

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



Ivana Đukić

Uticaj eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i origana (*Origanum vulgare*) na kvalitet ekstrapjevičanskog maslinovog ulja

MASTER RAD

Podgorica, oktobar 2024.

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Uticaj eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i origana (*Origanum vulgare*) na kvalitet ekstradjevičanskog maslinovog ulja

MASTER RAD

Podgorica, oktobar 2024.

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Ivana Đukić

Datum i mjesto rođenja: 13.11.1999. Podgorica

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Osnovne studije: Hemijska tehnologija, Metalurško-tehnološki fakultet

Godina završetka studija: 2022.

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Uticaj eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i origana (*Origanum vulgare*) na kvalitet ekstradjevičanskog maslinovog ulja

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 05.03.2024.

Datum prihvatanja teme: 17.04.2024.

Mentor: Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Svetlana Perović, PMF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, mentor

Prof. dr Slađana Krivokapić, PMF, član

Komisija za odbranu radu:

Prof. dr Svetlana Perović, PMF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, mentor

Prof. dr Slađana Krivokapić, PMF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: __. 10. 2024

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Ivana Đukić

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom „**Uticaj eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i origana (*Origanum vulgare*) na kvalitet ekstrapjevičanskog maslinovog ulja**“ rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

Podgorica, 2024.godine

Potpis studenta

Izvod

Eterična ulja i ekstrakti aromatičnih biljaka predstavljaju prirodnu alternativu vještačkim konzervansima u hrani. Njihov dodatak ekstradjevičanskom maslinovom ulju može doprinijeti smanjenju oksidacije masti. Ovaj master rad se bavi ispitivanjem uticaja dodatka eteričnih ulja i ekstrakata ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i divljeg origana (*Origanum vulgare*) na antioksidativna i senzorna svojstva ekstradjevičanskog maslinovog ulja.

Eterična ulja i ekstrakti ruzmarina i divljeg origana dobijeni su korišćenjem različitih tehnika ekstrakcije: hidrodestilacije, Soxhlet ekstrakcije i UV ekstrakcije. Uzorci ekstradjevičanskog maslinovog ulja su flavorizovani eteričnim uljima i ekstraktima ruzmarina i divljeg origana i izloženi dejstvu fotooksidativnog stresa. Kontrolna grupa je skladištena na tamnom mjestu i flavorizovana na isti način.

Vršena je analiza sledećih parametara u pripremljenim uzorcima maslinovog ulja: sadržaj ukupnih fenola, sadržaj slobodnih masnih kiselina, vrijednost saponifikacionog broja i vrijednost peroksidnog broja. Pripremljeni uzorci su podvrgnuti i organoleptičkoj analizi. Analize su vršene u intervalima od 15 dana u periodu od 45 dana.

Najveći sadržaj fenolnih jedinjenja nakon 45 dana imao je uzorak flavorizovan eteričnim uljem ruzmarina (EtR₁) i to 46,8 mg GAE/100g a najmanji u uzorku flavorizovanim eteričnim uljem divljeg origana (EtO₁) 16,28 mg GAE/100g. Sadržaj slobodnih masnih kiselina nakon 45 dana je bio najmanji u uzorku flavorizovanom ekstraktom divljeg origana (EO₁), 0,16% u a najveći u uzorku koji nije flavorizovan (M₁) i uzorku flavorizovanom ekstraktom ruzmarina (ER₁), 0,21%. Vrijednost saponifikacionog broja nakon 45 dana je bila najveća u uzorcima flavorizovanim eteričnim uljem i ekstraktom divljeg origana (EtO₁ i EO₁), 175 mg KOH/g a najmanja u uzorku koji nije flavorizovan (M₁), 140 mg KOH/g. Vrijednost peroksidnog broja bila najveća u uzorku koji nije flavorizovan (M₁), 8,5 meq O₂/kg a najmanja u uzorku flavorizovanim eteričnim uljem ruzmarina (EtR₁), 6 meq O₂/kg.

Analizom navedenih parametara, najbolja antioksidativna svojstva pokazao je uzorak flavorizovan ekstraktom divljeg origana. Najbolja organoleptička svojstva pokazao je uzorak koji je bio flavorizovan eteričnim uljem divljeg origana (EtO₁).

Ključne riječi: ekstradjevičansko maslinovo ulje, eterično ulje, ekstrakt, ruzmarin, divlji origano, fotooksidativni stres, antioksidanti

Abstract

Essential oils and extracts of aromatic plants represent a natural alternative to artificial preservatives in food. Their addition to extra virgin olive oil can contribute to the reduction of fat oxidation. The aim of this master's thesis was to examine the effect of the addition of essential oils and extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and wild oregano (*Origanum vulgare*) on the antioxidant and sensory properties of extra virgin olive oil.

Essential oils and extracts of rosemary and wild oregano were obtained using different extraction techniques: hydrodistillation, Soxhlet extraction, and UV extraction. Samples of extra virgin olive oil were flavored with essential oils and extracts of rosemary and wild oregano and exposed to photooxidative stress. The control group was stored in a dark place and flavored in the same w

The following parameters were analyzed in the prepared olive oil samples: total phenol content, free fatty acid content, saponification value, and peroxide value. The prepared samples were also subjected to organoleptic analysis. The analyses were conducted at 15-day intervals over a period of 45 days.

After 45 days, the sample flavored with rosemary essential oil (EtR₁) had the highest phenolic compound content, with 46,8 mg GAE/100g, while the lowest content was found in the sample flavored with wild oregano essential oil (EtO₁), with 16,28 mg GAE/100g. The free fatty acid content after 45 days was lowest in the sample flavored with wild oregano extract (EO₁) at 0,16% and highest in the non-flavored sample (M₁) and the sample flavored with rosemary extract (ER₁), both at 0,21%. The saponification value after 45 days was highest in the samples flavored with wild oregano essential oil and extract (EtO₁ and EO₁) at 175 mg KOH/g, and lowest in the non-flavored sample (M₁) at 140 mg KOH/g. The peroxide value was highest in the non-flavored sample (M₁) at 8.5 meq O₂/kg, and lowest in the sample flavored with rosemary essential oil (EtR₁) at 6 meq O₂/kg.

Based on the analysis of these parameters, the sample flavored with wild oregano extract demonstrated the best antioxidant properties. The sample flavored with wild oregano essential oil (EtO₁) exhibited the best organoleptic properties.

Key words: extra-virgin olive oil, essential oil, extract, rosemary, wild oregano, photooxidative stress, antioxidant

Zahvalnica

Ovaj master rad je rađen na Metalurško-tehnološkom fakultetu, u laboratoriji za organsku hemijsku tehnologiju, laboratoriji za instrumentalne metode i u prostorijama Barske uljare. Posebnu zahvalnost dugujem dr Mariji Markoč na strpljenju, savjetima i pomoći.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Biljani Damjanović-Vratnici na uloženom trudu, stručnim savjetima, strpljenju i razumijevanju tokom izrade ovog rada i tokom studiranja.

Zahvaljujem se prof. dr Svetlani Perović i prof. dr Slađani Krivokapić na izdvojenom vremenu i sugestijama.

Neizmjernu zahvalnost dugujem mojoj porodici, prijateljicama Milici, Teodori, Sari i Kseniji i mom Luki na bezuslovnoj ljubavi, podršci i razumijevanju.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1 Maslina	2
2.1.1 Istorijat	2
2.1.2 Botaničke karakteristike i taksonomija.....	2
2.1.3 Uzgoj	5
2.1.4 Berba.....	6
2.1.5 Tehnike berbe	7
2.1.6 Maslina u Crnoj Gori.....	9
2.2 Maslinovo ulje.....	10
2.2.1 Hemijski sastav maslinovog ulja	10
2.2.2 Organoleptičke karakteristike maslinovog ulja.....	11
2.3 Proizvodnja ekstradjevičanskog maslinovog ulja u Crnoj Gori	12
2.4 Ruzmarin.....	14
2.4.1 Hemijski sastav eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina	16
2.5 Divlji origano	19
2.5.1 Hemijski sastav eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana	21
2.6 Antioksidativna svojstva ruzmarina i divljeg origana	23
2.7 Eterična ulja u prehrambenoj industriji.....	25
2.7.1 Antimikrobno dejstvo eteričnih ulja u prehrambenoj industriji	26
2.7.2 Antioksidativno dejstvo eteričnih ulja u prehrambenoj industriji	27
2.8 Budući pravci razvoja	28
3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1 Priprema biljnog materijala.....	29
3.2 Metode ekstrakcije	29
3.3 Hemikalije, instrumenti i aparatura.....	33

3.4	Određivanje sadržaja ukupnih fenola	35
3.5	Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina	36
3.6	Određivanje saponifikacionog broja	36
3.7	Određivanje peroksidnog broja	37
3.8	Organoleptička analiza	38
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	39
4.1	Nomenklatura uzoraka	39
4.2	Određivanje sadržaja ukupnih fenola	40
4.2.1	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na sadržaj ukupnih fenola maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa.....	40
4.2.2	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ružmarina na sadržaj ukupnih fenola maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa.....	42
4.2.3	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na sadržaj ukupnih fenola maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa.....	44
4.2.4	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ružmarina na sadržaj ukupnih fenola maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa.....	46
4.3	Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina.....	47
4.3.1	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na sadržaj slobodnih masnih kiselina maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa.....	47
4.3.2	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ružmarina na sadržaj slobodnih masnih kiselina maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa.....	49
4.3.3	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na sadržaj slobodnih masnih kiselina maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa.....	50
4.3.4	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ružmarina na sadržaj slobodnih masnih kiselina maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa.....	51
4.4	Određivanje saponifikacionog broja	52
4.4.1	Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na vrijednost saponifikacionog broja maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa	52

4.4.2	Uticađ dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na vrijednost saponifikacionog broja maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa	54
4.4.3	Uticađ dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na vrijednost saponifikacionog broja maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa	54
4.4.4	Uticađ dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na vrijednost saponifikacionog broja maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa	56
4.5	Određivanje peroksidnog broja	57
4.5.1	Uticađ dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na vrijednost peroksidnog broja maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa.....	57
4.5.2	Uticađ dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na vrijednost peroksidnog broja maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa.....	59
4.5.3	Uticađ dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na vrijednost peroksidnog broja maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa.....	60
4.5.4	Uticađ dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na vrijednost peroksidnog broja maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa.....	61
4.6	Organoleptička analiza	62
5.	ZAKLJUČAK.....	66
6.	LITERATURA	68

1. UVOD

Maslinovo ulje ima dugu tradiciju upotrebe u mediteranskoj ishrani i prepoznato je po svojim izuzetnim nutritivnim i zdravstvenim svojstvima. Zahvaljujući svom jedinstvenom hemijskom sastavu posjeduje antioksidativna, antiinflamatorna i kardioprotektivna svojstva zbog čega je veoma cijenjen prehrambeni proizvod.

Međutim, kako bi se dodatno unaprijedila organoleptička svojstva i nutritivni profil ekstrapjevičanskog maslinovog ulja a izbjeglo korišćenje sintetičkih konzervativa, sve više se istražuje mogućnost obogaćivanja ovog ulja različitim prirodnim dodacima. U tom kontekstu, eterična ulja i ekstrakti aromatičnih biljaka kao što su ruzmarin (*Rosmarinus officinalis*) i origano (*Origanum vulgare*) postaju predmet intenzivnih istraživanja. Ove biljke su poznate po svom bogatom sadržaju fenolnih jedinjenja, antioksidativnim svojstvima i karakterističnim aromama, što ih čini idealnim kandidatima za poboljšanje kvaliteta maslinovog ulja.

Predmet istraživanja ovog rada je uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina i divljeg origana na kvalitet ekstrapjevičanskog maslinovog ulja. Analiziraće se promjene u hemijskom sastavu, antioksidativnim svojstvima, senzornim karakteristikama, kao i stabilnost ulja tokom skladištenja. Rezultati ovog istraživanja mogu pružiti važne uvide u mogućnosti kreiranja funkcionalnog proizvoda sa poboljšanim nutritivnim i senzornim svojstvima, što bi doprinijelo daljoj valorizaciji maslinovog ulja na tržištu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Maslina

2.1.1 Istorijat

Pripitomljavanje (domestikacija) biljaka i životinja bio je ključan korak u razvitku ljudske civilizacije ali određivanje istorije domestikacije je izazov [1]. Među starim zasadima mediteranskog basena, najpoznatija je *Olea europea* zbog svog kulturološkog, ekološkog i ekonomskog značaja. Ova biljka se smatra jednom od najboljih bioloških pokazatelja mediteranske klime a njena kultivacija je pratila nastanak ranomediteranske civilizacije [2].

Važnost kultivisanog maslinovog drveta u svakodnevnom životu ljudi u antičkim civilizacijama pretvorilo je ovu biljku u sveti simbol. U antičkoj Grčkoj, maslinovo drvo bilo je simbol mira a pobjednici Olimpijskih igara bili su krunisani vjencima od masline.

Porijeklo ove vrste je često predmet kontroverzi. Iako je rana eksploatacija i upotreba stabala divlje masline (olestera) dokumentovana još u doba neolita od Bliskog istoka do Španije, obično se prihvata da je domestikacija maslinovog drveta (karakterise je vegetativno razmnožavanje i zasnivanje voćnjaka) počela na Bliskom istoku prije otprilike 6000 godina [3].

Genetskim studijama utvrđeno je da sorte masline iz oblasti Mediterana mogu poticati iz više različitih izvora ali nije se moglo razjasniti da li je to usled sekundarne diversifikacije ili više nezavisnih primarnih događaja [2].

2.1.2 Botaničke karakteristike i taksonomija

Maslina je dio familije Oleaceae koja obuhvata rodove: *Fraxinus* (jasen), *Forsythia* (kineska forsitija), *Forestiera* (*F. neomexicana*, kalifornijska “divlja maslina”), *Ligustrum* (kalina), i *Syringa* (jorgovan) kao i *Olea* (maslina) [4].

Olea europaea ima šest podvrsta:

- *Olea cuspidate*;
- *Olea laperrinei*;
- *Olea maroccana*;
- *Olea cerasiformis*;

- *Olea guanchica*;
- *Olea europaea* subsp. *europaea* [4].

Olea europaea subsp. *europaea* ima dvije varijacije: *sylvestris* i *europaea*.

Olea europaea subsp. *europaea* var. *sylvestris* je tipično drvo u oblasti Mediterana. Mnogi autori ga smatraju šumskim drvetom. S obzirom da je maslina najdugotrajnija biljna vrsta, brojna viševjekovna stabla varijacije *sylvestris* prisutna su u svim evropskim mediteranskim zemljama. Procesom urbanizacije i čestim šumskim požarima širom Mediterana, populacija ove vrste je ugrožena [5].

Drvo masline *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* je žbunasto, deblo je često uvijeno, a može dostići visinu do 15 m kod monumentalnih primjeraka [6].

Kora masline je sivo-pepeljaste boje, manje-više glatka kod mladih stabala, a kod odraslih postaje hrapava. Za razliku od kore, listovi masline su glatki. Ploča je eliptično - kopljastog oblika, adaksijalna površina je zelena i gola, abaksijalna ima male srebrne štitaste ljuske. Cvjetovi su bijeli, na peteljka, veoma brojni i grupisani u pazušne grozdaste cvasti. Čašica cvijeta obično ima četiri jajolika lista, dok je bijeli vjenčić formiran od četiri latice veličine 2-4 mm. U cvijetu se nalaze dva prašnika. Plod je jajasto-kuglasta bobica; prečnika je 5 - 7 mm i dužine 10 - 15 mm. Pulpa ploda je u početku zelena, a u zrelosti braon boje [7]. Izgled stabla stable i ploda masline *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* prikazan je na slici 1.



Slika 1. a) *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*; b) Plod biljke *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* [6]

Kultivisana maslina - *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* može dostići visinu od samo nekoliko metara do 20 m. Drvo se odupire propadanju, a kada se vrh drveta ošteti mehaničkim

oštećenjem ili ekstremnim uslovima okoline, iz korijenovog sistema počinje rast novog dijela biljke. Bilo da se razmnožava sjemenom ili reznicama, korijenov sistem je uglavnom plitak, i širi se do 0,9 - 1,2 m čak i u dubokim zemljištima. Nadzemni dio stabla masline prepoznatljiv je po gustom skupu krakova i kompaktnoj prirodi lišća. Svjetlost ne prodire lako u unutrašnjost maslinovog drveta osim ako se drvo dobro ne orezuje. Ako se ne orezuju, masline razvijaju više grana sa kaskadnim krakovima. Grane su u stanju da nose velike populacije plodova na završnim grančicama, koje su viseće i fleksibilne. Plodovi ove vrste masline se koriste u komercijalne svrhe i u ishrani ljudi [8].

Listovi su debeli i glatki, rastu tokom perioda od dvije godine. Listovi imaju stomate smještene u peltatnim trihomima koji ograničavaju gubitak vode i čine maslinu relativno otpornom na sušu. Cvjetovi mogu biti bijeli ili svijetlo žuti. Cvjetni pupoljci se nalaze u pazuhu svakog lista. Pupoljci mogu ostati u mirovanju duže od godinu dana, a zatim početi da rastu, formirajući održive cvasti sa cvjetovima sezonu kasnije nego što se očekivalo. Svaka cvast sadrži 15-30 cvjetova, u zavisnosti od sorte. Cvjetna inicijacija se dešava do novembra, nakon čega se dijelovi cvijeta formiraju u martu. Induktivna faza cvjetanja u maslini može se desiti već u julu (oko 6 nedelja nakon punog cvjetanja), ali početak se može videti tek 8 mjeseci kasnije u februaru [9].

Plod masline botanički je sličan šljivi, bademu, kajsiji, nektarini i breskvi. Kada je plod nezreo, zelene je boje a sazrijevanjem postepeno mijenja boju u žutu (sličnu boji slame) ili svijetlo braon [8].



Slika 2. a) *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*; b) Različite faze zrelosti ploda kultivisane masline [10]

2.1.3 Uzgoj

Uzgoj maslina je značajna poljoprivredna praksa, posebno u Mediteranskom basenu i predmet je opsežnog naučnog istraživanja. Drvo masline (*Olea europaea* L.) je dobro prilagođeno ekološkim uslovima Mediterana [11]. Međutim, sve veća međunarodna potražnja za maslinovim uljem i stonim maslinama dovela je do širenja uzgoja maslina na netradicionalne regione, uključujući zemlje na južnoj hemisferi poput Argentine, Čilea, Perua i Australije. Nova okruženja imaju različite klimatske faktore, koji mogu uticati na različite aspekte uzgoja maslina, kao što su cvjetanje, potrebe za vodom i kvalitet ulja [12]. Proces pripitomljavanja stabla masline, koji uključuje više generacija, klonsko razmnožavanje i miješanje sa lokalnim oblicima, tema je istraživanja. Razumijevanje ovih procesa je ključno za predviđanje odgovora usjeva na buduće globalne promjene i poboljšanje programa uzgoja [11].

