jednu od najvažnijih poljoprivrednih kultura mediteranskog područja. U Republici Hrvatskoj sorta 'Leccino' najzastupljenija je introducirana sorta u novim nasadima maslina. Najpoznatiji proizvod masline je maslinovo ulje, koje se ističe visokim udjelom mononezasićenih masnih kiselina te nizom korisnih bioaktivnih tvari, osobito fenolnih spojeva. Osim ulja i plodova, listovi masline od davnina se koriste u tradicionalnoj medicini, ponajprije zbog spojeva poput oleuropeina, hidroksitirozola, tirozola i luteolina, poznatih po antioksidativnim, protuupalnim i antitumorskim svojstvima. Na koncentraciju fenola u listovima značajno utječu različiti agroekološki čimbenici, a ona je ujedno povezana i s koncentracijama hraniva u biljci. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati kako različiti rokovi uzorkovanja (80, 110 i 140 dana nakon pune cvatnje, koja je bila 1. lipnja, te tijekom rezidbe) utječu na koncentraciju fenolnih spojeva i mineralnih elemenata u listovima masline sorte 'Leccino'. Istraživanje je provedeno u Sikovu, u Zadarskoj županiji, u Hrvatskoj. Uzorkovano je 100 listova po stablu, od kojih svako predstavlja jedno ponavljanje. Nakon uzorkovanja listovi su oprani, osušeni, samljeveni i pripremljeni za daljnje analize. Fenolni spojevi određeni su HPLC metodom nakon metanolne ekstrakcije, dok su mineralni elementi analizirani ICP-MS-om i FAAS-om. Dobiveni podaci statistički su obrađeni jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), uz naknadno utvrđivanje značajnih razlika LSD testom te Pearsonovom korelacijom ($p < 0,05$). Rezultati su pokazali značajan utjecaj roka uzorkovanja na koncentraciju oleuropeina, oleaceina, oleanolne kiseline, kao i elemenata P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, S, Si i Zn. Najviše koncentracije navedenih fenolnih spojeva zabilježene su u vrijeme rezidbe, dok je u istom

razdoblju utvrđena najniža koncentracija kalija (K) i najviša koncentracija magnezija (Mg). Ovi rezultati doprinose razumijevanju utjecaja razvojnog stadija masline i sezonskih promjena na kvalitetu i sastav maslinovog lišća. Ta saznanja izuzetno su važna za prehrambenu i farmaceutsku primjenu ekstrakata lista masline. Praćenje dinamike fenolnih spojeva i minerala u različitim regijama Hrvatske omogućuje optimizaciju gospodarenja maslinicima, čime se doprinosi ostvarenju viših prinosa, poboljšanoj kvaliteti maslinova ulja i očuvanju nutritivne vrijednosti listova. Daljnja istraživanja bit će usmjerena na iste parametre u listovima sorte 'Leccino', kako bi se procijenio utjecaj različitih agroekoloških uvjeta i regionalnih specifičnosti na kvalitetu lišća te potvrdila opća primjenjivost dobivenih rezultata. Na taj način moguće je oblikovati znanstveno utemeljene preporuke za održivo gospodarenje maslinicima u Hrvatskoj i šire.

Ključne riječi: sekundarni metaboliti, oleuropein, oleacein, oleanolna kiselina, hranjiva

ABSTRACT

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the most significant agricultural crops in the Mediterranean region. In Croatia, the 'Leccino' cultivar is the most widely introduced variety in new olive plantations. The most prominent olive product is olive oil, which is notable for its high content of monounsaturated fatty acids and various beneficial bioactive compounds, particularly phenolic compounds. In addition to olive oil and fruit, olive leaves have long been used in traditional medicine, primarily due to compounds such as oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol, and luteolin, known for their antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor properties. The concentration of phenolic compounds in leaves is significantly influenced by different agroecological factors and is also correlated with nutrient concentrations within the plant. The aim of this research was to determine the impact of different sampling dates (80, 110 and 140 days after full bloom, which occurred on June 1, and during pruning) on the concentration of phenolic compounds and minerals in the leaves of the olive cultivar 'Leccino'. The study was conducted in Sikovo, Zadar County, Croatia. A total of 100 leaves per tree were sampled, each tree representing one replicate. After sampling, the leaves were washed, dried, ground, and prepared for further analyses. Phenolic compounds were quantified using HPLC after methanolic extraction, while mineral elements were analyzed using ICP-MS and FAAS. Data were statistically

analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by LSD test for significant differences and Pearson correlation ($p < 0.05$). The results indicated a significant effect of sampling date on concentrations of oleuropein, oleacein, oleanolic acid, and the elements P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, S, Si, and Zn. The highest concentrations of these phenolic compounds were recorded during pruning, when the lowest potassium (K) and highest magnesium (Mg) concentrations were also observed. These results contribute to understanding the influence of the developmental stage of olive and seasonal changes on the quality and composition of olive leaves. These findings are particularly important for the nutritional and pharmaceutical application of olive leaf extracts. Monitoring the dynamics of phenolic compounds and minerals in different regions of Croatia enables the optimization of orchard management, thereby contributing to increased yields, improved olive oil quality, and preservation of the nutritional value of the leaves. Further research will focus on the same parameters in the leaves of 'Leccino' cultivar to assess the influence of different agroecological conditions and regional specificities on leaf quality and to confirm the general applicability of the results. In this way, it will be possible to develop scientifically based recommendations for sustainable olive orchard management in Croatia and beyond.