Ključni faktori koji utiču na uzgoj maslina su:

1. **Klimatske promjene:** Klimatske promjene predstavljaju značajnu prijetnju poljoprivrednim sistemima širom svijeta. Za stabla maslina, poseban problem predstavljaju porast nivoa ugljen-dioksida (CO₂), povećanje temperature i smanjenje padavina. Ove promjene mogu uticati na fotosintezu, disanje, fenologiju, upotrebu vode i na kraju prinos maslina. Predviđanje faza razvoja maslinovog drveta važno je za potrebe agronomskog upravljanja kako bi se predvidio budući uticaj na klimu i proaktivno djelovalo u pravcu prilagođavanja i strategija ublažavanja negativnog uticaja klimatskih promjena [13].
2. **Zemljište:** Svojstva zemljišta uključujući nagib, dubinu i gustinu zemljišta, sadržaj organskih materija i plodnost značajno utiču na prinos maslina. Razumijevanje ovih parametara zemljišta je veoma značajno za procjenu efekata na prinose maslina [14]. Ekspanzija i povećan trend uzgoja maslina, posebno od kraja 18. vijeka ubrzali su procese erozije. Erozijska može dovesti do smanjenja dubine profila tla, što može uticati na prinos, posebno u nagnutim područjima gdje se masline obično i uzgajaju. Agroekološke mjere koje se primenjuju od ranih 2000-ih npr. u Južnoj Španiji smanjile su stope erozije, ali su one i dalje visoke u velikom dijelu površine maslina u tom regionu [15]. Mikrobiom zemljišta igra značajnu ulogu u zdravlju, produktivnosti i otpornosti stabala masline. Određeni mikroorganizmi u zemljištu mogu suzbiti biljne patogene, čime se smanjuje učestalost bolesti. Na primjer, poznato je da arbuskularne mikorizne gljive i rizobakterije koje podstiču rast biljaka poboljšavaju zdravlje i

produktivnost biljaka. Efikasno upravljanje zemljištem je ključno za poboljšanje uzgoja, od faze sadnje do proizvodnje u polju [16].

3. **Voda:** Širenje uzgoja maslina na netradicionalne regione, uključujući zemlje na južnoj hemisferi, dovelo je do novih izazova. Nedostatak padavina u zimskom i proljećnom periodu rezultirao je hitnom potrebom da se procjene potrebe za vodom od perioda diferencijacije cvjetova u zimskom periodu do ranog rađanja ploda [12]. Dostupnost vode značajno utiče na rast maslina, razvoj plodova i kvalitet ulja. U regionima sa sušnom ili polusušnom klimom, deficit vode je izazov. Zaslanjenost zemljišta koja je rezultat navodnjavanja vodom niskog kvaliteta ograničava uzgoj maslina u mediteranskom basenu. Pravilno upravljanje navodnjavanjem je ključno da bi se obezbijedilo optimalno snabdijevanje vodom bez izazivanja stresa ili viška vlage [17].
4. **Rizik od štetočina:** Sadnice masline često pate od štetočina i bolesti koje smanjuju kvalitet berbe, a samim tim i prinos masline. Na rizik od štetočina u uzgoju maslina utiču različiti faktori uključujući klimatske promjene, upotreba pesticida i zdravlje zemljišta. Rizik od infekcije štetočinama u uzgoju maslina je multifaktorski i složen, pri čemu biološka kontrola igra ključnu ulogu. Biološka kontrola je važna, posebno u upravljanju *Bactrocera oleae* (muva masline), glavnom štetočinom maslinovog drвета. Efikasne strategije protiv štetočina masline fokusiraju se na smanjenje upotrebe konvencionalnih pesticida zbog štetnih efekata kao što su razvoj otpornosti i zagađenje životne sredine. Tehnike kao što su hemijska rotacija, biološka kontrola i primjena biopesticida se preporučuju za rješavanje aktuelnih problema i očuvanje održivosti životne sredine [18].

2.1.4 Berba

Kvalitet ploda masline u velikom dijelu zavisi od biranja optimalnog vremena za berbu. Berba u pravoj fazi zrelosti značajno utiče na ukus, sadržaj ulja i ukupan kvalitet. Period sazrijevanja ploda prate četiri faze (kada govorimo o maslinama koje sazrijevaju u sjevernoj hemisferi):

1. **“Zelena” faza:** Traje od avgusta do sredine septembra – spoljašnost ploda masline je uniformno zelene boje;
2. **“Svijetlo zelena” faza:** Od sredine septembra do prve nedelje oktobra zelena boja prelazi u svijetlo zelenu;
3. **“Ljubičasta” faza:** Od prve nedelje oktobra do poslednje nedelje novembra dolazi do značajnih promjena u boji ploda masline. Boja postaje crvenkasto-ljubičasta često zahvatajući

samo vrh ploda a zatim, sazrijevanjem ploda, proteže se preko cijele površine ploda, sa sve tamnijim tonovima progresivno težeći crnoj. Prvi dio ljubičaste faze često se označava kao „*veraison*“ što na francuskom jeziku znači „početak zrenja“;

4. „Crna“ faza: Kada je sva koža ujednačeno crna, a maslina se može smatrati prezrelom [19].

2.1.5 Tehnike berbe

Ručna berba: Tradicionalna i najšire korišćena metoda. Podrazumijeva čupanje maslina sa stabala, bilo ručno ili uz pomoć malih grabulja ili češlja. Ručna berba omogućava pažljiv odabir zrelih maslina, a minimizira oštećenje stabla i njegovih grana. Predstavlja radno intenzivnu metodu koja je poželjna za visokokvalitetnu proizvodnju maslina jer obezbjeđuje minimalno oštećenje plodova. Prilikom ručne berbe maslina razlikujemo tri tehnike:

1. Sakupljanje zrelih plodova sa zemlje;
2. Skidanje plodova poluotvorenim šakama (“muženje”). Plodovi padaju u vreće ili mreže postavljene ispod stabla;
3. Udaranje grana pomoću štapova u cilju odvajanja ploda od grane; plodovi takođe padaju u mreže za skupljanje [20].



Slika 3. Ručno branje maslina [21]

Mehanička berba: U velikim voćnjacima koriste se mehanički kombajni. Ove mašine tresu stabla maslina, uzrokujući da zrele masline padnu na površinu za sakupljanje (kao što je cerada). Mehanizacija u poljoprivrednim operacijama može poboljšati profitabilnost povećanjem

produktivnosti rada i smanjenjem troškova proizvodnje. Na održivost sistema žetve utiču tehničke performanse, ekonomska procjena i procjena životne sredine. Troškovi rada značajno utiču na troškove proizvodnje maslinovog ulja, pri čemu se mehanička berba smatra rješenjem za smanjenje ovih troškova. Mehanizovana berba može pomoći u održavanju nivoa kvaliteta maslinovog ulja, obezbeđujući pristup vrhunskim tržištima i ekonomsku profitabilnost. Složenost određivanja najpogodnijeg sistema berbe zahteva preciznu analizu uzimajući u obzir specifične karakteristike i uslove voćnjaka [22].

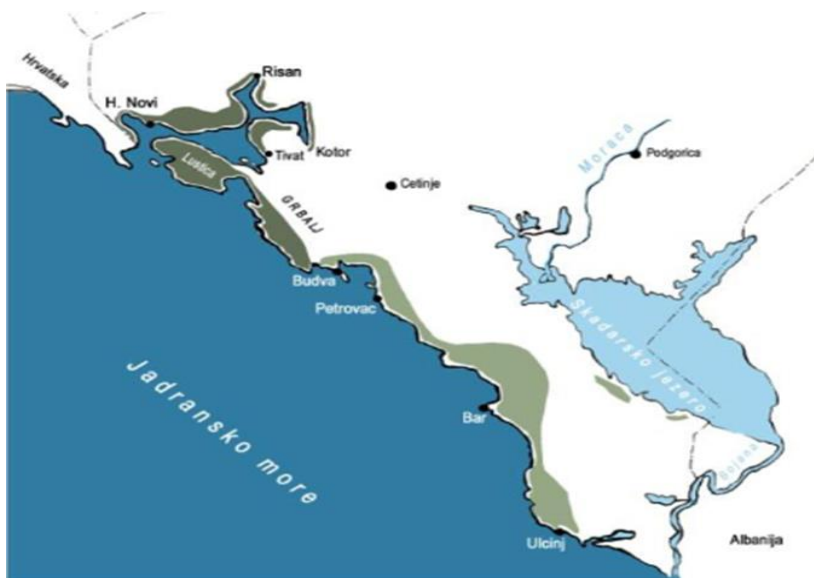
Još jedan način mehaničke berbe maslina je korišćenje električnih ručnih kombajna. Ove sprave rade na principu vibracije, koriste se u onim maslinjacima gdje nisu mogući visoki nivoi mehanizacije. Ove mašine su sposobne povećati produktivnosti radnika tri puta u odnosu na korišćenje ručnih metoda berbe, a takođe smanjuju troškove berbe. Upotreba vibrirajuće opreme je vrlo česta u poljoprivredi za operacije berbe širokog spektra proizvoda. Nažalost, kada radnici koriste ove mašine, fokus je stavljen na produktivnost i vrlo često se potcenjuje ergonomija i bezbjednosni aspekti. Vibracija sistema šaka-ruka je vjerovatno najvažniji rizik povezan sa upotrebom prenosnih kombajna i vibracionih alata uopšte. Izloženost vibracijama može dovesti do nekoliko hroničnih poremećaja koji uključuju senzorne, vaskularne i muskuloskeletorne simptome: sekundarni Raynaud-ov fenomen, mrtvi prst, traumatska vazospastična bolest i sindrom vibracije (HAVS – Hand-Arm Vibration Syndrome *eng.*) [23, 24, 25].



Slika 4. Branje maslina pomoću električnih ručnih kombajna [25]

2.1.6 Maslina u Crnoj Gori

Masline se u Crnoj Gori uzgajaju na području od 3200 ha uglavnom na crnogorskom primorju. U 2020. godini, proizvedeno je 550,2 t maslina od čega je 294,9 t maslina proizvedeno na plantažama [26].



Slika 5. Područja u Crnoj Gori gdje se gaje masline [27]

U Crnoj Gori se nalaze različite sorte masline, autohtone i pripitomljene. Najveći broj stabala maslina su stabla Žutice koja je posebno zastupljena u regiji Bara, Ulcinja i Budve. U Boko-Kotorskoj subregiji pored Žutice zastupljene su i sorte: Crnica, Sitnica, Lumbardeska, Šarulja i neke manje zastupljene sorte. Od stranih sorti koje su zastupljene najbrojnije su: Picholine, Coratina i Leccino [27].

Stara Maslina koja se nalazi na Mirovici, opština Bar, jedno je od najstarijih stabala masline u regionu i šire. Stara je preko 2000 godina i ukazuje na to da je maslinarstvo u Baru razvijeno dugi niz godina. Stara Maslina ima veliki kulturološki i istorijski značaj. Smatra se da je mjesto Mirovica u kom se nalazi Stara Maslina dobilo ime po tome što su se tu organizovala okupljanja i savjetovanja u cilju očuvanja mira. Tokom Drugog svjetskog rata, italijani su htjeli da kupe ovo drvo po cijeni od 2,5 miliona zlatnih lira ali vlasnik imanja nije htio da ga proda. Danas je Stara Maslina važna turistička atrakcija i simbol grada Bara gdje se održavaju brojne kulturne manifestacije [28].

2.2 Maslinovo ulje

Maslinovo ulje je prehrambeni proizvod koji se dobija preradom maslina i predstavlja važan dio mediteranske kuhinje zbog svog jedinstvenog ukusa, karakteristika i zdravstvenih benefita. Kvalitet maslinovog ulja zavisi od više faktora: sorte masline, zrelosti ploda, metode berbe, vremenskog intervala između berbe i proizvodnog procesa, tipa proizvodnog procesa, načina pakovanja i skladištenja [29].

Maslinovo ulje je ulje koje se dobija isključivo od plodova maslina (*Olea europea L.*)

Djevičansko maslinovo ulje je ulje koje je dobijeno u procesu koji ne dovodi do promjena u ulju i koje nije prošlo bilo kakav tretman osim pranja, dekantacije, centrifugiranja i filtracije. Djevičanska maslinova ulja koja su pogodna za direktnu potrošnju uključuju sledeće kategorije:

- a) *Ekstradjevičansko maslinovo ulje;*
- b) *Djevičansko maslinovo ulje;*
- c) *Obično djevičansko maslinovo ulje;*

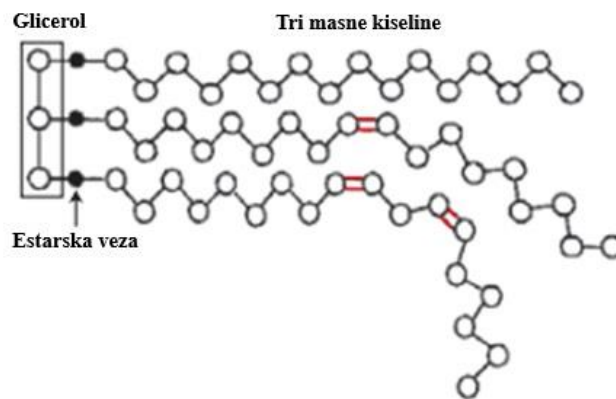
Razlika između ove tri kategorije djevičanskih ulja ogleda se prvenstveno u sadržaju slobodnih masnih kiselina. Kod ekstradjevičanskog maslinovog ulja sadržaj slobodnih masnih kiselina (izraženih kao oleinska kiselina) ne smije prelaziti sadržaj 0,8 grama na 100 grama ulja, kod djevičanskog maslinovog ulja 2 grama na 100 grama a kod običnog djevičanskog ulja 3,3 grama na 100 grama ulja [30].

Djevičanska maslinova ulja koja nisu pogodna za direktnu potrošnju uključuju sledeće kategorije:

- a) rafinisano maslinovo ulje;
- b) ulje od komine masline [30].

2.2.1 Hemijski sastav maslinovog ulja

U hemijski sastav maslinovog ulja ulazi brojna grupa jedinjenja. Trigliceridi zauzimaju od 95 do 98 zapreminskih procenata maslinovog ulja. Ostatak ulja, iako samo mali dio u odnosu na trigliceride, uključuje veoma veliki broj manjih jedinjenja: slobodne masne kiseline, glicerol, fosfatide, pigmente, aromatična jedinjenja i sterole. Ova jedinjenja daju maslinovom ulju svoj jedinstveni ukus i u velikoj mjeri doprinose nutritivnim vrijednostima. U rafinisanom ulju, mnoge od ovih komponenti od njih se uklanjaju [31].



Slika 6. Molekul triglicerola [32]

Masne kiseline koje ulaze u sastav maslinovog ulja su: stearinska, palmitinska, oleinska, palmitoleinska, linolna i α -linolenska. Fenolna jedinjenja koja su prisutna u maslinovom ulju, iako su zastupljena u manjoj koncentraciji, utiču na nutritivne i senzorne karakteristike i imaju visoku antioksidativnu aktivnost [33].

Maslinovo ulje je posebno obogaćeno mononezasićenom oleinskom masnom kiselinom čiji je procentualni sadržaj od 75 do 80% ukupnih masnih kiselina. Palmitinska, stearinska, linolna i α -linolenska kiselina su procentualno manje zastupljene. Sastav masnih kiselina maslinovog ulja varira među sortama. Temperatura i svjetlost tokom sazrijevanja plodova, mogu jako uticati na ravnotežu između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina [34].

Sve sastavne materije maslinovog ulja mogu biti podijeljene u dvije grupe – komponente koje se mogu saponifikovati i neosapunjive komponente. U komponente koje se mogu saponifikovati spadaju trigliceridi, slobodne masne kiseline i fosfatidi a u neosapunjive komponente spadaju ugljovodonici, steroli i masni alkoholi [31]. Saponifikacija je proces u kome se trigliceridi kombinuju sa jakim bazom da bi se formirale soli metala masnih kiselina tokom procesa pravljenja sapuna [35].

2.2.2 Organoleptičke karakteristike maslinovog ulja

Organoleptičke karakteristike predstavljaju skup senzacija koje opažaju čula. Organoleptička analiza djevičanskog maslinovog ulja ima za cilj da analizira i tumači karakteristike datog uzorka ulja kako bi ga klasifikovali. Senzorno vrednovanje treba da bude objektivno i standardizovano koliko god je to moguće, sa ciljem minimiziranja subjektivnog tumačenja koja se mogu javiti kroz čulne percepcije. Vrednovanje čulnih atributa vrši grupa obučanih stručnjaka koji čine test panel. Način izvođenja degustacija, potreban ambijent, uslovi i sistem bodovanja su standardizovani. Ne mogu se sve vrste

ulja senzorski analizirati ali činjenica da je djevičansko maslinovo ulje sok ploda omogućava njegovu analizu kroz čulno opažanje. Neosapunjiva materija u djevičanskom maslinovom ulju je izvor arome i ukusa uprkos tome što zauzima veoma mali procenat u ulju [36].

Pozitivni senzorni parametri koji se ispituju su:

- Voćnost (aroma) – osjete se mirisi karakteristični za ulje koji zavise od sorte i potiču od zdravih, svježih maslina (zrelih ili nezrelih); percipira se direktno ili kroz zadnji dio nosa (retronazalno). Deskripcija voćnosti (zelena ili zrela) dobija se upoređujući ukus sa zelenom jabukom;
- Gorčina - karakterističan ukus ulja dobijenog od nezrelih maslina; percipira se na zadnjoj strani jezika;
- Pikantnost (oporost) - osjećaj “grickanja” karakterističan za određene sorte maslina ili ulje proizvedeno od nezrelih maslina; percipira se u grlu.

Deskriptori negativnih atributa na koje se treba fokusirati su:

- Vinsko-sirćetni ukus - karakterističan ukus određenih ulja koji podsjeća na vino ili sirće. Ovaj ukus je uglavnom rezultat aerobne fermentacije u maslinama što dovodi do stvaranja sirćetne kiseline, etil-acetata i etanola;
- Prisustvo vegetativne vode - aroma koju ulje dobija kao rezultat produženog kontakta sa tečnom, neuljnom frakcijom masline;
- Užeglost – karakteristična aroma ulja izazvana prekomjernim ili produženim zagrijavanjem tokom obrade [37].

Kada test panel procijeni senzorne parametre djevičanskih maslinovih ulja sa urađenom fizičko-hemijskom analizom akreditovane laboratorije vrši klasifikacija ulja [36].

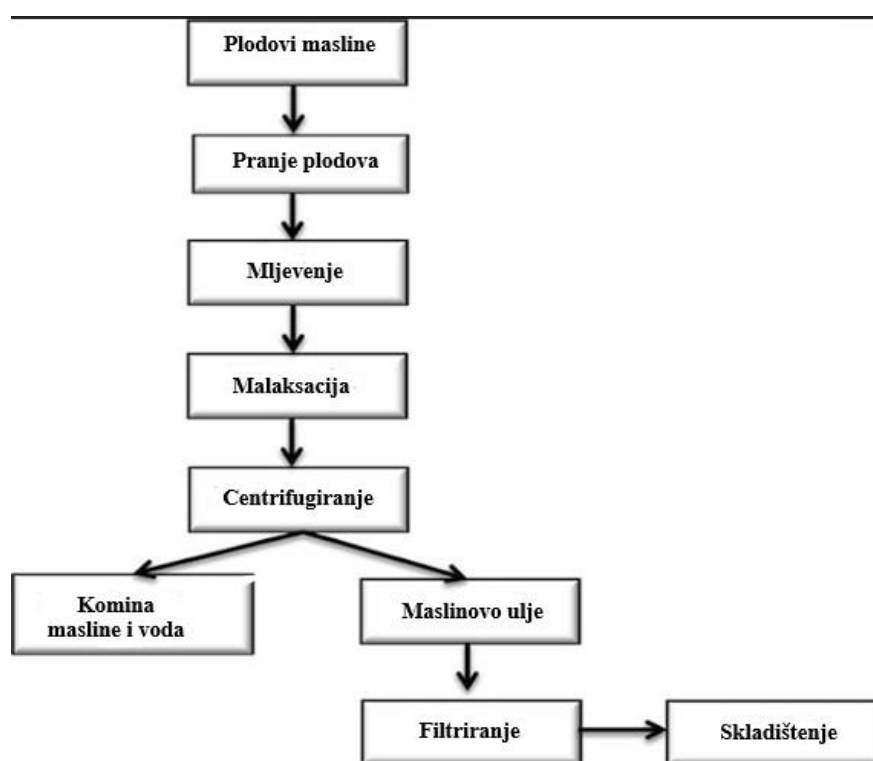
2.3 Proizvodnja ekstradjevičanskog maslinovog ulja u Crnoj Gori

U Crnoj Gori ekstradjevičansko maslinovo ulje se proizvodi na dva načina:

1. Prerada mehaničkim postupkom hladnog centrifugiranja (savremena metoda);
2. Mljevenje upotrebom kamenog mlina i izdvajanje ulja presovanjem (tradicionalna metoda).

Zajednički korak u proizvodnji maslinog ulja u Crnoj Gori, bez obzira na metodu, je čišćenje i pranje plodova koje se vrši automatskim uređajima koji rade na principu usisavanja i uklanjanja grančica, lišća i ostalih nečistoća vodom. Nakon čišćenja pristupa se mljevenju ploda kako bi se dobilo tijesto u vidu homogene smjese.

Tradicionalnim načinom proizvodnje koriste se kameni mlinovi. Minimalna veličina kapljica za kontinuirani proces odvajanja maslinovog ulja je 30 mm, ali samo 45% kapljica ulja ima prečnik veći od 30 mm nakon mljevenja. Formiranje kapi većeg prečnika iz kapljica ulja vrši se malaksacijom. Prednost ovog načina proizvodnje je što se ne stvara emulzija i ne zagrijava se tijesto. Malaksacija i mljevenje su glavni koraci koji utiču na kvalitet i prinos ulja. Tijesto se zatim stavlja na hidrauličke prese gdje se maslinovo ulje postepeno izdvaja pod pritiskom [38,39].



Shema 1. Tehnološka shema proizvodnje maslinovog ulja [38]

Savremeni načina proizvodnje karakteriše korišćenje kontinuiranih mlinovi izrađenih od nerđajućeg čelika, znatno većeg kapaciteta, brzine i efikasnosti rada. Ovakvim načinom mljevenja stvara se emulzija, koja se otklanja miješanjem samljevene mase. Sledeći korak je centrifugiranje, koje se temelji na razlici u specifičnoj težini vode, ulja i komine. Nakon centrifugiranja, dobijeno maslinovo ulje treba da odleži a zatim se odvodi na filtraciju i skladištenje [37].

U d.o.o. „Barska uljara“, gdje su proizvedeni uzorci korišteni za analizu u ovom master radu, maslinovo ulje se proizvodi savremenom metodom – postupkom hladnog cijedenja. Linija za preradu maslina opremljena je sa dva vertikalna mješača koja rade po vakuumskom principu čime su onemogućena eventualna kvarenja maslinovog ulja uzrokovana procesom oksidacije. Pakovanje maslinovog ulja Barsko zlato vrši se automatskom punilicom, čepilicom i etiketirkom. Zbog korišćenja savremene opreme, u toku jednog časa moguće je pakovati oko 500 flaša. Maslinovo ulje se skladišti u nadzemnim i podzemnim inox bazenima.



Slika 7. Pogon za proizvodnju ekstraprevičanskog maslinovog ulja u d.o.o “Barska uljara” (foto: Barska uljara)

2.4 Ruzmarin

Ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je zimzelena aromatična biljka iz porodice *Lamiaceae*. Ime je dobila od latinskih riječi *ros* što znači rosa i *marinus* sa značenjem more [40].

Ruzmarin se koristi još od antičkih vremena. Tako su Egipćani stavljali grančice ruzmarina u grobnice faraona da bi osigurali mirisan put u zagrobni život dok su Grci i Rimljani smatrali da ruzmarin ima

mistične moći i da ih može zaštititi od zlih duhova ukoliko ga budu gajili u baštama. Prema narodnim vjerovanjima, biljka će rasti samo u baštama onih koji zaslužuju biti zaštićeni [41].

U prirodnim uslovima može dostići visinu od 1 do 2,5 metara. Stabljike su četvorouglaone, uspravne i gusto su prekrivene malim, gotovo igličastim listovima dužine oko 3,5 cm koji podsjećaju na četinare. Gornja površina lista je zelena dok je donja siva, pomalo vunasta zbog brojnih trihoma. Ruzmarin cvjeta od početka juna do početka avgusta. Cvjetovi su dvousnaati, veoma mali, svijetloplavi (mogu biti i bijeli ili ružičasti) skupljeni u terminalne grozdaste cvasti [42]. Na slici 8 prikazan je cvijet ruzmarina.

Zbog moćnog korijenovog sistema, ruzmarin može da uspijeva na lakim i nutritivno siromašnim zemljištima kao i na sušnim terenima [43].



Slika 8. Cvijet ruzmarina [44]

Vodi porijeklo iz mediteranske regije ali se uzgaja i u drugim djelovima svijeta, uključujući i države uz obalu Crnog mora, SAD, Meksiko, Brazil, Novi Zeland itd [42].

U Crnoj Gori ruzmarin nije rasprostranjen u prirodi već se gaji u domaćinstvima – u saksijama, baštama i vrtovima [43].

Na slici 9 prikazana je geografska rasprostranjenost ruzmarina u svijetu.



Slika 9. Geografska rasprostranjenost ruzmarina u svijetu [45]

Iako na slici 9 nije prikazano prisustvo ruzmarina u većini zemalja Azije, ruzmarin se gaji i u tom dijelu svijeta, samo ne u tolikoj mjeri kao u ostalim regionima prikazanim na slici 9. Budući da biljka vodi porijeklo sa Mediterana, ne čudi činjenica da je Španija najveći uzgajivač ruzmarina a prate je Francuska, Italija i Tunis [45].

2.4.1 Hemijski sastav eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina

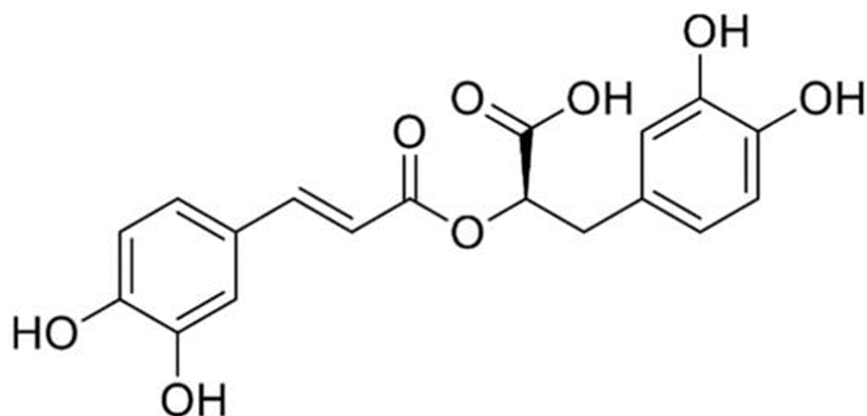
Eterično ulje ruzmarina je veoma dobro proučeno zbog široke primjene u raznim granama industrije – farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj itd [46].

Eterično ulje ruzmarina je bezbojna ili blijedo žuta viskozna tečnost intenzivnog, karakterističnog mirisa. Njegova udio u težini iznosi od 1 do 2,5 procenata ukupne težine biljke a njegov hemijski sastav zavisi od geografskog položaja biljke, klime, dijela biljke iz kog je vršena ekstrakcija i metode ekstrakcije koja je korišćena [47].

Istraživanja takođe pokazuju da stresovi iz životne sredine, poput saliniteta, mogu uticati na hemijski sastav ruzmarina. Na primjer, pokazalo se da povećani salinitet u zemljištu na kome se ruzmarin gaji utiče na smanjenje sadržaja vlage i ugljenih hidrata u samoj biljci, dok povećava koncentraciju fenolnih jedinjenja, kao odgovor biljke na oksidativni stres izazvan visokim sadržajem soli koju usvaja iz zemljišta [48].

Ruzmarinska kiselina je fenolno jedinjenje, ester kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenil mlječne kiseline. Njena molekulska formula je $C_{18}H_{16}O_8$ i formalno je poznata kao (R)-a-[[3-(3,4-

dihidroksifenil)-1-okso-2E-propenil]oksi]-3,4-dihidroksi-enzenpropanska kiselina. Prvi put je izolovana iz ruzmarina po kome je i dobila ime. Njena strukturna formula prikazana je na slici 10 [49].



Slika 10. Strukturna formula ruzmarinske kiseline [49]

Jiang i saradnici su koristeći gasnu hromatografiju-masenu spektrometriju (GC-MS) identifikovali 22 različite komponente u ulju od čega su najzastupljenije komponente bile 1,8-cineol i α -pinen u procentima od 26,54% odnosno 20,14%, respektivno [50]. Hemijski sastav eteričnog ulja ruzmarina koje su analizirali Sienkiewicz i saradnici sastojao se od 1,8-cineola (46,4%), kamfora (11,4%) i α -pinena (11,0%) [51]. Bendeddouche i saradnici su analizom eteričnog ulja ruzmarina zaključili da su u njemu prisutni kamfor (37,6%), 1,8-cineol (10%), p-cimen (7,8%) i borneol (5,4%) kao glavne komponente [52].

Ekstrakt ruzmarina sadrži veliki broj jedinjenja uključujući terpene, flavonoide, fenolne kiseline itd. Hemijski sastav ekstrakta ruzmarina zavisi od načina ekstrakcije i rastvarača koji se koriste.

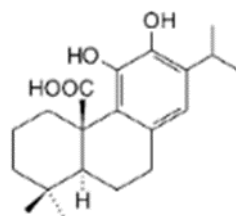
Najvažnije komponente ekstrakta ruzmarina su karnozol i karnozna kiselina, uz prisustvo manje zastupljenih jedinjenja kao što su ruzmarinska kiselina, kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, rozmanol, apigenin i slično [53].

Karnozol je fenolni diterpen molekulske formule $C_{20}H_{26}O_4$. Predstavlja glavnu komponentu ekstrakata ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) i žalfije (*Salvia officinalis*). Ovo jedinjenje posjeduje anti-inflamatorna, antioksidativna i antikancerogena svojstva [54].



Slika 11. Hemijska struktura karnozola nađenog u ruzmarinu i žalfiji [54]

Karnozna kiselina, kiselina čiji je derivat karnozol, takođe je prisutna u ruzmarinu i žalfiji. Suvi listovi žalfije i ruzmarina sadrže od 1,5-2,5% karnozne kiseline. Predstavlja jedno od termički najstabilnijih jedinjenja za uklanjanje slobodnih radikala i dobro se rastvara u mastima [55].



Slika 12. Hemijska struktura karnozne kiseline [56]

Dhouibi i saradnici su istraživali uticaj metode ekstrakcije na hemijski sastav ekstrakta ruzmarina sa područja Tunisa. Ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom pokazao je najveći sadržaj ukupnih fenola, najveći sadržaj karnozne i ruzmarinske kiseline kao i najbolja antioksidativna svojstva [57].

Za određivanje hemijskog sastava vodenog ekstrakta ruzmarina dobijenog maceracijom Christopoulou i saradnici su koristili tečnu hromatografiju-masenu spektroskopiju (LC-MS). Najzastupljenije komponente bile su galokatehin i ruzmarinska kiselina sa 26,4% i 18,0%, respektivno [58].

Blank i saradnici su određivali hemijski sastav vodenog i etanolskog ekstrakta ruzmarina. U oba ekstrakta otkriveno je prisustvo ruzmarinske kiseline, karnozola, kvercetina, luteolina i apigenina. Komponenta koja se nalazila u najvećoj koncentraciji u vodenom ekstraktu ruzmarina je ruzmarinska kiselina (153 mg/g) dok u etanolnom ekstraktu ruzmarina ova komponenta je zastupljena u

koncentraciji od 87 mg/g. Apigenin se u vodenom ekstraktu ruzmarina nalazi u koncentraciji od 43 mg/g dok je njegova koncentracija u etanolnom ekstraktu nešto viša i iznosi 50 mg/g. Koncentracija luteolina je 32 mg/g u vodenom ekstraktu a u etanolnom ekstraktu iznosi 35 mg/g. Karnozol je pronađen u vodenom i etanolnom ekstraktu ruzmarina u koncentracijama od 26 mg/g i 28 mg/g, respektivno [59].

2.5 Divlji origano

Divlji origano (lat. *Origanum vulgare*), poznat i pod nazivima planinski čaj i vranilova trava, predstavlja višegodišnju zeljastu biljku koja pripada porodici usnatice (Lamiaceae). Divlji origano se koristi još od antičkih vremena: Grci su ga upotrebljavali kao miris nakon kupanja, Rimljani su ga koristili kao sredstvo za tjeranje mrava iz kuće a Egipćani kao lijek protiv kašlja. Danas se koristi kao začinska biljka, zbog mnogih zdravstvenih benefita uključujući probleme sa digestivnim traktom i prehlade [43].

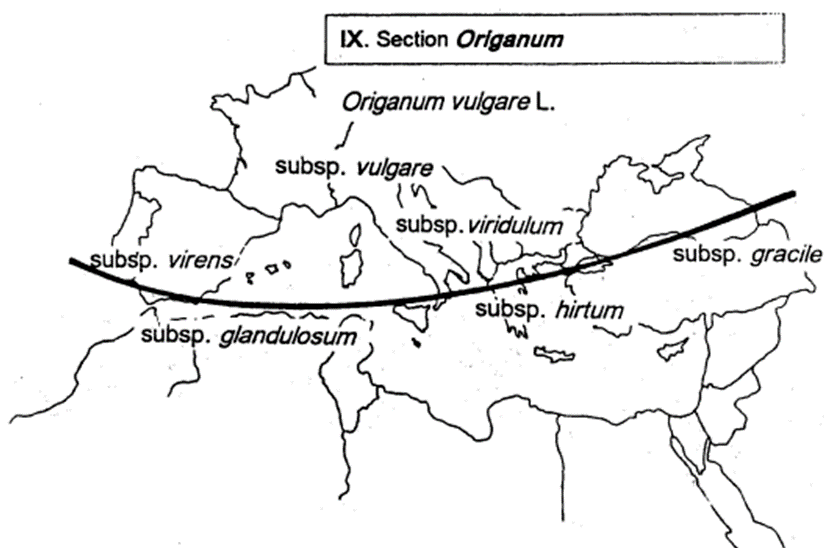
Ova biljka se ponekad naziva i “princem bilja” a naziv *Origanum* prvi je upotrebio grčki ljekar Hipokrat (460-370 p.n.e.) koristeći grčke riječi oros - planina i ganos - sreća [60].

Origanum vulgare je mirisna, zeljasta višegodišnja biljka koja naraste 20 do 30 cm i cvjeta od maja do oktobra. Zbog jakog korijenovog sistema može da opstane i na zemljištu podložnom eroziji. Listovi su ovalni (jajasti, sa širim vrhom u osnovi), dugi 10–44 mm i široki 5–25 mm, rastu jedan naspram drugog na stabljici. Rubovi listova su glatki, a vrhovi listova imaju oblik od oštrog (šiljastog) do tupog (zaobljenog). Cvast se sastoji od mnogo grupisanih cvjetova. Cvjetovi su ljubičastocrvene boje, sitni i dvousnati. Svaki cvijet ima četiri prašnika [61].



Slika 13. *Origanum vulgare* [61]

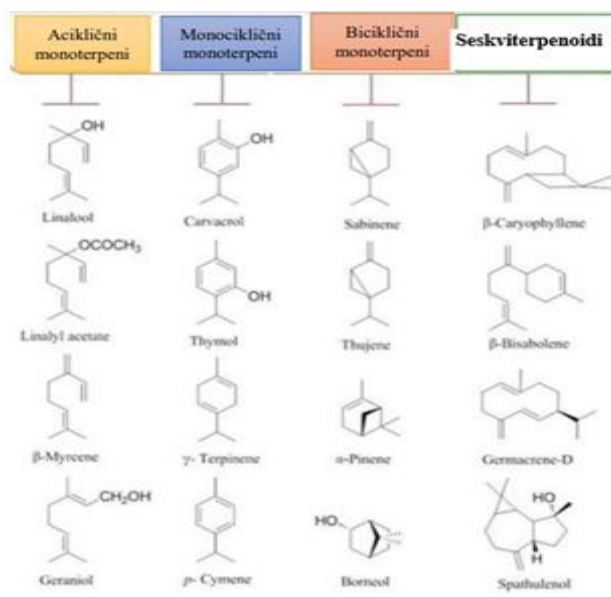
Rod *Origanum* karakteriše velika morfološka i hemijska raznovrsnost. Četrdeset devet taksona i četrdeset dvije vrste podijeljeni su u deset grupa. Većina je lokalno rasprostranjena u oblasti Mediterana. Konkretno, tri taksona su karakteristična za Maroko i jug Španije, dva se javljaju u Alžiru i Tunisu, tri su endemska za Kirenaiku (istočnu regiju Libije), devet se nalazi u Grčkoj, Južnom Balkanu i Maloj Aziji (šest su lokalni grčki endemi), dvadeset jedan se nalazi u Turskoj, Kipru, Siriji i Libanu dok je preostalih osam lokalno rasprostranjeno u Izraelu, Jordanu i Sinajskom poluostrvu. Na slici 14 je prikazana rasprostranjenost taksona ove biljke u svijetu [62].



Slika 14. Geografska rasprostranjenost *Origanum vulgare* u svijetu [62]

2.5.1 Hemijski sastav eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana

Eterično ulje origana je bezbojna ili blijedožuta viskozna tečnost intenzivnog mirisa i pikantnog ukusa. Hemijski sastav eteričnog ulja divljeg origana varira zavisno od geografskog položaja biljke, načina ekstrakcije, razvitka biljke, vremena žetve itd. Eterično ulje divljeg origana je dobar izvor monocikličnih monoterpena (timol, karvakrol, p-cimen), acikličnih monoterpena (geraniol, linalol, β -mircen), bicikličnih monoterpena a mogu se naći i neka jedinjenja seskviterpenoida, zavisno od hemotipa [63].



Slika 15. Hemijski sastav eteričnog ulja divljeg origana [63]

Karakteristično je da različite podvrste mogu imati različite dominantne komponente, kao što su timol, karvakrol, linalol ili druge supstance. Eterična ulja *O. vulgare* su istraživana zbog svojih potencijalnih benefita u mnogim oblastima, uključujući medicinu, aromaterapiju i agroindustriju, zahvaljujući svojim antimikrobnim, antiinflamatornim i drugim svojstvima.

Najviše jedinjenja koje je identifikovano u *O. vulgare* eteričnom ulju je šezdeset četiri. Eterično ulje se uglavnom sastojalo od oksigenovanih monoterpena (53,8%) i monoterpenskih ugljovodonika (26,4%). U okviru oksigenovanih monoterpena karvakrol je bio najzastupljeniji (14,5%), zatim timol (12,6%), β -fenhil alkohol (12,8%) i δ -terpineol (7,5%), dok γ -terpinen (11,6%) i α -terpinen (3,7%) su bili najzastupljeniji ugljovodonični monoterpeni. Karvakrol, timol i γ -terpinen poseduju jaka antioksidativna svojstva a karvakrol i timol takođe pokazuju antibakterijsku aktivnost protiv nekoliko bakterija [64].

Timol, takođe poznat pod hemijskim nazivom 2-izopropil-5-metilfenol je prirodni monoterpenoidni fenol, kristalan i bezbojan, sa karakterističnim mirisom. Izomer je sa karvakrolom i pored eteričnog ulja divljeg origana (*Origanum vulgare*) glavni je aktivni sastojak ulja ekstrahovanog iz vrste *Thymus vulgaris*, opšte poznate kao timijan. Eterična ulja čiji je glavni sastojak timol imaju antiinflamatorna, antioksidativna, antifungalna, antimikrobna svojstva a mogu imati dejstvo i na respiratorni i digestivni sistem kao i protiv karijesa [65].