Keywords: secondary metabolites, oleuropein, oleacein, oleanolic acid, nutrients

UVOD

Maslina (*Olea europaea* L.) smatra se jednom od najznačajnijih uzgajanih kultura mediteranskog područja, ponajprije zbog maslinovog ulja koje se dobiva iz njezinih plodova. Maslinovo ulje poznato je po svom specifičnom mirisu i okusu zahvaljujući hlapivim aromatskim spojevima, no ono se posebno cijeni zbog toga jer sadrži spojeve korisne za ljudsko zdravlje kao što su mononezasićene masne kiseline, fenolni spojevi i druge biološki aktivne tvari (Jimenez-Lopez i sur., 2020.). Fenolni spojevi kao što su oleuropein i oleacein poznati su po izraženoj antioksidativnoj aktivnosti, a osim toga dokazano je i njihovo protuupalno, antiaterogeno i antitumorsko djelovanje (Omar, 2010.; Cetinkaya i sur., 2016.; Lozano-Castellón i sur., 2020.). Uz njih, oleanolna kiselina je također spoj prisutan u maslini s nizom dokazanih farmakoloških učinaka, među kojima se osobito ističe hepatoprotektivno djelovanje (Liu, 1995.). Takvi spojevi sve se više istražuju zbog njihove izražene antioksidativne aktivnosti, što ih čini posebno zanimljivima za primjenu ponajviše u

farmaceutskoj, ali i u kozmetičkoj te prehrambenoj industriji, osobito zbog potencijala za produljenje roka trajanja hrane i razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Nicoli i sur., 2019). Unatoč tome što se antioksidativna svojstva masline najčešće povezuju s maslinovim uljem, brojna istraživanja pokazuju da upravo ekstrakti lišća sadrže znatno više oleuropeina i pokazuju veću antioksidativnu aktivnost od maslinovog ulja (Silva i sur., 2006.; Xie i sur., 2015.). Još jedan od razloga za korištenje ekstrakata maslinovog lišća jest i činjenica da se ono u velikim količinama stvara kao nusprodukt tijekom proizvodnje maslinovog ulja, a još više tijekom rezidbe. Nažalost, u većini slučajeva se lišće odbacuje bez ikakve daljnje uporabe, iako sadrži biološki korisne spojeve s potencijalom za daljnje korištenje (Mattioli i sur., 2018.).

Maslina ima sustav obrane od stresnih uvjeta tako da sintetizira sekundarne metabolite, od kojih su najznačajniji upravo fenoli koje stvara metaboličkim putem šikimske kiseline (Santos-Sánchez i sur., 2019.). Stresni uvjeti poput visokih temperatura, suše i visoke ozračenosti karakteristični su za Mediteran, a u studiji iz 2020. godine dokazano je da za vrijeme takvih ljetnih stresnih uvjeta dolazi do značajnog povećanja sinteze oleuropeina od čak za 41 %, što potvrđuje ulogu ovog spoja u obrambenom mehanizmu masline (Brito i sur., 2019.).

Uloga fenolnih spojeva s izraženom antioksidativnom aktivnosti je ublažavanje negativnih učinaka do kojih dovode stresni uvjeti, a to su ponajprije nakupljanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i smanjene učinkovitosti Calvinova ciklusa (Steffi i sur., 2021.). Poznato je da na koncentraciju fenolnih spojeva može utjecati mnogo različitih čimbenika. Jedan od tih čimbenika je geografska lokacija, naime, dokazano je da koncentracija fenolnih spojeva u listovima masline između ostalog varira ovisno o mjestu uzorkovanja (Giannakopoulou i sur., 2011.). Osim toga, dokazano je da listovi masline uzgojene u uvjetima smanjene dostupnosti vode razvijaju obrambene mehanizme protiv oksidativnog stresa, što uključuje povećanje ukupne koncentracije fenolnih spojeva (Bacelar i sur., 2006.). Utvrđeno je i da smanjena dostupnost vode može dovesti do smanjenja aktivnosti polifenol oksidaze (PPO), enzima koji je uključen u razgradnju fenolnih spojeva, što posljedično dovodi do povećanja koncentracije fenolnih spojeva i njihovom nakupljanju u listovima (Sofa i sur., 2005.). Gnojidba također može značajno utjecati na promjenu koncentracije fenolnih spojeva u listovima masline. Primjerice, primjena pripravka Brotomax, koji sadrži dušik, bor i cink, rezultirala je povećanjem ukupne koncentracije fenola u listu (Del Río i sur., 2003.).

Koncentracija oleuropeina i ostalih korisnih spojeva u plodu i listu masline uvelike varira s obzirom na rok uzorkovanja (Pasković i sur., 2020.; Lukić i sur., 2020.; Polić Pasković i sur., 2023.). Njihove koncentracije u plodu masline najviše su u početnoj fazi sazrijevanja, takozvanoj zelenoj fazi, kada je plod još uvijek tvrd, zelen i izraženo gorkog okusa kojeg uzrokuje visoka prisutnost oleuropeina. Tijekom sazrijevanja ploda, koncentracija oleuropeina značajno se smanjuje u plodu, dok se u listovima ona povećava (Ortega-García i sur., 2008.; Alagna i sur., 2012.). U potpuno zreloom, tamnom plodu oleuropein je prisutan u najmanjoj količini (Sueishi i Nii, 2020.).

Minerali su esencijalni nutrijenti za maslinu, a njihova je dostupnost i ravnoteža ključna za njezin normalan rast i razvoj. Koncentracije minerala, odnosno hranjiva, u listovima masline odražavaju njezin opći nutritivni status, što ih čini korisnim pokazateljem za procjenu ishranjenosti stabla (Fernández-Escobar i sur., 1999.). Oni sudjeluju u raznim fiziološkim procesima biljke kao što su fotosinteza, regulacija enzima, sinteza primarnih i sekundarnih metabolita.

Ovo je istraživanje provedeno s ciljem praćenja dinamike koncentracija fenolnih spojeva i minerala u maslinovom lišću sorte 'Leccino'. Sorta 'Leccino' poznata je po tome što u lišću sadrži više koncentracije fenola u usporedbi s mnogim drugim sortama (Polić Pasković i sur., 2023.). Hipoteza istraživanja bila je da se koncentracija fenolnih spojeva i mineralnih elemenata u maslinovom lišću značajno mijenja tijekom različitih rokova uzorkovanja. Svrha istraživanja bila je utvrditi optimalan period berbe lišća za dobivanje ekstrakata s maksimalnim udjelom biološki aktivnih spojeva pogodnih za primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

MATERIJALI I METODE

Pokus je postavljen u masliniku u Sikovu, Zadarska županija, Hrvatska. Odabrana su stabla u punoj zrelosti sorte 'Leccino'. Primijenjene su standardne poljoprivredne prakse u skladu s integriranom zaštitom bilja (IPM), uključujući gnojidbu tla s 1 kg NPK gnojiva (7-20-28) po stablu u jesen (2021.) te 1 kg KAN-a po stablu u proljeće (2022.) kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast.

Listovi su uzorkovani u 4 različita roka uzorkovanja, s 4 ponavljanja, gdje svako stablo predstavlja jedno ponavljanje – R1 (sredina kolovoza – 80 dana od pune cvatnje), R2 (sredina rujna – 110 dana od pune cvatnje), R3 (sredina listopada – berba – 140 dana od pune cvatnje), R4 (sredina ožujka sljedeće

vegetacijske sezone – prije rezidbe). Uzorkovanje je napravljeno na ukupno 4 zdrava i uniformna stabla, u dobi od 13 godina. Sa svakog stabla, sa središnjeg dijela ovogodišnjih izboja, prikupljeno je 100 listova koji su preneseni u laboratorij gdje su bili dalje analizirani.

Pojedinačni fenolni spojevi i minerali analizirani su po već prije opisanom protokolu (Pasković i sur., 2024.). Za ekstrakciju fenolnih spojeva lišće je bilo preneseno u laboratorij i isprano vodovodnom vodom, otopinom 1 %-tne octene kiseline, te zatim dvaput u deioniziranoj vodi. Isprano lišće je zatim osušeno u sušioniku na 48 sati i 55°C, nakon čega je samljeveno. Zatim je 30 mg samljevenog uzorka suspendirano u 1,5 mL mješavine metanol/voda (80:20). Uzorci su sonificirani 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji (Sonorex Digitec, Bandelin electronic, Berlin, Njemačka), centrifugirani 5 minuta na 5000 rpm (Domel Centric 350, Železniki, Slovenija) te filtrirani kroz 0,45 µm filtere prije HPLC analize. Analiza je provedena na HPLC sustavu (Shimadzu Nexera LC-40DX3, Kyoto, Japan) opremljenom s C18 kolonom (2.1 mm × 150 mm, 2.7 µm, Agilent, Palo Alto, SAD) na 30 °C. Ispiranje je provedeno u gradijentu s dvije faze: (A) voda s 0,1 % mravlje kiseline i (B) acetonitril s 0,1 % mravlje kiseline. Gradijent je tekao sljedećim rasporedom: početnih 95% A i 5% B provedeno je 2 minute, zatim linearna promjena do 50 % A i 50 % B kroz 18 minuta, nakon čega je unutar 1 minute promijenjeno na 5 % A i 95 % B, koje se provodilo 2 minute, a sustav se potom nakon 7 minuta vratio na početni sastav. Brzina protoka mobilne faze bila je 0,35 mL/min, a volumen injektiranja 5 µL. Detekcija je provedena UV/Vis detektorom pri različitim valnim duljinama: 280 nm za oleuropein i oleacein, te 210 nm za oleanolnu kiselinu. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva u listu masline provedena je usporedbom vremena zadržavanja i površina vrhova s odgovarajućim analitičkim standardima. Kvantifikacija je izvršena eksternom metodom standarda koristeći kalibracijske krivulje dobivene serijskim razrjeđivanjem otopina standarda.

Za određivanje mineralnih elemenata, 500 mg osušenog i samljevenog lišća vagano je u porculanskim posudicama i spaljeno suhim žarenjem na 550 °C kroz 8 sati. Dobiveni pepeo otopljen je u 5 mL 0,6 M klorovodične kiseline (Merck, Njemačka) uz zagrijavanje 15 minuta na 60 °C. Otopina je filtrirana (Munsell No. 388) i dopunjena deioniziranom vodom na 50 mL. Koncentracije P, Fe, Mn, S, Si i Zn određene su na ICP-MS uređaju (NexION 300×, PerkinElmer Instruments, Waltham, SAD), dok su Mg i K određeni plamenom atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (FAAS, PerkinElmer AAS800).

Podaci o fenolnim spojevima i mineralnim elementima analizirani su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s razinom značajnosti $p < 0,05$, a za naknadnu usporedbu skupina korišten je LSD test radi utvrđivanja među kojima od njih postoje značajne razlike. Za određivanje odnosa između koncentracije fenolnih spojeva i koncentracije minerala u listu masline napravljena je Pearsonova korelacija ($p < 0,05$).

REZULTATI I RASPRAVA

Fenolni spojevi u listu masline sorte 'Leccino'

Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) provedena je za fenolne spojeve oleuropein, oleacein i oleanolnu kiselinu u listovima masline kako bi se utvrdio utjecaj roka uzorkovanja na njihovu koncentraciju (Tablica 1.).