Primjena timola nije samo na farmakološkom nivou, pošto je od trenutka kada je uvršten na listu supstanci prepoznatih kao sigurne za ljudsku upotrebu – GRAS („Generally Recognized As Safe“) kao prehrambeni aditiv sa zanemarljivom toksičnošću od strane Uprave za hranu i lekove Sjedinjenih Država (FDA). Istraživanja o njegovoj aktivnosti kao prirodnog konzervansa za hranu su značajno porasla, naglašavajući njegovu antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. Zahvaljujući mnogobrojnim studijama, sada je poznato da njegova antioksidativna aktivnost potiče od toga što jedinjenja koja sadrže fenolne grupe apsorbuju ili neutrališu slobodne radikale i povećavaju endogene antioksidanse [66]. Timol spriječava ili usporava rast gljivica i bakterija u hrani. Konačno, među svojim primjenama, timol se takođe ističe u komercijalnim formulacijama za upotrebu kao akaricid, insekticid, repelent insekata i životinja, fungicid i medicinsko dezinfekciono sredstvo i predstavlja alternativu za smanjenje upotrebe sintetičkih fungicida [66].

Karvakrol, 5-izopropil-2-metilfenol je viskozna, bezbojna ili blijedo žuta tečnost oštrog mirisa. Osim u eteričnom ulju divljeg origana, prisutan je u eteričnim uljima timijana (*Thymus vulgaris*), žute paprike (*Lepidium flavum*) i bergamotske narandže (*Citrus aurantium bergamia*) [67].

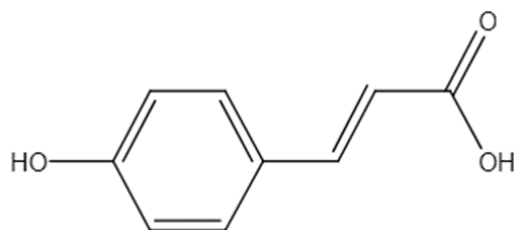
Osim antioksidativnih svojstava koja potiču od toga što sadrži fenolnu grupu koja interaguje sa slobodnim radikalima, (kao i kod njegovog izomera timola), karvakrol posjeduje antiinflamarona, antibakterijska i antifungicidna svojstva [68].

Nezhadali i saradnici su proučavali hemijski sastav eteričnog ulja *Thymus vulgaris* u različitim različitim fazama rasta biljaka. Utvrdili su da postoji inverzna linearna veza između životnog vijeka biljke i ukupne količine ulja sa vrednostima između 0,83% i 1,39% (v/v). Pored toga, glavne komponente eteričnog ulja bili su timol i o-cimen, sa procentima koji su varirali između 38,23% i 63,01%, odnosno 5,56% i 15,47% respektivno, otkrivši da se količina timola smanjuje tokom života biljke, dok je količina o-cimena povećana. Važan zaključak ove studije koji se pokazao na većini primjeraka biljaka je da postoji linearna zavisnost između koncentracije timola i karvakrola. Ako je

koncentracija timola bila visoka, koncentracija karvakrola je bila niska i suprotno – ako je koncentracija timola niska, koncentracija karvakrola biće visoka [69].

Zavisno od tipa rastvarača koji se koristi prilikom ekstrakcije može doći do razlike u hemijskom sastavu ekstrakata. Etanolski ekstrakti sadrže razne fenolne kiseline i diterpene, uključujući karnoznu kiselinu, karnozol, *p*-kumarinsku kiselinu, ruzmarinsku kiselinu i kafeinsku kiselinu. Ova jedinjenja doprinose antioksidativnim svojstvima ekstrakta i potencijalnim antivirusnim efektima. U vodenim ekstraktima *Origanum vulgare* otkrivena je ruzmarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, karnozna kiselina, luteolin, apigenin, kempferol i kvercetin [70].

P-kumarinska kiselina (4-hidroksi-cimetna kiselina) predstavlja derivat cimetne kiseline sa molekulskom formulom $C_9H_8O_3$. Jedinjenje ima veliku primjenu u farmaceutskoj industriji zbog dokazanog antioksidativnog, antimikrobnog, neuroprotektivnog i nefroprotektivnog efekta. U prirodi se može naći u slobodnom ili vezanom obliku [71].



Slika 16. Hemijska struktura *p*-kumarinske kiseline [71]

Blank i saradnici su u cilju određivanja antiviralne sposobnosti etanolnog ekstrakta *O.vulgare* odredili hemijski sastav pomoću HPLC analize. Korišćena analiza je pokazala prisustvo ruzmarinske kiseline, kvercetina, karnozola, kafeinske kiseline, *p*-kumarinske kiseline, karnozne kiseline i apigenina [72].

2.6 Antioksidativna svojstva ruzmarina i divljeg origana

Kada sistemi endogene detoksikacije ćelija nisu više sposobni za hvatanje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), nastaje oksidativni stres. Ovo štetno stanje može dovesti do povrede makromolekula ćelija kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline, što dovodi do nepovratnih oštećenja i smrti ćelije. Veliki broj hronično-degenerativnih poremećaja su povezani sa oksidativnim stresom – uglavnom kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti [73].

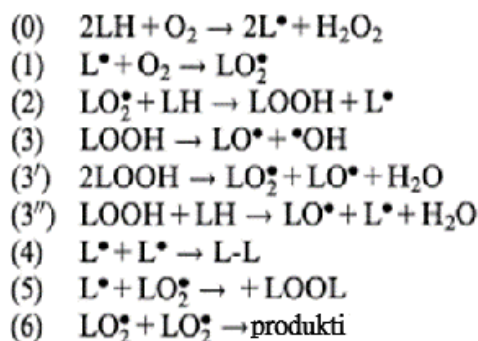
Antioksidativna svojstva ruzmarina i divljeg origana predmet su mnogih istraživanja tokom godina. Ta svojstva su posledica hemijskog sastava ove dvije biljke o kom je bilo riječi u prethodnim poglavljima ovog rada.

Bozin i saradnici su istraživali antioksidativna svojstva eteričnog ulja ruzmarina kroz lipidnu peroksidaciju indukovanu Fentonovom reakcijom sa Fe^{+2} /askrobatom i $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ gdje je eterično ulje ruzmarina značajno inhibiralo lipidnu peroksidaciju [74].

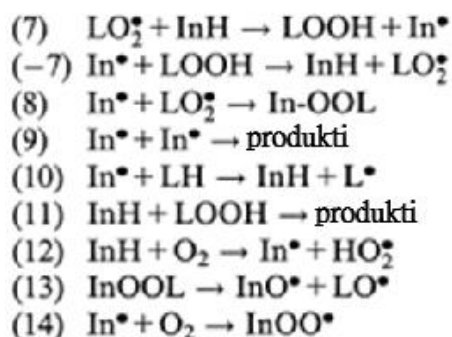
Jedan od najznačajnijih aspekata antioksidativne aktivnosti ruzmarina je veza između njegovih diterpena i aktivnosti uklanjanja radikala. Studija Munné-Bosch i Alegre opisuje antioksidativna svojstva diterpena iz ruzmarina. Najvažniji elementi u strukturi ruzmarina su aromatični prsten (C11–C12) u kateholnoj grupi zajedno sa konjugacijom tri osnovna prstena. Kateholna grupa je odgovorna za uklanjanje radikalnog elektrona nastalog kao rezultat oksidacije. Kostur formiran od tri prstena omogućava delokalizaciju naelektrisanja. Prisustvo karboksilne grupe (u slučaju karnozne kiseline) povećava ovu konjugaciju, posebno u vodenim sistemima. Međutim, u blago polarnim medijima, kao što su masti, čini se da je laktonska struktura ta koja daje veću stabilnost [75].

Neki naučnici smatraju da karnozna kiselina i karnozol čine preko 90% antioksidativnih svojstava ekstrakta ruzmarina iako to još uvek nije sistematski potvrđeno [76]. Visok doprinos karnozne kiseline antioksidativnim svojstvima ekstrakta ruzmarina se može pripisati visokom procentu karnozne kiseline u ruzmarinu u poređenju sa drugim fenolnim diterpenima ruzmarina. Predloženo je da aktivnost uklanjanja radikala karnozne kiseline prati mehanizam analogan onom drugih antioksidanata, uključujući α -tokoferol, i da je uzrokovan prisustvom dvije hidroksilne grupe koje se nalaze na C₁₁ i C₁₂ (kateholna grupa). Nakon oksidacije, karnozna kiselina i α -tokoferol pokazuju različite antioksidativne kapacitete koji zavise od lipidnog sastava matriksa i još više od oksidativnih uslova [77,78].

Yanishlieva i saradnici su izučavali mehanizam antioksidativnog dejstva timola i karvakrola (najzastupljenijih sastojaka divljeg origana) dodavajući različite koncentracije ova dva jedinjenja tokom autooksidacije svinjske masti i suncokretovog ulja. Inhibicija lipidnih supstrata je postignuta pomoću dodavanja rastvora antioksidansa u prečišćenom acetonu u izmjereni uzorak lipida, a zatim uklanjanjem rastvarača. Uvođenje antioksidansa (inhibitor, InH) u oksidacioni lipidni sistem dovodi do promjene mehanizma procesa. Efekat inhibitora InH zavisi od učešća njegovih molekula i radikala formiranih u seriji reakcija. Na shemama 2 i 3, LH je oksidirajući lipidni supstrat, LO_2^* je peroksidni radikal, a InH je inhibitor [79].



Shema 2. Neinhibirana oksidacija [79]



Shema 3. Inhibirana oksidacija [79]

Opisane su posebnosti djelovanja inhibitora po dvije kinetičke karakteristike:

1. Efikasnost, koja predstavlja mogućnost blokiranja procesa radikalnog lanca interakcijom sa peroksidnim radikalima (prikazano reakcijom (7) koja određuje dužinu trajanja indukcionog perioda)
2. Snaga, izražava mogućnost da inhibitorne grupe učestvuju u drugim reakcijama npr. reakcijama (-7), (10), (11), (12), (14) koje dovode do promjene brzine oksidacije tokom indukcionog perioda [79]

2.7 Eterična ulja u prehrambenoj industriji

Hrana je esencijalna za život te je logično zaključiti da je bezbjednost hrane jedno od glavnih pitanja kako za potrošače, tako i za industriju hrane. Svjetska zdravstvena organizacija je iznijela podatak da se jedna od deset osoba godišnje razboli zbog unošenja pokvarene hrane [80].

Produžen rok trajanja za širok spektar proizvoda postiže se dodavanjem antioksidanata da bi se spriječila užeglost izazvana oksidacijom nezasićenih masti i za očuvanje nutritivne vrijednosti hrane [81].

Antioksidansi se ne koriste samo kao konzervansi za hranu, već i kao jedinjenja koji imaju značajan uticaj na biohemiju organizma čovjeka, suzbijajući oksidacione procese i spriječavajući hronične bolesti povezane sa oksidativnim stresom [81].

Za konzervaciju hrane dugo su se koristili sintetički konzervanski poput butilhidroksianizola (BHA), butilhidroksitoluena (BHT), tetrabutilhidrokinona (TBHQ) ali istraživanja ukazuju da ove supstance mogu biti kancerogene i njihova upotreba je smanjena [82]. Posljednjih godina među potrošačima raste potražnja za potpuno prirodnim prehrambenim proizvodima te proizvođači posebnu pažnju posvećuju eteričnim uljima u cilju prezervacije hrane zbog njihovih izraženih antioksidativnih sposobnosti [83].

Dodatak eteričnih ulja kao prirodnih antioksidanata ima različite benefite i to: imaju antimikrobna, antiseptička i senzorna svojstva, smatraju se sigurnima, prihvaćeni su od strane potrošača, dolaze iz prirodnih izvora, sigurni su za životnu sredinu [84, 85].

2.7.1 Antimikrobno dejstvo eteričnih ulja u prehrambenoj industriji

Intenzivna primjena antibiotika u stočarskoj proizvodnji dovela je do rezistencije između komenzalne flore, oportunističkih patogena i patogena koji se prenose hranom [85]. Stalna potražnja potrošača za hranom zaštićenom prirodnim aditivima dovela je do toga da upotreba eteričnih ulja kao antibakterijskih aditiva uspješno stiče veću popularnost u prehrambenoj industriji budući da efikasno učestvuju u upravljanju patogenima koji se prenose hranom, kao što su plijesni, bakterije i povezani toksini, bez podsticanja sticanja rezistentnosti [86].

Mehanizam dejstva eteričnih ulja zavisi od više faktora ali najviše od njihovog hemijskog sastava. Antimikrobna aktivnost povezana je sa lipofilnim ili lipofobnim osobinama komponenti eteričnog ulja, sastavom ćelijskog zida bakterija i vrstom mikroorganizma [87]. Kod bakterija dolazi do razlika u mehanizmu djelovanja zavisno od toga da li je bakterija Gram (+) ili Gram (-) budući da se one razlikuju po strukturi ćelijske membrane [88].

Prema Al-Maqtari i saradnicima eterična ulja su manje efikasna protiv Gram (-) bakterija u poređenju sa Gram (+) bakterijama zbog prisustva hidrofilne spoljne membrane koja djeluje kao barijera za hidrofobna jedinjenja. Štaviše, spoljna granica ove ćelije je naelektrisana, pa ima hidrofilnu prirodu [89].

S druge strane, eterična ulja mogu lako prodrijeti u ćelije a zatim raditi na ćelijskom zidu i stupiti u interakciju sa ćelijskom membranom, što se lako može prenijeti na citoplazmu. Nakon ulaska u ćeliju, ova jedinjenja mijenjaju permeabilnost ćelije i ometaju enzime koji doprinose proizvodnji energije što postepeno dovodi do smrti ćelije [90].

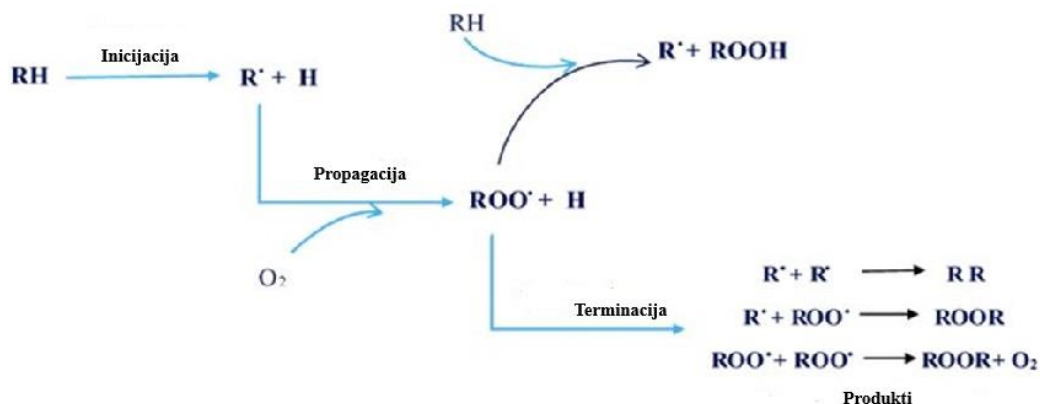
Zbog svih navedenih faktora, tačan mehanizam dejstva još nije pretpostavljen već se dejstvo pripisuje pojedinačnim komponentama koje eterično ulje sadrži [85].

Stepen antimikrobne aktivnosti koje pokazuju eterična ulja može uticati na njihovu sposobnost prodiranja kroz bakterijske membrane i ispoljavanje aktivnosti koja inhibira funkcionalna svojstva ćelije. Kao rezultat toga, poremećaj ćelijske membrane eteričnih ulja može uticati na mnoge biohemijske procese, lučenje regulatora rasta, sintezu strukturnih molekula i manipulaciju hranljivim materijama [90].

2.7.2 Antioksidativno dejstvo eteričnih ulja u prehrambenoj industriji

Oksidacija hrane je prirodna biohemijska pojava. To je proces na koji utiču parametri kao što su svjetlost i temperatura koji ga mogu inhibirati ili ubrzati. U biologiji, antioksidant se definiše kao svaka supstanca koja, u maloj dozi u poređenju sa oksidovanim supstratom, inhibira ili značajno odlaže oksidaciju [91].

Eterična ulja imaju različite mehanizme (direktne ili indirektne) za usporavanje reakcija oksidacije, uključujući prevenciju iniciranja lančanih reakcija i aktivnosti uklanjanja slobodnih radikala. Međutim, hemijski sastav eteričnih ulja određuje njihova svojstva, a samim tim i njihov način rada. Aktivnost eteričnih ulja kao antioksidanata odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija, kako je prikazano na slici 17 [90].



Slika 17. Mehanizam dejstva eteričnih ulja kao antioksidanata [90]

2.8 Budući pravci razvoja

Postoji potreba da se pronađu alternativne strategije za suočavanje sa infekcijama zbog porasta broja bakterija otpornih na antibiotike i nedostatka novih antibiotika na tržištu. Alternative su kombinacija antibiotika sa drugim lijekovima koji nisu antibiotici ili kombinacija antibiotika sa antimikrobnim sredstvima odabranim iz prirodnog rezervoara bioaktivnih jedinjenja [92].

Interakcija između antimikrobnih sredstava može dovesti do tri različita mehanizma: sinergistički, aditivni i antagonistički. Sinergija se dobija kombinovanjem dva antimikrobna jedinjenja koja proizvode antibakterijsku aktivnost veću od zbira antibakterijske aktivnosti pojedinačne komponente. Aditivni efekat se proizvodi kombinovanjem antimikrobnih sredstava i dovodi do antimikrobnog efekta koji je jednak zbiru antimikrobnih efekata pojedinačnih jedinjenja. Antagonistički efekat dovodi do smanjene antimikrobne aktivnosti dva jedinjenja u kombinaciji u poređenju sa njihovom individualnom antimikrobnom aktivnošću [92].

Sinergijski efekti se mogu proizvesti ako sastojci ekstrakta utiču na različite ciljeve ili međusobno djeluju kako bi se poboljšala rastvorljivost i time poboljšala biodostupnost jedne ili više supstanci ekstrakta. Takođe, kada se antibiotici kombinuju sa agensom koji antagonizira mehanizme otpornosti bakterija može doći do sinergije [93].

1. Sinergija između komponenti eteričnih ulja

Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja može zavisiti od jednog ili dva glavna sastojka ali, prema sve većem broju studija, zastupljenost glavnih aktivnih sastojaka možda nije jedini faktor odgovoran aktivnost eteričnih ulja već su i interakcije između manje zastupljenih sastojaka u uljima takođe važne. Na primjer, kombinacija eugenola sa linalolom ili mentolom pokazuje sinergijski efekat [94]. García-García i saradnici otkrili su da kombinacija karvakrola i timola, kao i njihova kombinacija sa eugenolom, pokazuje najbolju aktivnost protiv *L. innocua* [95].