Tablica 1. Koncentracije sekundarnih metabolita oleuropeina, oleaceina i oleanolne kiseline u listovima masline, izražene u mg/100 g suhe tvari (ST), uzorkovanima u četiri različita razdoblja (R1 – 80 dana nakon pune cvatnje, R2 – 110 dana nakon pune cvatnje, R3 – 140 dana nakon pune cvatnje i R4 – u rezidbi). Srednje vrijednosti označene drukčijim slovima značajno su različite uz $p < 0,05$ prema LSD testu (srednje vrijednosti $\pm$ SE, $n=4$).

Table 1 Concentrations of secondary metabolites oleuropein, oleacein and oleanolic acid in olive leaves, expressed in mg/100 g dry weight (DW), sampled at four different periods (R1 – 80 days after full bloom, R2 – 110 days after full bloom, R3 – 140 days after full bloom and R4 – during pruning). Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to the LSD test (mean values $\pm$ SE, $n=4$).

Rok uzorkovanja	Oleuropein	Oleacein	Oleanolna kiselina
R1	5945,73 $\pm$ 991,54 ^a	67,86 $\pm$ 15,35 ^b	1007,44 $\pm$ 49,70 ^a
R2	3284,13 $\pm$ 470,96 ^b	51,01 $\pm$ 7,53 ^b	923,68 $\pm$ 450,81 ^a
R3	1639,34 $\pm$ 62,42 ^b	5,90 $\pm$ 3,86 ^c	152,71 $\pm$ 8,42 ^b
R4	5942,50 $\pm$ 493,90 ^a	173,33 $\pm$ 13,55 ^a	1089,60 $\pm$ 55,61 ^a

Prosječne koncentracije oleuropeina bile su značajno više od koncentracija oleaceina i oleanolne kiseline, što se poklapa s istraživanjem Pasković i sur. (2024.) na istoj lokaciji. U ovom istraživanju najviša koncentracija oleuropeina vidljiva je u rokovima uzorkovanja R1 i R4 s vrijednostima od preko 5900 mg/100 g ST. Kroz vegetacijsku sezonu dolazi do promjene njegove koncentracije te je značajno niža koncentracija oleuropeina zabilježena u R2 i R3 rokovima uzorkovanja s vrijednostima od 1639 do 3284 mg/100 g ST (Tablica 1). Ovakav sezonski trend poklapa se s prethodnim istraživanjima koja

su pokazala da je koncentracija fenolnih spojeva u maslinovom lišću najviša u rano proljeće te postupno opada prema jeseni, što se objašnjava smanjenjem biosinteze u uvjetima viših temperatura (R1) ili proljetnih mrazova (R4) (Hashemi i sur., 2010.; Pasković i sur., 2020.; Lukić i sur., 2020.; Giannakopoulou i sur., 2011.).

Sličan trend vidljiv je i za sekoiridoid oleacein (3,4-DHPEA-EDA), čije su koncentracije u usporedbi s oleuropeinom i oleanolnom kiselinom značajno niže, no unatoč tome oleacein se smatra kao jedan od najzastupljenijih fenolnih spojeva u maslinovom ulju (Polić Pasković i sur., 2024). Njegova koncentracija je također bila najviša u rezidbi sljedeće vegetacijske godine (R4), gdje je iznosila 173 mg/100 g ST, a slična vrijednost zabilježena je i u prethodnoj studiji koja je pokazala povišene razine oleaceina tijekom razdoblja rezidbe (Franić i sur., 2024.). Tijekom vegetacije vidljiv je pad koncentracije oleaceina te je tijekom listopada koncentracija bila značajno niža u odnosu na zabilježene koncentracije tijekom kolovoza i rujna (Tablica 1.). Slična dinamika oleaceina i oleuropeina može se objasniti njihovim srodnim biosintetskim putem (Polić Pasković i sur., 2024.).

Različiti trend zabilježen je kod oleanolne kiseline. Rokovi uzorkovanja s najvećom koncentracijom bili su R1 (1007 mg/100 g ST), R2 (923 mg/100 g ST) i R4 (1089 mg/100 g ST) sa značajno većim vrijednostima u odnosu na rok R3, odnosno berbu (Tablica 1.). Različite vrijednosti oleanolne kiseline na istoj lokaciji u prethodnim istraživanjima mogu se objasniti značajnim utjecajem godine odnosno različitim agroekološkim uvjetima uzgoja masline (Pasković i sur., 2024.).

Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da koncentracije oleuropeina, oleaceina i oleanolne kiseline ovise o roku uzorkovanja.

Minerali u listu masline sorte 'Leccino'

Koncentracije minerala u listovima masline odražavaju njezin opći nutritivni status, što ih čini korisnim pokazateljem za procjenu ishranjenosti stabla (Fernández-Escobar i sur., 1999.).

Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) provedena je za minerale fosfor (P), kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), željezo (Fe), mangan (Mn), sumpor (S), silicij (Si) i cink (Zn) u listovima masline kako bi se utvrdio utjecaj roka uzorkovanja na njihovu koncentraciju (Tablica 2.).

Tablica 2. Koncentracije minerala P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, S, Si, i Zn u listovima masline, uzorkovanima u četiri različita razdoblja (R1 – 80 dana nakon pune cvatnje, R2 – 110 dana nakon pune cvatnje, R3 – 140 dana nakon pune cvatnje i R4 – u rezidbi). Srednje vrijednosti označene drukčijim slovima značajno su različite uz $p < 0,05$ prema LSD testu (srednje vrijednosti $\pm$ SE, $n=4$).

Table 2 Concentrations of minerals P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, S, Si, and Zn in olive leaves sampled at four different periods (R1 – 80 days after full flowering, R2 – 110 days after full flowering, R3 – 140 days after full flowering, and R4 – during pruning). Mean values followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to the LSD test (mean values $\pm$ SE, $n = 4$).