2. Sinergija između različitih eteričnih ulja

Hossain i saradnici proučavali su sinergistički efekat različitih eteričnih ulja protiv gljivica, otkrivši da kombinacija origana i timijana poboljšava aktivnost protiv *A. flavus*, *A. parasiticus* i *P. chrysogenum* [96]. Kombinacija različitih ulja može rezultirati sinergizmom, što otežava patogenima da razviju otpornost na više komponenti [97].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Priprema biljnog materijala

Sirovina za flavorizaciju koja je korišćena je ekstradjevičansko maslinovo ulje Barsko zlato®, proizvod “Barske uljare” DOO. Ruzmarin koji je korišćen za ekstrakciju eteričnog ulja i ekstrakata uzorkovan je na području Dajbaba, opština Podgorica a divlji origano je uzorkovan u selu Vodno, opština Pljevlja. Da bi se biljni materijal sačuvao od spoljašnjeg uticaja do vremena predviđenog za analizu, čuvan je u papirnim kesama na tamnom mjestu. Osušeni materijal je usitnjen da bi se dobila homogena, praškasta smjesa koja će se podvrgnuti ekstrakciji. Za prosijavanje usitnjenog materijala korišćen je set sita ERWEKA (2mm, 1mm, 0,2mm i 0,1mm) i određen je stepen usitnjenosti. Stepenn usitnjenosti određuje se pomoću veličine srednjeg prečnika čestica (d) prema sledećem izrazu:

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i}$$

gdje je: m_i – maseni procenat i -te frakcije; d_i – prečnik otvora sita.

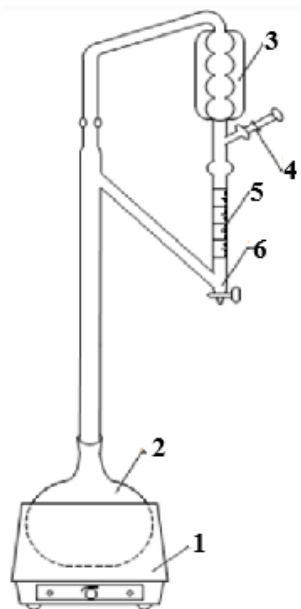
3.2 Metode ekstrakcije

Ekstrakcija eteričnih ulja može se vršiti različitim metodama ekstrakcije u zavisnosti od dijela biljke iz kog se vrši ekstrakcija, strukture i sastava ulja. Poznato je da neodgovarajući postupak ekstrakcije može dovesti do promjene hemijskog sastava eteričnog ulja što može rezultirati gubitkom bioaktivnosti i nekih prirodnih karakteristika. Zbog toga se metoda ekstrakcije smatra jednim od glavnih faktora koji određuju kvalitet eteričnih ulja. Metoda ekstrakcije utiče na boju, miris, ukus, viskozitet [98].

Metode ekstrakcije korišćene u ovom radu su hidrodestilacija, Soxhlet ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija.

Hidrodestilacija predstavlja konvencionalnu metodu ekstrakcija koja koristi vodu ili vodenu paru za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, uglavnom eteričnih ulja. Ova tehnika se može izvoditi pomoću instalacije poznate pod nazivom Clevenger aparat. U Clevenger aparatu, prethodno usitenjeni uzorak potopljen u vodu se zagrijava pomoću grijača. Smješa eteričnog ulja i vodene pare isparava i kondenzuje se u kondenzatoru. Iz kondenzatora se mješavina vode i eteričnog ulja spušta u graduisanu

cijev a usled razlike u gustini između eteričnog ulja i vode, pomoću graduísane skale mjeri se zapremina izdvojenog eteričnog ulja. Eterično ulje se otpušta iz graduísanog nastavka pomoću slavine. Sa ekonomskog stanovišta, ova tehnika ne zahteva upotrebu organskih rastvarača, što je čini poželjnom opcijom kada su troškovi ekstrakcije važni [99].



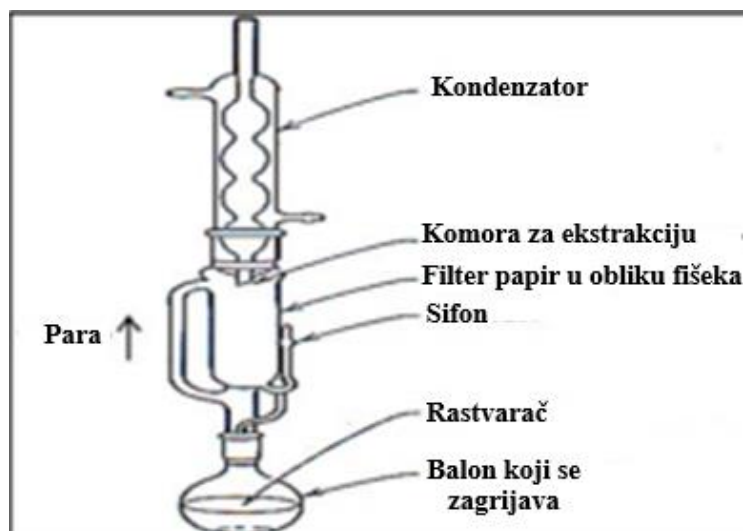
Slika 18. Hidrodestilacija pomoću Clevenger aparature: 1) električni grijač, 2) balon za destilaciju, 3) kondenzator, 4) otpuštanje pritiska, 5) graduísana cijev za mjerenje zapremine eteričnog ulja, 6) slavin sa nastavkom [100]

Za dobijanje eteričnog ulja ruzmarina korišćena je metoda hidrodestilacije na sledeći način: Odvagano je 100 g ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) koji je zatim usitnjen pomoću blendera i prosijan kroz sistem sita čije su veličine otvora 2; 1; 0,2 i 0,1 mm. Izračunat je srednji prečnik čestica. Nakon toga pristupljeno je hidrodestilaciji. Kao rastvarač korišćena je destilovana voda (600 ml) koja se zajedno sa usitnjenim materijalom nalazi u balonu. Balon se postavi u grijač i spoji sa Clavenger-om, komponentom destilacionog aparata čija je uloga odvajanje i prikupljanje destilata.

Eterično ulje divljeg origana je takođe ekstrahovano metodom hidrodestilacije. Odvagano je 113 g divljeg origana (*Origanum vulgare*) koji je zatim usitnjen pomoću blendera i prosijan kroz sistem sita nakon čega je izračunat srednji prečnik čestica. Kao rastvarač prilikom hidrodestilacije korišćeno je 600 ml destilovane vode koja se zajedno sa usitnjenim materijalom nalazi u balonu koji se zagrijava pomoću grijača.

Soxhlet ekstrakcija je jedna od tradicionalnih tehnika koje se intenzivno koriste za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz brojnih prirodnih izvora već nekoliko decenija. Jedna od glavnih prednosti Soxhlet ekstrakcije je ekstrakcija jedinjenja sa niskom rastvorljivošću. Da bi se postigao zadovoljavajući prinos pomoću ove tehnike, kao i da bi se spriječio gubitak isparljivih jedinjenja, najvažnije je napraviti pravi izbor rastvarača. Period ekstrakcije je obično dug, što dovodi do degradacije nekih termolabilnih jedinjenja i to predstavlja manu ove metode [101].

Soxhlet ekstrakcija koristi princip refluksa rastvarača i sifona za kontinuiranu ekstrakciju čvrste materije čistim rastvaračem, čime se postiže visoka efikasnost. Usitnjeni uzorak se stavlja u filter papir u obliku fišeka koji se postavlja u Soxhlet ekstraktor. Rastvarač se dodaje u balon i postavlja na grijač. Nakon zagrijavanja, kondenzovana para rastvarača dolazi u kontakt sa uzorkom. Kada zapremina rastvarača premaši maksimalnu visinu sifona, rastvarač koji sadrži ekstrakt se vraća sifonom. Proces se ponavlja, ekstrahujući dio materijala svaki put, tako da se za ekstrakciju čvrstog materijala stalno koristi čist rastvarač [102].

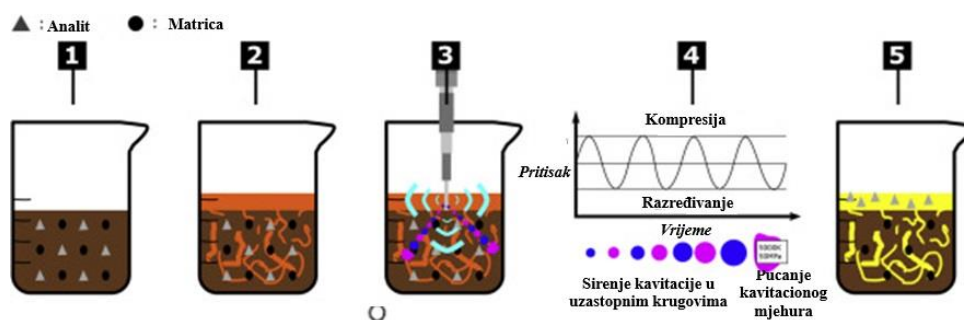


Slika 19. Aparatura po Soxhletu [102]

Prema Pereiri i saradnicima, najveća koncentracija polifenolnih jedinjenja divljeg origana dobija se ekstrakcijom pomoću Soxhlet aparature [103]. Zengin i saradnici su koristeći aparaturu po Soxhletu dobili ekstrakt origana sa sadržajem ukupnih fenola $120,64 \pm 0,08$ mg GAE/100g, dok je prilikom korišćenja ultrazvučne ekstrakcije njihov sadržaj iznosio $77,92 \pm 0,66$ mg GAE/100g. Ukupni fenoli prisutni u biljkama značajno doprinose njihovim antioksidativnim svojstvima. Zbog njihove sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, bitno je da se ova jedinjenja nalaze u većim koncentracijama kako bi se osigurala maksimalna antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata [104].

Aparatura po Soxhletu korišćena je prilikom dobijanja ekstrakta divljeg origana (*Origanum vulgare*). Na početku je napravljena čaura od filter papira u koju je stavljeno 11,7 g divljeg origana. Balon je napunjen sa 500 ml etanola i zagrijavan pomoću grijača. Pare rastvarača se kreću naviše i nakon nekog vremena kondenzovani rastvarač natopi uzorak (ekstrakcija kontaktom), dolazi do dostizanja nivoa sifona i ekstrakt prelazi u balon. Izvršeno je 10 sifoniranja. Nakon završene ekstrakcije, dobijeni ekstrakt je prebačen na uparavanje u rotacioni vakuum uparivač. Temperatura vode kao grejnog tijela je podešena na 40 °C a broj obrtaja u minuti balona sa ekstraktom iznosio je 60.

Ultrazvučna ekstrakcija predstavlja jednu od savremenijih metoda ekstrakcije i uključuje upotrebu ultrazvuka sa frekvencijama u rasponu od 20 kHz do 2000 kHz [102]. Ove frekvencije dovode do pojave kavitacionih mjehura. Pucanjem kavitacionih mjehura dolazi do povećanja propustljivosti ćelijske membrane što omogućava lakše prodiranje rastvarača u biološki materijal i lakšu ekstrakciju željenih komponenti [105]. Prednosti ultrazvučne ekstrakcije uključuju povećanje prinosa ekstrakcije, bržu kinetiku i smanjenje radne temperature što omogućava ekstrakciju termolabilnih jedinjenja. Koriste se male količine uzoraka što potrošnju rastvarača dovodi na minimum. Metoda ultrazvučne ekstrakcije je efikasna u prečišćavanju aktivnih sastojaka. U poređenju sa drugim savremenim metodama ekstrakcije, ultrazvučni aparat je jeftiniji i lakši za rad. Jedan od nedostataka ove procedure je mogućnost štetnog dejstva ultrazvuka na aktivne sastojke ljekovitog bilja kroz formiranje slobodnih radikala i posledično neželjenih promjena u molekulima uzoraka [105].



Slika 20. Ultrazvučna ekstrakcija [106]

Prema Lešniku i saradnicima, metoda ultrazvučne ekstrakcije ruzmarina pokazuje veću efikasnost u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja u odnosu na Soxhlet metodu ekstrakcije, zbog čega je ruzmarin ekstrahovan upravo ovom metodom. Ovi autori navode da prilikom ekstrakcije koristeći Soxhlet aparaturu dolazi do razgradnje termolabilnih materija usled dugog izlaganja visokim temperaturama [45]. Za dobijanje ekstrakta ruzmarina metodom ultrazvučne ekstrakcije odvagano je 30 g ruzmarina

koji je zatim usitnjen pomoću blendera i određen je srednji prečnik čestica. Nakon toga ružmarin je stavljen u čašu koja je napunjena sa 150 ml etanola koji se koristio kao rastvarač. Ekstrakcija je vršena u ultrazvučnom kupatilu, 30 minuta na temperaturi od 30 °C. Nakon završene ultrazvučne ekstrakcije uzorak je profiltriran a zatim prebačen u rotacioni vakuum uparivač i pristupljeno je uparavanju. Voda u koju je bio uronjen balon imala je ulogu grejnog tijela na temperaturi od 45 °C a broj obrtaja u minuti koje je balon sa ekstraktom imao je iznosio 60.



*Slika 21. a) Ružmarin u etanolu prije ekstrakcije b) Ekstrakt ružmarina prije uparivanja
c) Uparavanje ekstrakta origana pomoću rotacionog uparivača KNF RC600
d) Sakupljanje ekstrakta ružmarina nakon uparavanja (Autor: Ivana Đukić)*

3.3 Hemikalije, instrumenti i aparatura

Za ispitivanje antioksidativnih svojstava flavorizovanog maslinovog ulja korišćene su sledeće hemikalije: etanol, destilovana voda, Folin-Ciocalteu reagens (FCR), natrijum-karbonat (Na_2CO_3 ; 20%), hloroform, glacijalna sirćetna kiselina, kalijum-jodid (KI), skrob (1% rastvor), natrijum-tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,01 M), kalijum-hidroksid (KOH; 0,5 M), hlorovodonična kiselina (HCl; 0,5 M).

Od instrumenata korišćen je BUCK Scientific 105 UV-VIS spektrofotometar (slika 22), ultrazvučno kupatilo SONIC ViMS 4GT (slika 23), aparatura za Soxhlet ekstrakciju, Clevenger aparatura za hidrodestilaciju, KNF RC 600 rotacioni uparivač, CDR OxiTester (slika 24).



Slika 22. BUCK Scientific 105 UV-VIS spektrofotometar (Autor: Ivana Đukić)



Slika 23. Ultrazvučno kupatilo SONIC ViMS 4GT (Autor: Ivana Đukić)

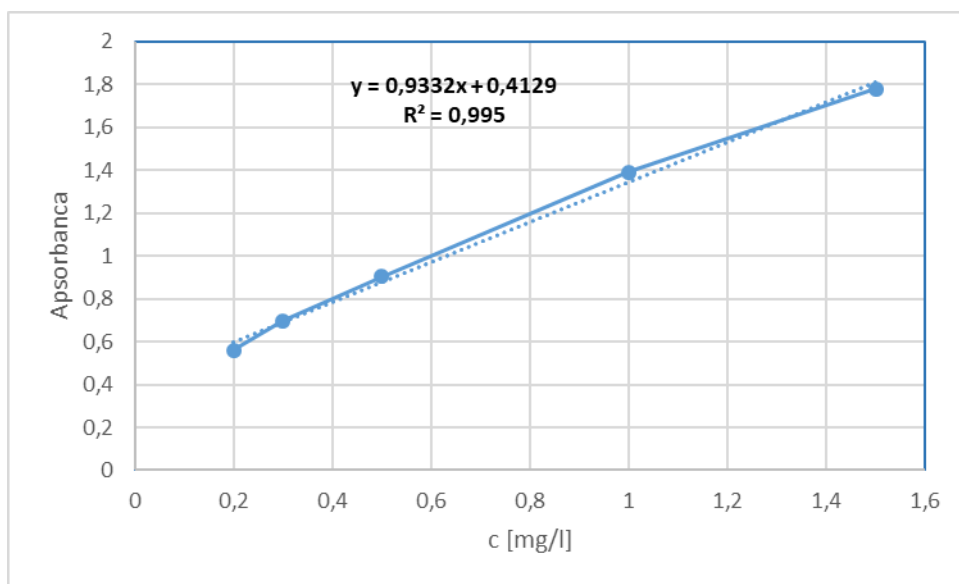


Slika 24. CDR OxiTester (Autor: Ivana Đukić)

3.4 Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Određivanje sadržaja ukupnih fenola u maslinovom ulju rađeno je spektrofotometrijski pomoću metode koja se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom prema protokolu Čorbo i Đorđević. Folin-Ciocalteu metoda je antioksidativni test koji se zasniva na transferu elektrona i mjeri redukcijske sposobnosti antioksidanta. Fenolna jedinjenja sa Folin-Ciocalteu reagensom grade plavo obojen kompleks a koncentracija fenolnih jedinjenja je proporcionalna intenzitetu boje [107]. Metoda je jednostavna i široko rasprostranjena za određivanje ukupnih fenola u biološkim uzorcima i hrani biljnog porijekla [108]. Količina od 1 ml uzorka maslinovog ulja pomiješana je sa 15 ml destilovane vode, 5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 15 ml 20% rastvora Na_2CO_3 . Uzorci su čuvani na tamnom mjestu u intervalu od 2 h nakon čega je mjerena apsorbanca na 765 nm koristeći BUCK Scientific 105 UV-VIS spektrofotometar.

Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali umjesto uzorka maslinovog ulja dodat je korišćeni rastvarač [109]. Rezultati su izraženi pomoću standardne krive. Kao standard za izradu kalibracione krive korišćena je galna kiselina a rezultati ukupnog sadržaja fenola su prikazani kao ekvivalent galne kiseline u miligramima po 100 grama uzorka (mg GAE/100g) prema dobijenom izrazu $y = 0,9332x + 0,4129$ i koeficijent korelacije $R^2 = 0,995$.



Grafik 1. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja ukupnih fenola

3.5 Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina

Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina vršeno je pomoću instrumenta CDR OxiTester-a. Sadržaj slobodnih masnih kiselina (SMK) izražava se kao procenat oleinske kiseline u uzorku i predstavlja jedan od najvažnijih parametara maslinovog ulja. Određuje stepen hidrolitičke razgradnje triglicerida u digliceride i monogliceride uz oslobađanje slobodnih masnih kiselina čime se procjenjuje kvalitet ulja [37]. Uzorak pripremljenog maslinovog ulja se pipetira i otpusti u reagens bočicu koja se postavi u instrument. Instrument obezbjeđuje rezultate u skladu sa referentnim metodama i nakon 3 minuta na ekranu se prikazuje sadržaj slobodnih masnih kiselina u uzorku u procentima kao što je prikazano na slici 25.



Slika 25. CDR OxiTester sa reagens bočicama (Autor: Ivana Đukić)

3.6 Određivanje saponifikacionog broja

Vrijednost saponifikacionog broja je indikacija molekulske težine triglicerida u ulju. Veća vrijednost saponifikacionog broja ukazuje na veći udio nižih masnih kiselina [110]. Saponifikacioni broj (Sbr) se određuje prema standardizovanoj metodi EN ISO 6885:2002 sa modifikacijama. U erlenmajer se dodaje 2 ml uzorka maslinovog ulja i 25 ml 0,5 M alkoholnog rastvora KOH. Na erlenmajer se postavlja povratni kondenzator i smješa se lagano zagrijava, da blago ključa 20-25 minuta, dok rastvor ne izbistri. Vruć rastvor se titriše sa 0,5 M rastvorom HCl uz fenolftalein kao indikator. Slijepa proba se priprema i titriše na isti način, uz odsustvo uzorka.

Saponifikacioni broj se računa prema jednačini:

$$S_{br} = \frac{(c_{HCl} \times (V - V_1) \times 56)}{m_{ulja}}$$

gdje je:

S_{br} – saponifikacioni broj;

c_{HCl} – koncentracija hlorovodonične kiseline;

V – broj utrošenih ml rastvora HCl za slijepu probu;

V_1 – broj utrošenih ml rastvora HCl za uzorak.