Rok uzorkovanja	K g/kg	Mg g/kg	Fe mg/kg	Mn mg/kg
R1	11,54 $\pm$ 0,30 ^a	1,00 $\pm$ 0,02 ^c	53,38 $\pm$ 1,08 ^b	49,00 $\pm$ 0,22 ^c
R2	12,08 $\pm$ 0,72 ^a	1,14 $\pm$ 0,05 ^b	98,88 $\pm$ 15,51 ^a	56,22 $\pm$ 2,96 ^b
R3	11,91 $\pm$ 0,92 ^a	1,27 $\pm$ 0,03 ^a	66,19 $\pm$ 9,35 ^b	76,63 $\pm$ 1,66 ^a
R4	7,42 $\pm$ 0,26 ^b	1,31 $\pm$ 0,04 ^a	48,62 $\pm$ 7,42 ^b	82,88 $\pm$ 3,14 ^a
Rok uzorkovanja	P g/kg	S g/kg	Si mg/kg	Zn mg/kg
R1	1,19 $\pm$ 0,10 ^b	1,53 $\pm$ 0,14 ^c	62,75 $\pm$ 0,22 ^b	8,52 $\pm$ 0,01 ^b
R2	1,34 $\pm$ 0,10 ^b	1,65 $\pm$ 0,03 ^{b c}	139,53 $\pm$ 24,75 ^a	10,09 $\pm$ 0,46 ^b
R3	1,73 $\pm$ 0,06 ^a	1,94 $\pm$ 0,04 ^{a b}	117,44 $\pm$ 5,09 ^a	12,54 $\pm$ 0,70 ^a
R4	2,02 $\pm$ 0,12 ^a	2,07 $\pm$ 0,11 ^a	145,66 $\pm$ 16,93 ^a	13,00 $\pm$ 0,65 ^a

Rezultati analize minerala pokazuju istaknute sezonske varijacije u koncentracijama minerala u uzorkovanom lišću masline sorte 'Leccino'.

Za minerale Mg, Mn, P, S i Zn vidljiv je zajednički trend gdje se njihova koncentracija postepeno povećava kroz rokove uzorkovanja, te je najviša u vrijeme rezidbe, R4.

Koncentracije magnezija (Mg) u listovima masline bile su najniže u prvom roku uzorkovanja (R1) i statistički su se razlikovale od svih ostalih rokova. U drugom roku (R2) zabilježen je značajan porast u odnosu na R1. U trećem (R3) i četvrtom roku (R4) koncentracije su nastavile rasti, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između R3 i R4, dok su obje vrijednosti bile značajno više u odnosu na R1 i R2 (Tablica 2.).

Koncentracija mangana (Mn) bila je najniža u R1, a statistički se značajno razlikovala u odnosu na sve ostale rokove. U R2 vrijednost se povećava i značajno se razlikuje od svih ostalih, dok su najviše vrijednosti zabilježene u R3 i R4, između kojih nema značajne razlike, ali su statistički više u odnosu na R1 i R2 (Tablica 2.).

Najniža koncentracija fosfora (P) zabilježena je u R1 i R2, između kojih nema statistički značajne razlike. Između R3 i R4 nema značajne razlike, ali dolazi do značajnog porasta koncentracije u odnosu na rokove R1 i R2 (Tablica 2.).

Najniža koncentracija sumpora (S) zabilježena je u R1 i ona je statistički značajno niža u odnosu na rokove R3 i R4. Uzorak iz R2 nije se značajno razlikovao ni od R1 ni od R3, dok su R3 i R4 imale najviše koncentracije, bez međusobne statistički značajne razlike (Tablica 2.).

Najniže vrijednosti cinka (Zn) zabilježene su u rokovima R1 i R2 i one se međusobno ne razlikuju, ali su statistički značajno niže u odnosu na R3 i R4 između kojih nije bilo statistički značajne razlike (Tablica 2.).

Koncentracije kalija (K) bile su relativno stabilne u prva tri roka uzorkovanja gdje koncentracije nisu bile značajno različite, a vrijednosti su bile od 11,54 do 12,08 g/kg. U roku uzorkovanja R4 koncentracija se značajno smanjila u odnosu na prva tri roka (Tablica 2.).

Trend dinamike silicija (Si) bio je specifičan jer je značajno najniža bila koncentracija u lišću uzorkovanom u R1, dok između koncentracija preostalih triju rokova nije bilo značajne razlike (Tablica 2.).