3.7 Određivanje peroksidnog broja

Peroksidni broj (Pbr) predstavlja jedan od najčešće mjerenih parametara kvaliteta maslinovog ulja tokom proizvodnje i skladištenja. Pbr je ukupna peroksidna vrijednost maslinovog ulja izražena kao meq O_2 /kg ulja i određuje količinu hidroperoksida prisutnih u ulju kao proizvod primarne oksidacije. Određuje se standardnom jodometrijskom metodom (SRPS EN ISO 3960: 2011) uz manje modifikacije. Metoda se zasniva na reakciji između hidroksida i peroksida sa jodovodoničnom kiselinom koja se u kiseloj sredini oslobađa iz kalijum-jodida. Kao proizvod reakcije oslobađa se elementarni jod čija je količina proporcionalna količini hidroksida koji je prisutan u uzorku ulja [111,112]. U tikvicu se dodaje 2 ml ulja i otapa dodatkom 50 ml smješe glacijalne sirćetne kiseline i hloroforma (3:2). Doda se 0,5 ml zasićenog rastvora KI (svježe napravljenog), tikvica se zatvara i promućka 1 minut. Nakon toga doda se 30 ml destilovane vode i uzorak se ostavlja na tamnom mjestu 5 minuta. Poslije 5 minuta, doda se 75 ml destilovane vode, titriše sa 0,01 M $Na_2S_2O_3$ uz konstantno miješanje dok žuta boja ne izbledi. Tada se doda 0,5 ml 1% rastvora skroba i titriše dok se ne izgubi plava boja. Slijepa proba se radi na isti način uz odsustvo uzorka ulja.

Peroksidni broj računa se prema sledećoj jednačini:

$$P_{br} = \frac{(V - V_0) \times 5}{m_{ulja}}$$

gdje je:

P_{br} – peroksidni broj;

V – broj utrošenih ml $Na_2S_2O_3$ za uzorak;

V_0 – broj utrošenih ml $Na_2S_2O_3$ za slijepu probu.

3.8 Organoleptička analiza

Organoleptička analiza sprovodi se po standardizovanoj i ustaljenoj proceduri i služi za svrstavanje maslinovog ulja u određene kategorije. Maslinovo ulje se sipa u čašu za degustaciju koja se mora pokriti poklopcem. Čaša se zagrijava dlanovima da bi ulje dostiglo temperaturu predviđenu za degustaciju (28 °C) i tada se poklopac odstranjuje. Ulje se pomiriše i obrati se pažnja na senzacije. Zatim se maslinovo ulje poklopi, nakon čega se još jednom pristupa mirisanju ulja ali ovog puta se senzacije zapisuju. U ovom koraku se obično zapaze pozitivne ili negativne note ulja, kao i njegova voćnost. Voćnost se karakteriše kao zelena ako podsjeća na zeleno voće a kao zrela ukoliko podsjeća na zrelo voće. U sledećem koraku uzima se gutljaj ulja, ono se mulja kroz usta i nakon nekoliko sekundi se proguta. Nakon ovog koraka, ocjenjuje se gorčina i pikantnost ulja. Maslinovo ulje se ne smije progutati odmah nakon uzimanja gutljaja inače se neće stvoriti prava slika o pikantnosti [36].

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Nomenklatura uzoraka

U tabeli 1 prikazane su oznake za uzorke ispitivanog maslinovog ulja.

Tabela 1. Oznake uzoraka ispitivanog maslinovog ulja

Oznaka uzorka	Opis pripreme uzorka
M ₁	Neflavorizovani uzorak maslinovog ulja izložen fotooksidativnom stresu
EtO ₁	Uzorak flavorizovan eteričnim uljem divljeg origana izložen fotooksidativnom stresu
EO ₁	Uzorak flavorizovan ekstraktom divljeg origana izložen fotooksidativnom stresu
EtR ₁	Uzorak flavorizovan eteričnim uljem ruzmarina izložen fotooksidativnom stresu
ER ₁	Uzorak flavorizovan ekstraktom ruzmarina izložen fotooksidativnom stresu
M ₂	Neflavorizovani uzorak maslinovog ulja čuvan na tamnom mjestu
EtO ₂	Uzorak flavorizovan eteričnim uljem divljeg origana čuvan na tamnom mjestu
EO ₂	Uzorak flavorizovan ekstraktom divljeg origana čuvan na tamnom mjestu
EtR ₂	Uzorak flavorizovan eteričnim uljem ruzmarina čuvan na tamnom mjestu
ER ₂	Uzorak flavorizovan ekstraktom ruzmarina čuvan na tamnom mjestu

Cilj ovog master rada je ispitivanje uticaja dodatka eteričnih ulja i ekstrakata aromatičnih biljnih vrsta divljeg origana i ruzmarina na smanjenje fotooksidativnog stresa i na poboljšanje kvaliteta ekstradjevičanskog maslinovog ulja. Prema literaturnim podacima, najbolja antioksidativna i organoleptička svojstva pokazali su uzorci flavorizovani sa 0,05% eteričnog ulja ili ekstrakta te je u uzorke je dodato 0,125 µl eteričnog ulja, odnosno ekstrakta ruzmarina i divljeg origana na zapreminu od 250 ml maslinovog ulja. Analize parametara svih uzoraka izvršene su u intervalima od 15 dana. Vršene su analize sadržaja ukupnih fenola kao i ispitivanje kvaliteta maslinovog ulja preko vrijednosti peroksidnog i saponifikacionog broja i sadržaja slobodnih masnih kiselina. Vršene su i organoleptičke analize dobijenih uzoraka.

Prva analiza izvršena je 27.12.2023., druga analiza 12.01.2024. dok je treća analiza vršena 27.01.2024. godine. Prije prve analize (27.12.2023. godine) maslinovo ulje je uzorkovano 12.12.2023. i izvršene su analize svih potrebnih parametara prije flaširanja u tamne boce zapremine 250 ml. Uzorci M₁, EtO₁, EO₁, EtR₁ i ER₁ su bili izloženi fotooksidativnom stresu dok su uzorci M₂, EtO₂, EO₂, EtR₂ i ER₂ bili čuvani na tamnom mjestu i korišćeni su kao kontrolna grupa. Uzorak M₁ nije flavorizovan pa se može koristiti kao kontrolni uzorak za flavorizovane uzorke izložene fotooksidativnom stresu.

Stepen usitnjenosti (srednji prečnik) biljnog materijala, koji je korišćen za pripremu eteričnih ulja i ekstrakata, prikazan je u tabeli 2.

Tabela 2. Step en usitnjenosti (srednji prečnik) biljnog materijala

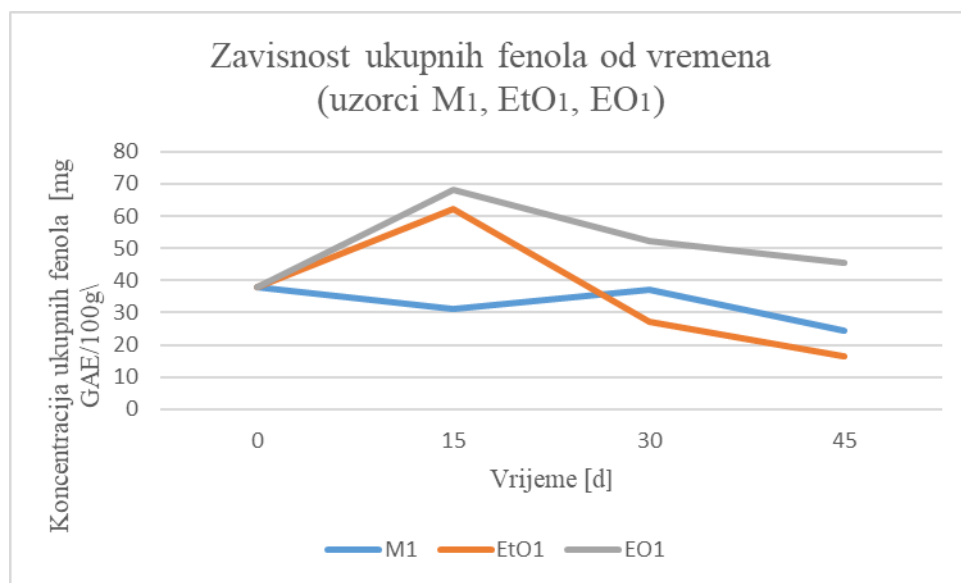
Biljni materijal / Metoda ekstrakcije	Step en usitnjenosti (mm)
Ruzmarin / Hidrodestilacija	0,75
Ruzmarin / Ultrazvučna ekstrakcija	1,51
Divlji origano / Hidrodestilacija	0,78
Divlji origano / Soxhlet ekstrakcija	1,30

4.2 Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Ukupni fenoli određivani su Folin-Ciocalteu metodom. U početnom uzorku vrijednost ukupnih fenola iznosila je 37,76 mg GAE/100g. Ait Taleb i saradnici primjetili su da fenolna jedinjenja ruzmarina dodata u ekstradjevičansko maslinovo ulje štite od autooksidacije tokom skladištenja [113]. Eterična ulja ruzmarina i origana su efikasna u očuvanju proizvoda zbog visokog sadržaja fenola. Međutim, eterično ulje ruzmarina ima nešto veću koncentraciju fenolnih jedinjenja, što mu može pružiti određenu prednost u prehrambenoj industriji prema Barrecca i saradnicima [114].

4.2.1 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na sadržaj ukupnih fenola maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa

Zavisnost koncentracije ukupnih fenola od vremena u uzorcima M₁, EO₁ i EtO₁ prikazana je na grafiku 2.



Grafik 2. Zavisnost koncentracije ukupnih fenola od vremena u uzorcima M₁, EO₁ i EtO₁

Vrijednosti ukupnih fenola koje je uzorak M₁ imao su 31,08 mg GAE/100g, 37,08 mg GAE/100g i 24,4 mg GAE/100g respektivno. Koncentracija ukupnih fenola u uzorku EtO₁ iznosila je 62,16 mg GAE/100g, 27,16 mg GAE/100g i 16,28 mg GAE/100g nakon 15, 30 i 45 dana respektivno. U uzorku EO₁ koncentracije ukupnih fenola nakon 15, 30 i 45 dana od uzorkovanja iznose 68 mg GAE/100g, 52,25 mg GAE/100g i 45,6 mg GAE/100g.

Na grafiku 2, posmatrajući krivu koja pripada uzorku M₁, primjećen je pad u koncentraciji ukupnih fenola između 0 i 15 dana od uzorkovanja što je i očekivano budući da se uzorak nalazio pod dejstvom fotooksidativnog stresa. Između 15-og i 30-og dana primjetan je neznatan skok u koncentraciji fenola u vrijednosti od 5,99 mg GAE/100g koji se može objasniti time da je prilikom uzorkovanja maslinovog ulja za analizu pipetirana neka od neistaloženih čestica u maslinovom ulju koja je uticala da prikazani rezultat bude veći u odnosu na prethodni. Budući da ovaj uzorak nije flavorizovan ni eteričnim uljima ni ekstraktima ruzmarina ili divljeg origana, dolazi do pada u koncentraciji ukupnih fenola što nam dokazuje i vrijednost izmjerena nakon 45 dana od uzorkovanja koja iznosi 24,4 mg GAE/100g.

U intervalu od 0 do 15 dana od uzorkovanja primjetan je veliki skok u koncentraciji ukupnih fenola u uzorku EtO₁. To se može objasniti time što je uzorak EtO₁ flavorizovan eteričnim uljem divljeg origana koje je bogato fenolnim jedinjenjima i njegovim dodatkom došlo je do povećanja u koncentraciji ukupnih fenola u uzorku. Između 15-og i 30-og dana došlo je do pada u koncentraciji ukupnih fenola budući da je uzorak bio izložen fotooksidativnom stresu. Kada se uzorak EtO₁ uporedi

sa uzorkom M₁ vidi se da je veći pad u koncentraciji ukupnih fenola prisutan u uzorku EtO₁, iako to nije u skladu sa hipotezom ovog rada budući da uzorak M₁ nije flavorizovan. Iako je između 30-og i 45-og dana zabilježen manji pad u koncentraciji ukupnih fenola u uzorku EtO₁ nego u uzorku M₁, koncentracija ukupnih fenola posle 45 dana je manja kod uzorka EtO₁ nego kod uzorka M₁.

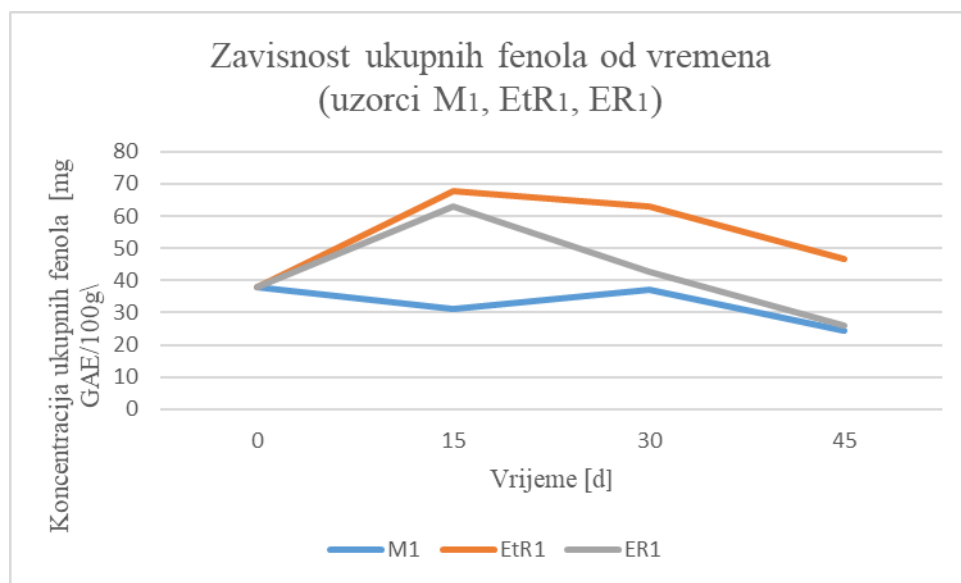
U uzorku EO₁ primjećen je rast u koncentraciji ukupnih fenola između nultog i petnaestog dana od uzorkovanja. Ovaj rast se može objasniti flavorizacijom uzorka ekstraktom divljeg origana koji je bogat fenolnim jedinjenjima. Između 15-og i 30-og kao i 30-og i 45-og dana primjećen je skoro linearan pad u koncentraciji fenolnih jedinjenja koji se objašnjava uticajem fotooksidativnog stresa na uzorak. Kada se upoređi koncentracija fenolnih jedinjenja u uzorku M₁ i uzorku EO₁ dolazi se do zaključka da je pad u koncentraciji fenolnih jedinjenja znatno manji kod uzorka EO₁ i da je koncentracija fenolnih jedinjenja nakon 45 dana mnogo veća u uzorku EO₁ nego u uzorku M₁ što ukazuje da dodatak ekstrakta origana ima pozitivan uticaj na koncentraciju fenolnih jedinjenja u maslinovom ulju i kada je uzorak izložen fotooksidativnom stresu.

Upoređujući uzorke EtO₁ i EO₁, primjećuje se da je koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja veća u uzorku EO₁ nakon 15, 30 i 45 dana te se može zaključiti da ekstrakt divljeg origana pokazuje bolja antioksidativna svojstva u maslinovom ulju pod dejstvom fotooksidativnog stresa od eteričnog ulja divljeg origana.

Prema Baiano i saradnicima, nakon devet mjeseci skladištenja, vrijednost ukupnih fenolnih jedinjenja u maslinovom ulju flavorizovanom eteričnim uljem origana iznosila je $23 \pm 0,4$ mg/kg, dok je početna vrijednost iznosila $52 \pm 1,4$ mg/kg [115]. U uzorku EtO₁ početna vrijednost je bila veća od početne vrijednosti ovog uzorka ali se u kraćem vremenskom intervalu desio veći pad u sadržaju ukupnih fenola u uzorku EtO₁ nego u uzorku analiziranom od strane Baiano i saradnika.

4.2.2 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na sadržaj ukupnih fenola maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa

Zavisnost ukupnih fenola od vremena za uzorke M₁, EtR₁ i ER₁ prikazana je na grafiku 3.



Grafik 3. Zavisnost ukupnih fenola od vremena u uzorcima M₁, EtR₁ i ER₁

Koncentracija fenolnih jedinjenja u uzorku EtR₁ nakon 15, 30 i 45 dana iznosi 67,71 mg GAE/100g, 62,95 mg GAE/100g i 46,8 mg GAE/100g, respektivno. U uzorku ER₁ koncentracija ukupnih fenola iznosi 63,13 mg GAE/100g, 42,86 mg GAE/100g i 26 mg GAE/100g nakon 15, 30 i 45 dana respektivno.

U uzorku EtR₁ primjećen je rast u koncentraciji fenolnih jedinjenja od 0-og do 15-og dana koji je objašnjiv dodatkom eteričnog ulja ruzmarina koje je bogato fenolnim jedinjenjima i time je doprinijelo porastu koncentracije ukupnih fenola u maslinovom ulju. Od 15-og do 30-og dana primjetan je neznatan pad u koncentraciji ukupnih fenola a od 30-og do 45-og dana takođe je primjećen pad u koncentraciji ukupnih fenola. To se može objasniti uticajem fotooksidativnog stresa na uzorak EtR₁. Kada se uporedi koncentracija ukupnih fenola u uzorku M₁ i uzorku EtR₁ primjećuje se da je koncentracija ukupnih fenola posle 15, 30 i 45 dana mnogo veća u uzorku EtR₁ nego u uzorku M₁ i dolazi se do zaključka da dodatak eteričnog ulja ruzmarina pozitivno utiče na povećanje koncentracije fenolnih jedinjenja u maslinovom ulju.

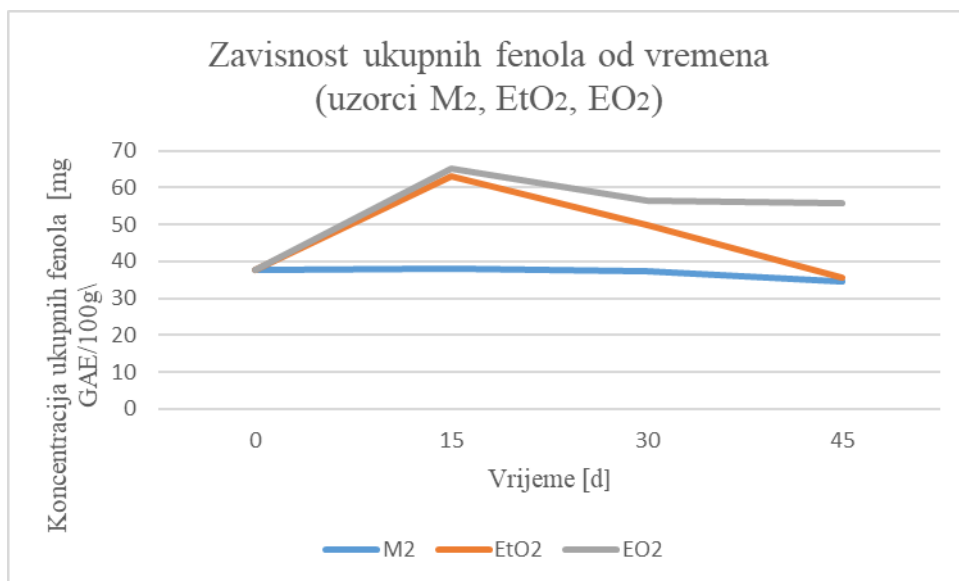
Nakon dodatka ekstrakta ruzmarina i perioda od 15 dana primjećen je porast u koncentraciji ukupnih fenola u uzorku ER₁. U periodu od 15-og do 45-og dana primjećen je linearan pad u koncentraciji fenolnih jedinjenja u uzorku ER₁ što se objašnjava dejstvom fotooksidativnog stresa na uzorak. Upoređivanjem uzorka M₁ i uzorka ER₁ može se vidjeti da je koncentracija fenolnih jedinjenja veća kod uzorka ER₁ posle 15-og i 30-og dana ali da je nakon 45 dana razlika u koncentraciji fenolnih jedinjenja gotovo neprimjetna.