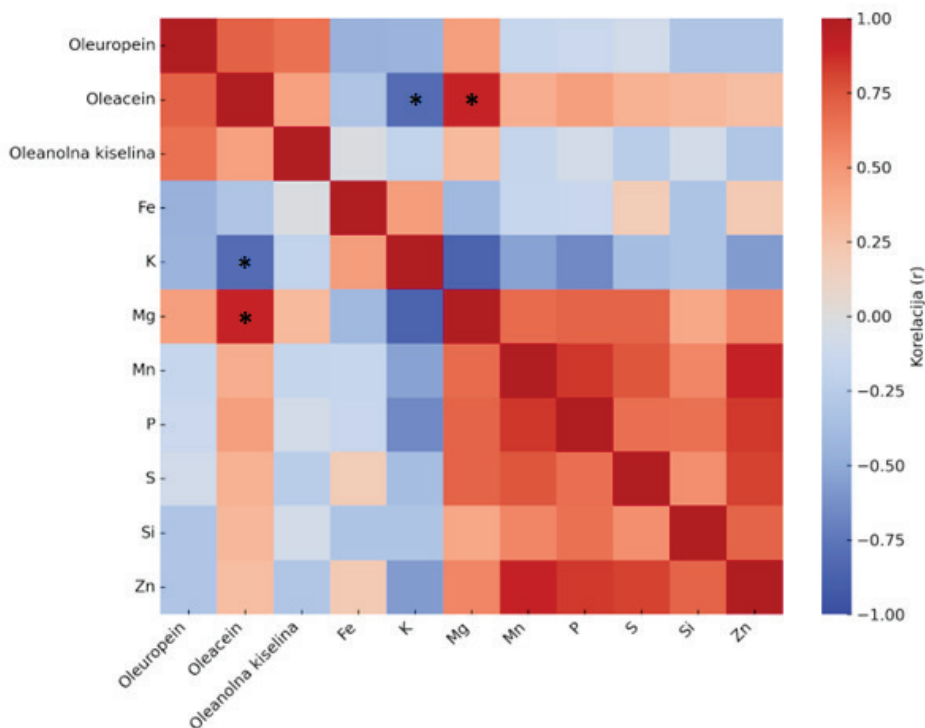
Koncentracija željeza (Fe) bila je značajno viša u drugom roku uzorkovanja (R2) u odnosu na sve ostale rokove, dok su najniže vrijednosti zabilježene u R4. Koncentracije u R1 i R3 bile su međusobno slične te se statistički nisu razlikovale (Tablica 2.).

Koncentracije elemenata Mg, Mn, P, S, Zn, K i Fe su u skladu s literaturom definiranim optimalnim koncentracijama (Therios, 2009.; Connor i Fereres, 2005.). Za Si nema literaturom definirane optimalne koncentracije, ali su vrijednosti u skladu s prethodnim istraživanjima (Pasković i sur., 2024.).

Pasković i sur. (2020.) su u svojem istraživanju utvrdili da su koncentracije K i Fe bile najviše u listopadu, nakon čega su se smanjile tijekom siječnja i ožujka. S druge strane, koncentracije P, Mg i Zn slijedile su suprotan trend: vrijednosti su bile niže u listopadu, dok je došlo do porasta u drugim rokovima uzorkovanja, najznačajnije u ožujku. Koncentracija Mn se smanjila u siječnju u odnosu na listopad, ali je ponovno porasla u ožujku. Uz to, Polić Pasković i sur. (2023.) isto tako su otkrili sezonske varijacije u listovima masline, za sortu 'Leccino'. Trend smanjivanja koncentracije uočen je za K, Fe i Zn: njihova se koncentracija u ožujku smanjila u odnosu na listopad. Suprotno tome, koncentracija Mn u ožujku se blago povećala u odnosu na listopad, dok je koncentracija Mg bila stabilna i nije se mijenjala.

Korelacija između fenolnih spojeva i minerala

Za određivanje odnosa između koncentracije fenolnih spojeva i koncentracije minerala u listu masline napravljena je Pearsonova korelacija, te je izrađena toplinska mapa Pearsonovih koeficijenata radi jednostavnijeg prikaza rezultata. Statistička značajnost određena je na razini $p < 0,05$.



Slika 1. Toplinska mapa Pearsonovih koeficijenata korelacije ($p < 0,05$) između koncentracija fenolnih spojeva (oleuropein, oleacein, oleanolna kiselina) i mineralnih elemenata (P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, S, Si i Zn) u listovima masline sorte Leccino. Plava boja označava negativne, a crvena pozitivne korelacije, pri čemu intenzitet boje odgovara jačini povezanosti. Zvezdicom (*) su istaknute značajne korelacije između fenolnih spojeva i minerala, dok korelacije unutar skupine fenola ili unutar skupine minerala nisu posebno označene.

Figure 1 Heat map of Pearson correlation coefficients ($p < 0.05$) between the concentrations of phenolic compounds (oleuropein, oleacein, oleanolic acid) and mineral elements (P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, S, Si, and Zn) in olive leaves of the Leccino cultivar. Blue indicates negative and red positive correlations, with color intensity corresponding to the strength of the relationship. Significant correlations between phenolic compounds and minerals are marked with an asterisk (*), while correlations within the group of phenolics or within the group of minerals are not specifically highlighted.

Osim očekivanih međusobnih korelacija između pojedinih minerala te između fenolnih spojeva, uočene su dvije izrazito značajne povezanosti: negativna korelacija između koncentracije kalija i oleaceina ($r = -0,8080$) te pozitivna korelacija između koncentracije magnezija i oleaceina ($r = 0,8975$). Ovi rezultati sugeriraju da dostupnost određenih mineralnih elemenata može imati važnu ulogu u regulaciji biosinteze fenolnih spojeva u listu masline.

Slične odnose opisali su Cetinkaya i sur. (2016.), koji su utvrdili pozitivnu korelaciju koncentracije fenolnih spojeva s koncentracijom Ca, Mg, Fe i Zn. Međutim, isti autori su utvrdili negativne korelacije između ukupnog sadržaja flavonoida, koji također pripadaju skupini sekundarnih metabolita, i gotovo svih analiziranih elemenata, uključujući N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn i Mn. Naši rezultati stoga potvrđuju i proširuju prethodna opažanja, pokazujući da pojedini fenolni spojevi, poput oleaceina, mogu biti povezani s određenim mineralima, što naglašava složenost odnosa između mineralne ishrane i metabolizma fenola.

Moguće je da negativna korelacija između kalija i oleaceina proizlazi iz drugačijeg usmjeravanja resursa u razdoblju sazrijevanja ploda, kada se prioritet daje akumulaciji nutrijenata i energetske rezerve u plodu, dok se sinteza sekundarnih metabolita u listovima smanjuje (Proietti i sur., 2006.). Nasuprot tome, pozitivna povezanost magnezija s oleaceinom može se tumačiti važnom ulogom ovog elementa u enzimskim reakcijama vezanima uz metabolizam fenola. Takvi obrasci ukazuju na potencijalnu regulacijsku ulogu mineralnih elemenata u sintezi i akumulaciji fenolnih spojeva u maslini, što bi moglo biti ključno u razumijevanju razlika u kvaliteti lista, a time i u funkcionalnim svojstvima ekstrakata.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su hipotezu da se koncentracije fenolnih spojeva i mineralnih elemenata u maslinovu lišću značajno mijenjaju tijekom različitih rokova uzorkovanja. Oleuropein je imao najviše vrijednosti 80 dana nakon cvatnje i za vrijeme rezidbe, dok su oleacein i oleanolna kiselina pokazali sličan, ali blaži sezonski trend. Od mineralnih elemenata, Mg, P, S, Mn i Zn povećavali su se do rezidbe, dok su K i Fe pokazali suprotnu dinamiku. Osim sezonskih promjena, uočene su i značajne korelacije između određenih minerala i fenolnih spojeva, negativna između kalija i oleaceina te pozitivna između magnezija i oleaceina, što sugerira povezanost mineralne ishrane s biosintezom fenola u lišću.

Ovi rezultati naglašavaju važnost pravilnog odabira vremena uzorkovanja lišća, jer koncentracije fenola dosežu najveće vrijednosti tijekom rezidbe. To je posebno značajno za proizvodnju ekstrakata s mogućom primjenom u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Dodatno, upravo u razdoblju rezidbe nastaje i najveća količina lišća kao nusprodukta, što dodatno povećava njegovu vrijednost kao sirovine.

Za buduća istraživanja preporučuje se testiranje ovih obrazaca u različitim agroekološkim uvjetima, tijekom više vegetacijskih sezona, u različitim regijama Hrvatske, uzimajući u obzir i fenomen alternirajuće rodnosti masline. Uz to, bilo bi korisno dodatno istražiti kako mineralni sastav tla i hranjivih tvari utječe na biosintezu pojedinih fenolnih spojeva. Na taj način moglo bi se doći do jasnijih zaključaka koji se tiču praktičnih preporuka o optimalnom gospodarenju maslinicima i korištenju lišća kao vrijedne sirovine.

ZAHVALA

Ovaj rad je sufinanciran projektom „Sustainable plant protection transition: a global health approach“ (SPRINT), financiranim iz EU HORIZON 2020 research and innovation programme (grant agreement No. 862568), te projektom „PROtein hydrolysates as GREen tools in SuSustainable olive production“ (PROGRESS) (Weave HRZZ-IPP-2022-10-8305 i ARIS project N4-0346), financiranim od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Rad doktoranda Simonea Bernobića sufinanciran je iz “Projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti” Hrvatske zaklade za znanost (NPOO-DOK-2023-10-7709).

Rad doktoranda Ivana Dlačića sufinanciran je iz “Projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti” Hrvatske zaklade za znanost (NPOO-DOK-2023-10-1951).

REFERENCE

1. Alagna, F., Mariotti, R., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., Esposto, S., Taticchi, A., Rosati, A., Rao, R., Perrotta, G., Servili, M. and Baldoni, L. (2012.): Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology*. 12(1), pp.1–19.
2. Bacelar, E.A., Santos, D.L., Moutinho-Pereira, J.M., Gonçalves, B.C., Ferreira, H.F. and Correia, C.M. (2006.): Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science*. 170(3), pp.596–605.
3. Brito, C., Dinis, L.T., Moutinho-Pereira, J. and Correia, C.M. (2019.): Drought Stress Effects and Olive Tree Acclimation under a Changing Climate. *Plants*. 8(7), p.232.
4. Cetinkaya, H., Koc, M. and Kulak, M. (2016.): Monitoring of mineral and polyphenol content in olive leaves under drought conditions: Application chemometric techniques. *Industrial Crops and Products*. 88, pp.78–84.
5. Connor, D.J. and Fereres, E. (2005.): The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Horticultural Reviews*, vol. 31, pp. 155–229. John Wiley & Sons.
6. Fernández-Escobar, R., Moreno, R. and García-Creus, M. (1999.): Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. *Scientia Horticulturae*, 82 (1-2), pp. 25-45.
7. Franić, M., Pasković, I., Marčelić, Š., Lukić, I., Major, N., Palčić, I., Goreta Ban, S. and Polić Pasković, M. (2024.): Discrimination of Farming Practices Through Olive Leaf Phenolic and Mineral Analysis. *Horticulturae* 2024, Vol. 10, Page 1334. 10(12), p.1334.
8. Giannakopoulou, E., Mitsopoulos, G., Hagidimitriou, M., Papageorgiou, V. and Komaitis, M. (2011.): Influence of cultivar, harvesting season and geographical origin on phenolic content in leaves of Greek olive cultivars. *Acta Horticulturae*. 924, pp.437–444.
9. Hashemi, P., Delfan, B., Ghiasvand, A.R., Alborzi, M. i Raeisi, F. (2010.): A Study of the Effects of Cultivation Variety, Collection Time, and Climate on the Amount of Oleuropein in Olive Leaves. *Acta Chromatographica*, 22(1), str. 133–140.
10. Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., M. Lorenzo, J., Barba, F.J., Prieto, M.A. and Simal-Gandara, J. (2020.): Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*. 9(8): 1014.