Upoređujući uzorke EtR₁ i ER₁ u periodu nakon 15 dana, razlika u koncentraciji ukupnih fenola je neznatna. Posmatrajući grafik 3, može se primjetiti pad u koncentraciji fenola u oba uzorka nakon 30 dana. Nakon 45 dana, koncentracija ukupnih fenola u uzorku EtR₁ je gotovo dvostruko veća od koncentracije fenola u uzorku ER₁ što ukazuje na to da je ekstrakt ruzmarina podložniji dejstvu fotooksidativnog stresa od eteričnog ulja ruzmarina.

Prema Baiano i saradnicima sadržaj ukupnih fenola u uzorku flavorizovanom eteričnim uljem ruzmarina nakon devet mjeseci skladištenja iznosio je $15,7 \pm 1,2$ mg/kg dok je početna vrijednost iznosila $36,3 \pm 0,6$ mg/kg [115]. U uzorku ER₁ sadržaj ukupnih fenola prije skladištenja bio je veći nego u datom uzorku, ali s obzirom da je uzorak ER₁ skladišten 45 dana a dati uzorak 9 mjeseci, može se primjetiti da je u uzorku ER₁ primjećen veći pad u sadržaju ukupnih fenola.

4.2.3 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na sadržaj ukupnih fenola maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa

Na grafiku 4 prikazana je zavisnost koncentracije ukupnih fenola od vremena u uzorcima M₂, EtO₂ i EO₂.



Grafik 4. Zavisnost koncentracije ukupnih fenola od vremena u uzorcima M₂, EtO₂ i EO₂

U uzorku M₂ koncentracija ukupnih fenola nakon 15, 30 i 45 dana iznosi 38,2 mg GAE/100g, 37,5 mg GAE/100g i 34,7 mg GAE/100g, respektivno. Nakon 15, 30 i 45 dana koncentracija ukupnih fenola u uzorku EtO₂ iznosi 62,96 mg GAE/100g, 49,82 mg GAE/100g i 35,6 mg GAE/100g respektivno. U uzorku EO₂ koncentracija fenolnih jedinjenja nakon 15, 30 i 45 dana iznosi 65,05 mg GAE/100g, 56,6 mg GAE/100g i 55,93 mg GAE/100g, respektivno.

Upoređivanjem uzorka M_1 sa uzorkom iz kontrolne grupe, uzorkom M_2 primjećuje se veći pad u koncentraciji fenolnih jedinjenja kod uzorka M_1 dok je kod uzorka M_2 pad u koncentraciji u vremenskom intervalu od 45 dana neznatan. To se objašnjava dejstvom fotooksidativnog stresa na uzorak M_1 . Uzorak M_2 čuvan je na tamnom mjestu i na njega nije djelovao fotooksidativni stres te je njegova koncentracija ukupnih fenola ostala gotovo nepromjenjena.

Koncentracija fenolnih jedinjenja u uzorku M_2 je znatno manja nakon 15, 30 i 45 dana nego u uzorku EO_2 iako se može primijetiti da je pad u koncentraciji fenolnih jedinjenja u uzorku M_2 gotovo zanemarljiv, dok je pad u koncentraciji fenolnih jedinjenja u uzorku EO_2 veliki, posmatrajući izmjerene vrijednosti nakon 15 i 45 dana.

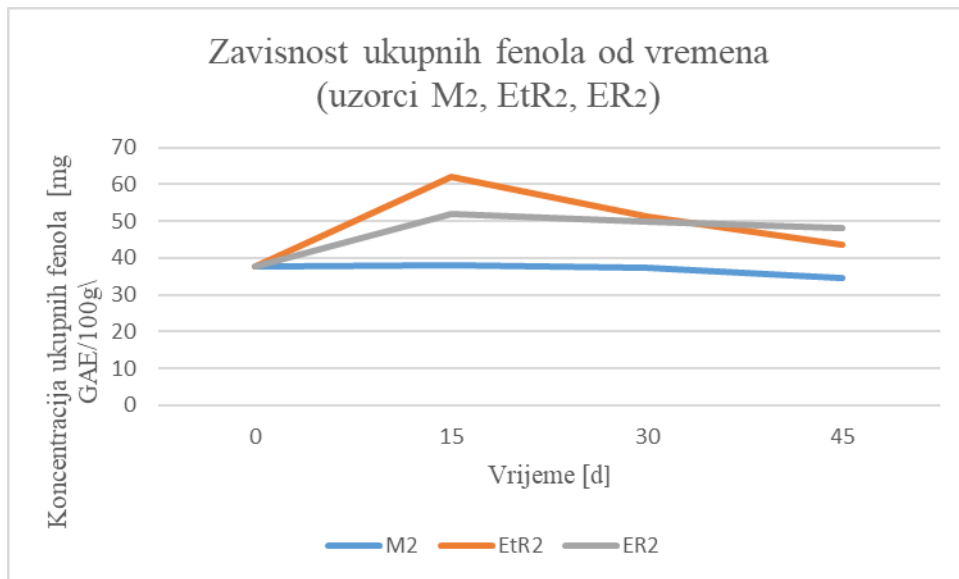
Upoređujući koncentraciju fenolnih jedinjenja u uzorcima M_2 i EO_2 , može se zaključiti da je ekstrakt origana bogat fenolnim jedinjenjima budući da se u uzorku EO_2 koncentracija fenolnih jedinjenja nakon 15 i 45 dana razlikuje za svega 10 mg GAE/100g. Mali padovi u koncentracijama fenolnih jedinjenja posledica su toga što se ovi uzorci ne nalaze pod dejstvom fotooksidativnog stresa i ukazuju na to da u odgovarajućim uslovima skladištenja, ekstrakt origana može produžiti rok trajanja maslinovog ulja kao prehrambenog proizvoda. Kada uporedimo uzorak EO_2 sa ostalim uzorcima, može se uočiti da posjeduje najveću koncentraciju fenolnih jedinjenja nakon 45 dana.

Kada se uporede koncentracije ukupnih fenola u uzorcima EO_1 i EO_2 nakon 15 dana od flavorizovanja vrijednosti su gotovo identične. Posle 30-og dana vidi se razlika u koncentraciji izazvana fotooksidativnim stresom – koncentracija ukupnih fenola u uzorku EO_1 je skoro duplo manja od koncentracije ukupnih fenola u uzorku EO_2 . Sličan odnos vrijednosti može se primjetiti i nakon 45 dana. Ovi podaci nam ukazuju na to da fotooksidativni stres znatno utiče na sadržaj fenolnih jedinjenja u maslinovom ulju flavorizovanom eteričnim uljem divljeg origana.

Upoređujući uzorke EO_1 i EO_2 može se primjetiti da nakon 30-og dana sadržaj fenolnih jedinjenja u oba uzorka je i dalje visok iako je uzorak EO_1 izložen fotooksidativnom stresu. Veća razlika u koncentracijama ukupnih fenola između ova dva uzorka vidi se nakon 45-og dana kada sadržaj fenolnih jedinjenja u uzorku EO_1 iznosi 45,6 mg GAE/100g a u uzorku EO_2 - 55,93 mg GAE/100g što nam opet ukazuje na to da fotooksidativni stres negativno utiče na koncentraciju fenolnih jedinjenja u ispitivanom maslinovom ulju.

4.2.4 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na sadržaj ukupnih fenola maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa

Zavisnost koncentracije ukupnih fenola od vremena za uzorke M₂, EtR₂ i ER₂ prikazana je na grafiku 5.



Grafik 5. Zavisnost koncentracije ukupnih fenola od vremena u uzorcima M₂, EtR₂ i ER₂

Koncentracija ukupnih fenola u uzorku EtR₂ je 62,18 mg GAE/100g, 51,13 mg GAE/100g i 43,52 mg GAE/100g nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno. Nakon 15, 30 i 45 dana od uzorkovanja koncentracije ukupnih fenola u uzorku ER₂ su 52 mg GAE/100g, 49,76 mg GAE/100g i 48,17 mg GAE/100g, respektivno.

Koncentracija fenolnih jedinjenja u uzorku EtR₂ u periodu od dana flavorizacije do 15-og dana je rasla kao posledica dodatka eteričnog ulja ruzmarina. Nakon 15 dana, dolazi do gotovo linearnog pada u koncentraciji fenolnih jedinjenja dok u uzorku M₂ tokom perioda od 45 dana, koncentracija fenolnih jedinjenja se gotovo ne mijenja.

Posmatrajući koncentraciju ukupnih fenola u uzorku ER₂ u periodu od 15-og do 45-og dana primjećuje se mali pad što ukazuje da se u adekvatnim uslovima skladištenja ekstrakt ruzmarina može koristiti da unapredi rok trajanja maslinovog ulja.

Upoređujući koncentracije ukupnih fenola u uzorcima EtR₁ i EtR₂ primjećuje se neznatna razlika. Nakon 30 dana primjećuje se veća razlika u koncentracijama dok je nakon 45 dana koncentracija znatno veća u uzorku EtR₁ nego u uzorku EtR₂ iako se on nalazi pod dejstvom fotooksidativnog stresa.

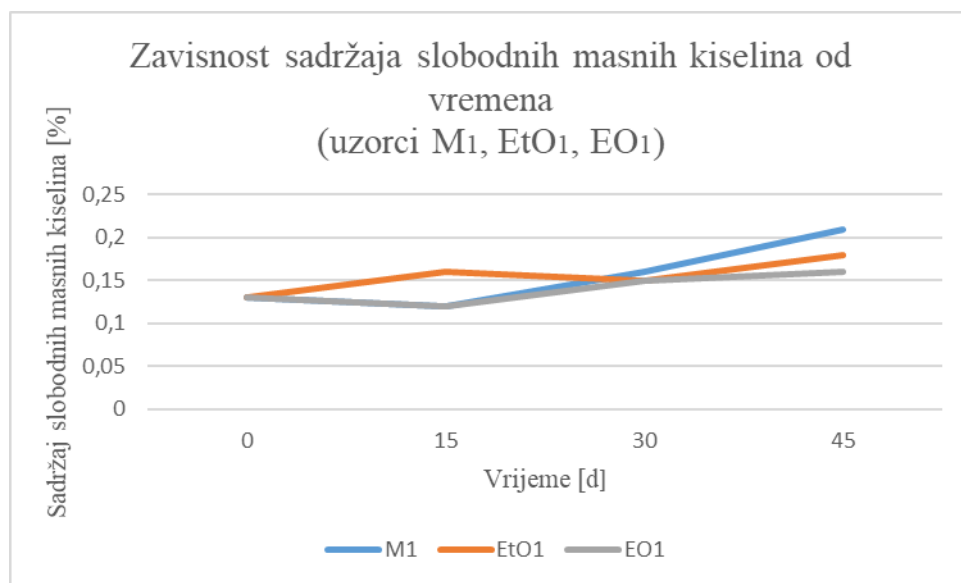
Posmatranjem vrijednosti koncentracije ukupnih fenola u uzorcima ER₁ i ER₂ nakon 15 dana primjećena je veća koncentracija ukupnih fenola u uzorku ER₁ nego u uzorku ER₂ iako je uzorak ER₂ izložen fotooksidativnom stresu. Ovo se može objasniti time da je tokom vršenja analiza pipetirana neka od čestica koje se nisu istaložile te su uticale na brojnu vrijednost. Ipak, nakon 30 dana primjećen je manji pad u koncentraciji ukupnih fenola u ER₂ nego u ER₁ kao i veća koncentracija ukupnih fenola u ER₂ u odnosu na uzorak ER₁. Nakon 45 dana koncentracija fenolnih jedinjenja je više nego duplo veća u uzorku ER₂ nego u uzorku ER₁ što se može objasniti dejstvom fotooksidativnog stresa na uzorak ER₁.

4.3 Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina

Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina vršeno je CDR OxiTester-om. Početna vrijednost slobodnih masnih kiselina izražena kao procenat oleinske kiseline prije izvršene flavorizacije iznosila je 0,13%. Studija Barrecca i saradnika je pokazala da dodavanje eteričnih ulja origana i ruzmarina u ekstradjevičansko maslinovo ulje koje je potom izloženo dejstvu fotooksidativnog stresa utiče pozitivno na sadržaj SMK budući da ne dolazi do promjene u procentima oleinske kiseline prije i posle dejstva fotooksidativnog stresa [114]. Mulagić i saradnici su dodali različite koncentracije ruzmarina, bosiljka i nane u ekstradjevičansko maslinovo ulje koje su zatim izložili fotooksidativnom stresu. Dodavanje eteričnog ulja ruzmarina efikasno smanjuje nivoe slobodnih masnih kiselina u uljima, poboljšavajući njihovu oksidativnu stabilnost. Početna vrijednost SMK je iznosila $0,06 \pm 0,00$ a nakon 24h najveća vrijednost je iznosila $0,20 \pm 0,04$ sa dodatkom 2% eteričnog ulja ruzmarina te se dolazi do zaključka da nije bilo značajnijih promjena. Koncentracije od 0,5% i 1,0% su optimalne za održavanje niskog sadržaja SMK, dok veće koncentracije možda neće pružiti dodatne koristi i mogu dovesti do povećanih pokazatelja kvarenja [116]. U radu da Cruz i saradnika ekstradjevičansko maslinovo ulje flavorizovano je eteričnim uljima ruzmarina, origana, lovora i limuna i sadržaj slobodnih masnih kiselina u ovim uzorcima kretao se od 0,46 do 0,64% dok je kontrolna grupa koja predstavlja neflavorizovani uzorak imala sadržaj slobodnih masnih kiselina u vrijednosti od 0,80% [117].

4.3.1 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na sadržaj slobodnih masnih kiselina maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa

Zavisnost sadržaja slobodnih masnih kiselina od vremena u uzorcima M₁, EO₁ i EtO₁ prikazana je na grafiku 6.



Grafik 6. Zavisnost sadržaja SMK od vremena u uzorcima M₁, EO₁ i EtO₁

Sadržaj slobodnih masnih kiselina koje je M₁ imao su 0,12% , 0,16% i 0,21% respektivno. Sadržaj slobodnih masnih kiselina u uzorku EtO₁ iznosio je 0,16%, 0,15% i 0,18% nakon 15, 30 i 45 dana od dodatka eteričnog ulja origana, respektivno. U uzorku EO₁ sadržaj slobodnih masnih kiselina iznosio je 0,12%, 0,15% i 0,16% nakon 15, 30 i 45 dana od flavorizacije, respektivno.

Primjećen je rast u sadržaju SMK u uzorku M₁ koji se može objasniti time što se uzorak nalazio pod dejstvom fotooksidativnog stresa koji izaziva razgradnju triglicerida u digliceride i monogliceride i oslobađanje slobodnih masnih kiselina čime se povećava njihova koncentracija u uzorku.

Iako je primjećen rast u koncentraciji SMK u uzorku EtO₁ od dana flavorizovanja do dana kada je izvršena prva analiza parametara (nakon 15 dana), u periodu od 15 do 30 dana dolazi do neznatnog smanjenja u koncentraciji slobodnih masnih kiselina. U periodu od 30 do 45 dana od flavorizacije došlo je do porasta u koncentraciji slobodnih masnih kiselina usled dejstva fotooksidativnog stresa kojem je uzorak bio izložen. Kada se uporedi procentualni sadržaj slobodnih masnih kiselina u uzorku M₁ i uzorku EtO₁ može se primjetiti da veći sadržaj SMK postoji u uzorku M₁ (osim 30 dana nakon flavorizacije). To se može objasniti time što je uzorak EtO₁ flavorizovan eteričnim uljem divljeg origana koje je bogato fenolnim jedinjenjima koja ga štite od fotooksidativnog stresa što nije slučaj kod uzorka M₁.

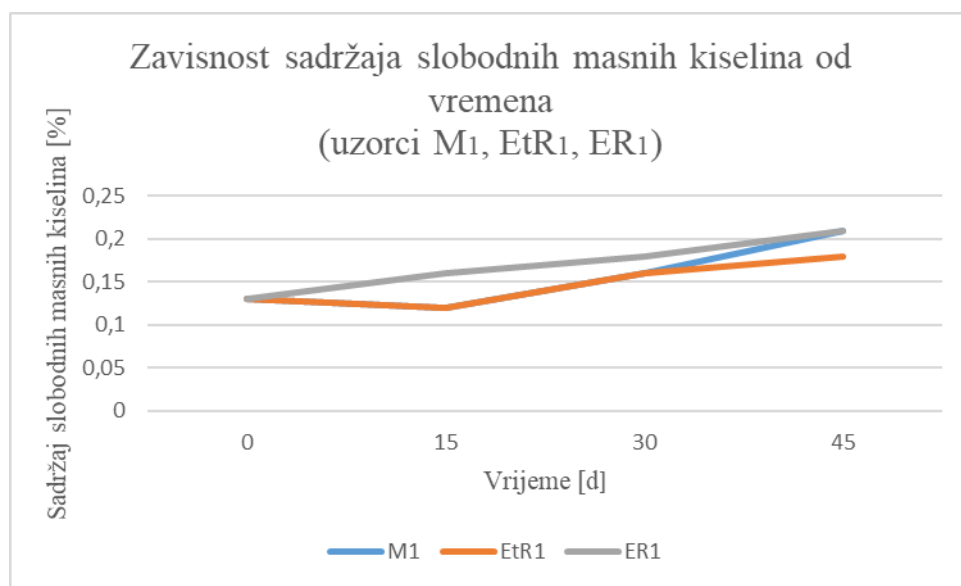
Sadržaj slobodnih masnih kiselina u periodu od 15 do 45 dana u uzorku EO₁ je imao gotovo linearan rast. Prilikom upoređivanja rezultata u uzorku EO₁ sa uzorkom M₁ opet se dolazi do zaključka da zbog

prisustva fenolnih jedinjenja u iz ekstrakta divljeg origana u uzorku EO₁, sadržaj slobodnih masnih kiselina je manji nego u uzorku M₁.

Assensio i saradnici su posmatrali promjenu u sadržaju slobodnih masnih kiselina tokom 28 dana od dana flavorizovanja. Početna vrijednost SMK iznosila je 0,25% što je značajno veći procenat u odnosu na sve uzorke analizirane u ovom radu, čak i nakon dejstva fotooksidativnog stresa. Nakon perioda od 28 dana, sadržaj SMK u maslinovom ulju flavorizovanom eteričnim uljem origana izloženom dejstvu fotooksidativnog stresa iznosio je 0,32% što je gotovo dvostruko veća vrijednost od one izmjerene prilikom analize uzorka EtO₁ koja je iznosila 0,18% [118].

4.3.2 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na sadržaj slobodnih masnih kiselina maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa

Zavisnost sadržaja slobodnih masnih kiselina od vremena u uzorcima M₁, EtR₁ i EO₁ prikazana je na grafiku 7.



Grafik 7. Zavisnost sadržaja SMK od vremena u uzorcima M₁, EtR₁ i EO₁

U uzorku EtR₁ sadržaj slobodnih masnih kiselina 15, 30 i 45 dana nakon flavorizacije iznosi 0,12%, 0,16% i 0,18%, respektivno. U uzorku ER₁ sadržaj slobodnih masnih kiselina iznosi 0,16%, 0,18% i 0,21% nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno.