11. Liu, J. (1995.): Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 49(2), pp.57–68.
12. Lozano-Castellón, J., López-Yerena, A., Rinaldi de Alvarenga, J.F., Romero del Castillo-Alba, J., Vallverdú-Queralt, A., Escribano-Ferrer, E. and Lamuela-Raventós, R.M. (2020.): Health-promoting properties of oleocanthal and oleacein: Two secoiridoids from extra-virgin olive oil. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60(15), pp.2532–2548.
13. Lukić, I., Pasković, I., Žurga, P., Germek, V.M., Brkljača, M., Marčelić, Š., Ban, D., Grozić, K., Lukić, M., Užila, Z. and Ban, S.G. (2020.): Determination of the Variability of Biophenols and Mineral Nutrients in Olive Leaves with Respect to Cultivar, Collection Period and Geographical Location for Their Targeted and Well-Timed Exploitation. 9(12): 1667.
14. Mattioli, S., Machado Duarte, J.M., Castellini, C., D'Amato, R., Regni, L., Proietti, P., Businelli, D., Cotozzolo, E., Rodrigues, M. and Dal Bosco, A. (2018.): Use of olive leaves (whether or not fortified with sodium selenate) in rabbit feeding: Effect on performance, carcass and meat characteristics, and estimated indexes of fatty acid metabolism. *Meat Science*. 143, pp.230–236.
15. Nicoli, F., Negro, C., Vergine, M., Aprile, A., Nutricati, E., Sabella, E., Miceli, A., Luvisi, A. and De Bellis, L. (2019.): Evaluation of Phytochemical and Antioxidant Properties of 15 Italian *Olea europaea* L. Cultivar Leaves. *Molecules*. 24(10): 1998.
16. Omar, S.H. (2010.): Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*. 78(2), pp.133–154.
17. Ortega-García, F., Blanco, S., Peinado, M.Á. and Peragón, J. (2008.): Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiology*. 28(1), pp.45–54.
18. Pasković, I., Franić, M., Polić Pasković, M., Talhaoui, N., Marčelić, Š., Lukić, I., Fredotović, Ž., Žurga, P., Major, N., Goreta Ban, S., Vidović, N., Rončević, S., Nemet, I., Džafić, N. and Soldo, B. (2024.): Silicon Foliar Fertilisation Ameliorates Olive Leaves Polyphenolic Compounds Levels and Elevates Its Potential towards Different Cancer Cells. *Applied Sciences*, 14(11): p.4669.
19. Pasković, I., Lukić, I., Žurga, P., Germek, V.M., Brkljača, M., Koprivnjak, O., Major, N., Grozić, K., Franić, M., Ban, D., Marčelić, Š. and Ban, S.G. (2020.): Temporal Variation of Phenolic and Mineral Composition in Olive Leaves Is Cultivar Dependent. *Plants*. 9(9): 1099.

20. Polić Pasković, M., Vidović, N., Lukić, I., Žurga, P., Majetić Germek, V., Goreta Ban, S., Kos, T., Čoga, L., Tomljanović, T., Simonić-Kocijan, S., Ban, D., Godena, S. and Pasković, I. (2023.): Phenolic Potential of Olive Leaves from Different Istrian Cultivars in Croatia. *Horticulturae*. 9(5): 594.
21. Proietti, P., Nasini, L., & Famiani, F. (2006.): Effect of different leaf-to-fruit ratios on photosynthesis and fruit growth in olive (*Olea europaea* L.). *Photosynthetica*, 44(2), 275-285.
22. Del Río, J.A., Báidez, A.G., Botía, J.M. and Ortuño, A. (2003.): Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry*. 83(1): 75–78.
23. Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., Villanueva-Cañongo, C. (2019.): Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*.
24. Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A. V. and Boas, L.V. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. Fruits and leaves. *Food Science and Technology International*. 12(5): 385–396.
25. Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. 2005. Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*. 32(1): 45–53.
26. Stefi, A.L., Vassilacopoulou, D., Routsi, E., Stathopoulos, P., Argyropoulou, A., Skaltsounis, A.L. and Christodoulakis, N.S. (2021.): The Combined Environmental Stress on the Leaves of *Olea europaea* L. and the Relief Mechanism Through Biosynthesis of Certain Secondary Metabolites. *Journal of Plant Growth Regulation*. 40(3): 1044–1059.
27. Sueishi, Y. and Nii, R. (2020.): A comparative study of the antioxidant profiles of olive fruit and leaf extracts against five reactive oxygen species as measured with a multiple free-radical scavenging method. *Journal of Food Science*. 85(9): 2737–2744.
28. Therios, I.N. (2009.): *Olives. Crop production science in horticulture* 18. CAB International, Oxfordshire, United Kingdom
29. Xie, P., Huang, L., Zhang, C. and Zhang, Y. (2015.): Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. *Journal of Functional Foods*. 16, pp. 460–471.

Adrese autora – Author's addresses:

Simone Bernobić, univ. mag. biotech. in med.

Dopisni autor: e-mail: simone@iptpo.hr

dr. sc. Dean Ban

e-mail: dean@iptpo.hrr

Marija Polić Pasković, dipl. ing. agr.

e-mail: mpolic@iptpo.hr

dr. sc. Smiljana Goreta Ban

e-mail: smilja@iptpo.hr

dr. sc. Nikola Major

e-mail: nikola@iptpo.hr

dr. sc. Igor Palčić

e-mail: palcic@iptpo.hr

Ivan Dlačić, mag. ing. agr.

e-mail: ivan@iptpo.hr

dr. sc. Igor Pasković

e-mail: paskovic@iptpo.hr

Zavod za poljoprivredu i prehranu,

Institut za poljoprivredu i turizam

Karla Huguesa 8, 52440 Poreč

Received – primljeno:

20.08.2025.

Revised – revidirano:

08.10.2025.

Accepted – prihvaćeno:

08.10.2025.