Rezultati dobijeni prilikom analize uzorka EtR₁ slični su kao i rezultati kod uzorka EtO₁ i EO₁. Kada se sadržaj slobodnih masnih kiselina u uzorku EtR₁ koji je flavorizovan eteričnim uljem ruzmarina

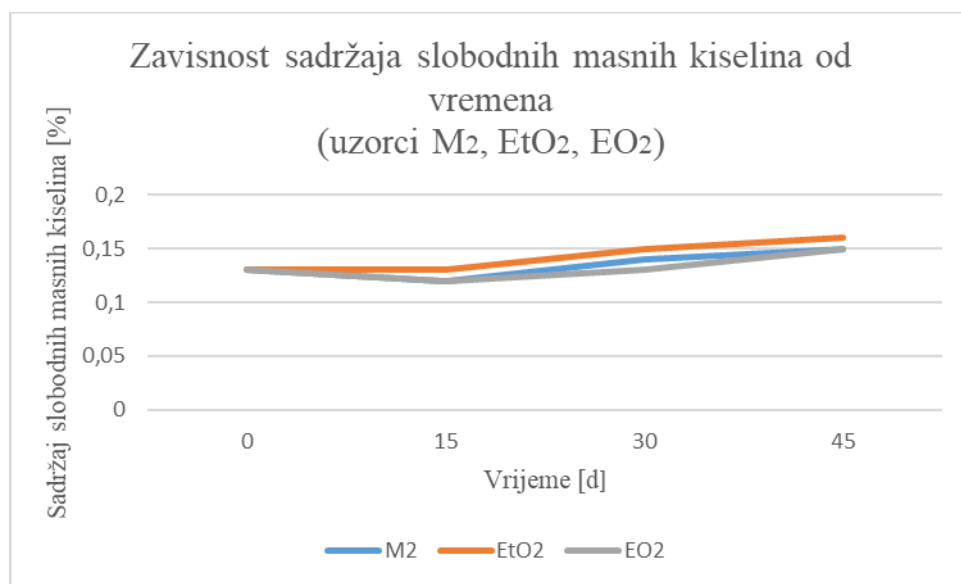
upoređi sa uzorkom M_1 jasno je da je uticaj fenolnih jedinjenja na sprečavanje dejstva fotooksidativnog stresa i u ovom uzorku uticao na sadržaj slobodnih masnih kiselina.

Dobijeni rezultati pokazuju da prema ovom parametru najslabiju zaštitu od fotooksidativnog dejstva pokazuje uzorak ER_1 . Upoređujući rezultate dobijene za uzorak M_1 i uzorak ER_1 primjećeno je da nakon 15 i 30 dana uzorak M_1 ima manji sadržaj slobodnih masnih kiselina od uzorka ER_1 dok je nakon 45 dana sadržaj slobodnih masnih kiselina u oba uzorka je identičan.

Prema Benkhoud i saradnicima, sadržaj slobodnih masnih kiselina u periodu od 12 mjeseci u kontrolnom uzorku su se promijenile od $0,23 \pm 0,01\%$ do $1,17 \pm 0,01\%$. Nakon skladištenja, vrijednost sadržaja SMK u maslinovom ulju flavorizovanom eteričnim uljem ruzmarina iznosila je $0,58 \pm 0,02\%$ [119]. Ova vrijednost je znatno veća od vrijednosti dobijene za uzorak EtR_1 ali treba se uzeti u obzir da je uzorak EtR_1 skladišten u kraćem vremenskom intervalu.

4.3.3 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na sadržaj slobodnih masnih kiselina maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa

Zavisnost sadržaja slobodnih masnih kiselina od vremena u uzorcima M_2 , EtO_2 i EO_2 prikazana je na grafiku 8.



Grafik 8. Zavisnost sadržaja SMK od vremena u uzorcima M_2 , EtO_2 i EO_2

Sadržaj slobodnih masnih kiselina u uzorku M_2 iznosi 0,12%, 0,14% i 0,15% nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno. U uzorku EtO_2 sadržaj slobodnih masnih kiselina iznosio je 0,13%, 0,15% i 0,16%. U

uzorku EO₂ ovaj parametar ima vrijednosti 0,12%, 0,13% i 0,15%, nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno.

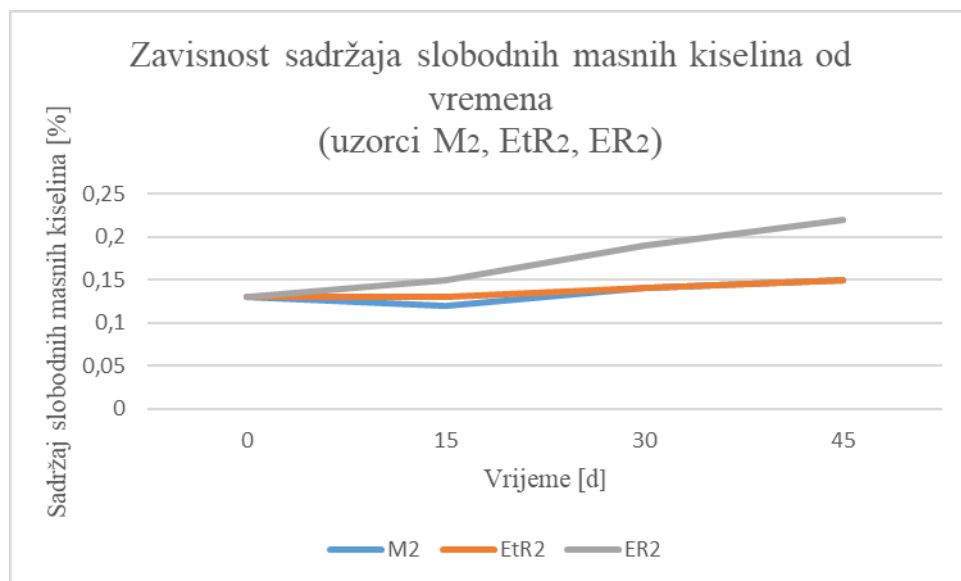
Uzorak M₂ tokom perioda od 45 dana nije imao značajnih promjena u sadržaju slobodnih masnih kiselina budući da se nije nalazio pod dejstvom fotooksidativnog stresa. Upoređujući rezultate dobijene za uzorke M₂, EtO₂ i EO₂, primjećuju se neznatne razlike u sadržaju SMK što se može objasniti time što nijedan od uzoraka nije bio izložen dejstvu fotooksidativnog stresa te nije došlo do razgradnje triglicerida u digliceride i monodigliceride u tolikoj mjeri kao kod uzoraka koji se nalaze pod dejstvom fotooksidativnog stresa. Uzorak EtO₁ zbog dejstva fotooksidativnog stresa na trigliceride ima veći sadržaj SMK od uzorka EtO₂.

Analizom rezultata predstavljenih na graficima 6 i 8 primjećeno je da ekstrakt divljeg origana ima pokazuje veoma dobra antioksidativna svojstva pod dejstvom fotooksidativnog stresa budući da se sadržaj slobodnih masnih kiselina u uzorcima EO₁ i EO₂ neznatno razlikuje.

U radu Assensio i saradnika, maslinovo ulje flavorizovano eteričnim uljem origana koje se nije nalazilo pod dejstvom fotooksidativnog stresa nije imalo promjena u sadržaju SMK u periodu od 28 dana i ta vrijednost iznosila je 0,25% što je znatno veća vrijednost u odnosu na onu dobijenu u uzorku EtO₂ nakon 45 dana skladištenja koja je iznosila 0,16% [118].

4.3.4 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na sadržaj slobodnih masnih kiselina maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa

Na grafiku 9 prikazana je zavisnost sadržaja slobodnih kiselina od vremena u uzorcima M₂, EtR₂ i ER₂.



Grafik 9. Zavisnost sadržaja SMK od vremena u uzorcima M₂, EtR₂ i ER₂

Uzorak EtR₂ sadrži je 0,13%, 0,14% i 0,15% slobodnih masnih kiselina nakon 15, 30 i 45 dana. Sadržaj slobodnih masnih kiselina u uzorku ER₂ iznosi 0,15%, 0,19% i 0,22%, nakon 15, 30 i 45 dana respektivno.

Posmatrajući grafik 9, primjećuju se neznatne razlike u procentualnom sadržaju slobodnih masnih kiselina za uzorke M₂ i EtR₂.

Upoređujući rezultate dobijene za uzorke EtR₁ i EtR₂ zaključuje se da eterično ulje ruzmarina ima dobra antioksidativna svojstva i da može da štiti proizvod od fotooksidativnog stresa budući da se rezultati dobijeni za uzorak EtR₁ ne razlikuju bitno od rezultata dobijenih za uzorak EtR₂.

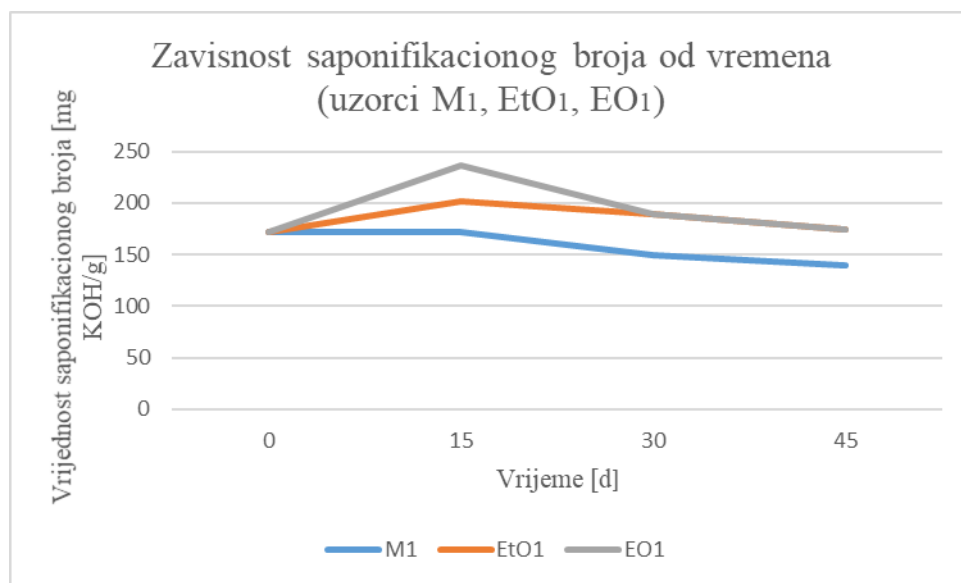
Posmatrajući grafik 9 može se zaključiti da ekstrakt ruzmarina pokazuje najslabija antioksidativna svojstva budući da uzorak ER₂ koji nije bio izložen fotooksidativnom stresu ima visok procentualni sadržaj slobodnih masnih kiselina nakon 45 dana od flavorizovanja.

4.4 Određivanje saponifikacionog broja

Saponifikacioni broj za ekstradjevičansko maslinovo ulje prema IOC-u nalazi se u opsegu od 182-193 mg KOH/g [30]. Početna vrijednost saponifikacionog broja prije flavorizacije iznosila je 172,2 mg KOH/g. Prema literaturnim podacima, očekivano je smanjenje saponifikacionog broja. Méndez i Falqué su u periodu od 6 mjeseci skladištenja analizirali vrijednosti saponifikacionog broja ekstradjevičanskog maslinovog ulja. Ovaj parametar se kretao od početne vrijednosti $190,45 \pm 0,16$ mg KOH/g do $185,75 \pm 0,12$ mg KOH/g u tamnim staklenim flašama, bez dejstva fotooksidativnog stresa [120].

4.4.1 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na vrijednost saponifikacionog broja maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa

Zavisnost saponifikacionog broja od vremena u uzorcima M₁, EtO₁ i EO₁ prikazana je na grafiku 10.



Grafik 10. Zavisnost saponifikacionog broja od vremena u uzorcima M₁, EtO₁ i EO₁

Vrijednost saponifikacionog broja u uzorku M₁ nakon 15, 30 i 45 dana iznosila je 172,2 mg KOH/g, 150,15 mg KOH/g i 140 mg KOH/g. U uzorku EtO₁ vrijednost saponifikacionog broja iznosila je 201,6 mg KOH/g, 189 mg KOH/g i 175 mg KOH/g a u uzorku EO₁ 236,35 mg KOH/g, 189 mg KOH/g i 175 mg KOH/mg nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno.

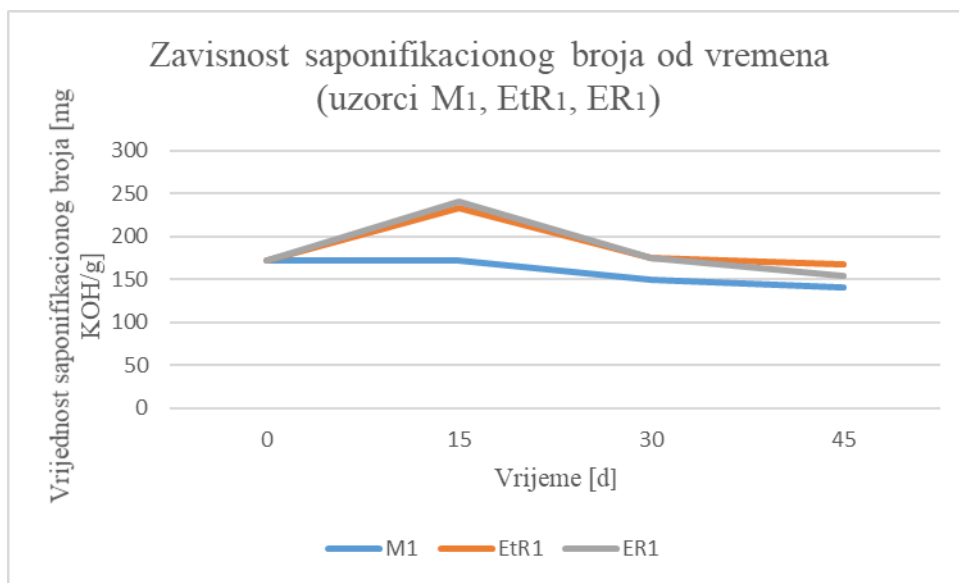
Posmatrajući grafik 10 primjetan je pad u vrijednosti saponifikacionog broja u uzorku M₁ u vremenskom periodu od 15-og do 30-og dana kao i u periodu od 30-og do 45-og dana. Očekivane su najniže vrijednosti saponifikacionog broja u ovom uzorku budući da se nalazio pod dejstvom fotooksidativnog stresa i nije bio flavorizovan.

Vrijednosti saponifikacionog broja u uzorcima EtO₁ i EO₁ su mnogo veće nakon 15 dana od flavorizacije od vrijednosti saponifikacionog broja u uzorku M₁ i može se pretpostaviti da je ovaj rezultat posledica flavorizacije ova dva uzorka - komponente koje se nalaze u eteričnom ulju i ekstraktu divljeg origana (fenoli, terpeni i druga jedinjenja) mogu reagovati sa masnim kiselinama u maslinovom ulju i tako povećati saponifikacioni broj. U periodu nakon 30 i 45 dana, u sva tri uzorka primjećen je pad u vrijednosti saponifikacionog broja a ono što je posebno zanimljivo je da je vrijednost saponifikacionog broja u uzorcima EtO₁ i EO₁ nakon 45 dana veća od vrijednosti saponifikacionog broja u uzorku M₁ nakon 15 dana od dana flavorizacije i izlaganja fotooksidativnom stresu. Iz ovog podatka zaključuje se da eterično ulje i ekstrakt divljeg origana dobro utiču na povećanje kvaliteta maslinovog ulja.

U dostupnoj literaturi ne postoje podaci sa kojima bi se dobijeni podaci mogli upoređivati.

4.4.2 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na vrijednost saponifikacionog broja maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa

Zavisnost saponifikacionog broja od vremena u uzorcima M₁, EtR₁ i ER₁ prikazana je na grafiku 11.



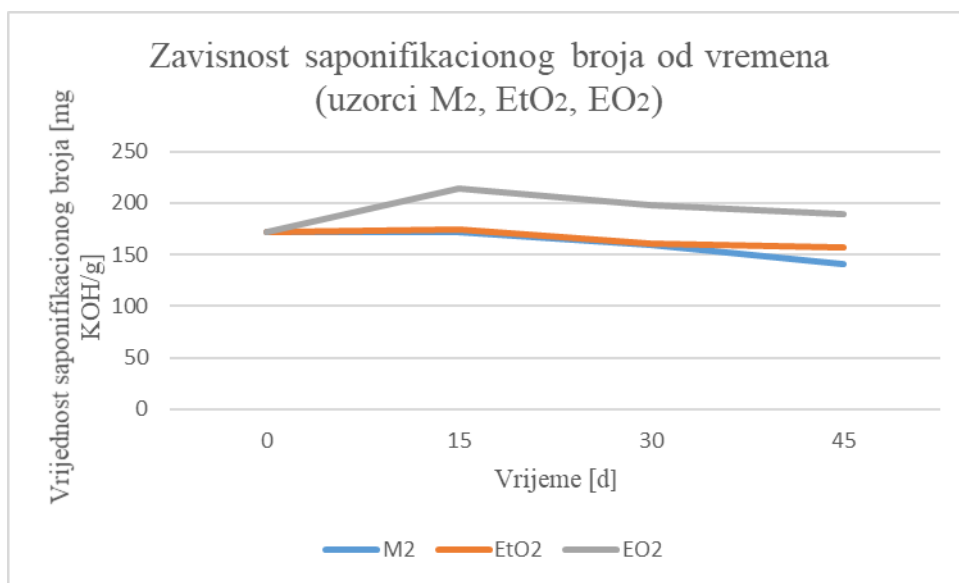
Grafik 11. Zavisnost saponifikacionog broja od vremena u uzorcima M₁, EtR₁ i ER₁

U uzorku EtR₁ vrijednost saponifikacionog broja nakon 15, 30 i 45 dana od dana flavorizacije iznosi 233,33 mg KOH/g, 175 mg KOH/g i 168 mg KOH/g respektivno. Vrijednost saponifikacionog broja u uzorku ER₁ iznosi 240 mg KOH/g, 175 mg KOH/g i 154 mg KOH/mg, nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno.

Nakon dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina primjećen je veliki rast u vrijednosti saponifikacionog broja u uzorcima EtR₁ i ER₁ kako je i prikazano na grafiku 11. Nakon 30 i 45 dana, primjetan je znatan pad u vrijednosti saponifikacionog broja u uzorcima EtR₁ i ER₁ ali ako se te vrijednosti uporede sa vrijednostima saponifikacionog broja u uzorku M₁, može se primjetiti da eterično ulje i ekstrakt ruzmarina pokazuju određena antioksidativna i fotoprotektivna svojstva.

4.4.3 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na vrijednost saponifikacionog broja maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa

Zavisnost saponifikacionog broja od vremena u uzorcima M₂, EtO₂ i EO₂ prikazana je na grafiku 12.



Grafik 12. Zavisnost saponifikacionog broja od vremena u uzorcima M₂, EtO₂ i EO₂

U uzorku M₂, vrijednosti saponifikacionog broja iznose 172,2 mg KOH/g, 159 mg KOH/g i 141,4 mg KOH/g, respektivno. Nakon 15, 30 i 45 dana od flavorizacije vrijednosti saponifikacionog broja u uzorku EtO₂ iznosile su 175 mg KOH/g, 161 mg KOH/g i 157,5 mg KOH/g a u uzorku EO₂: 213,85 mg KOH/g, 197,4 mg KOH/g i 189 mg KOH/g.

Upoređujući vrijednosti dobijene u uzorcima M₁ i M₂ dolazi se do zaključka da uzorak M₁ zbog dejstva fotooksidativnog stresa i nedostatka flavorizacionog agensa ima niže vrijednosti saponifikacionog broja od uzorka M₂ koji se nije nalazio pod dejstvom fotooksidativnog stresa.

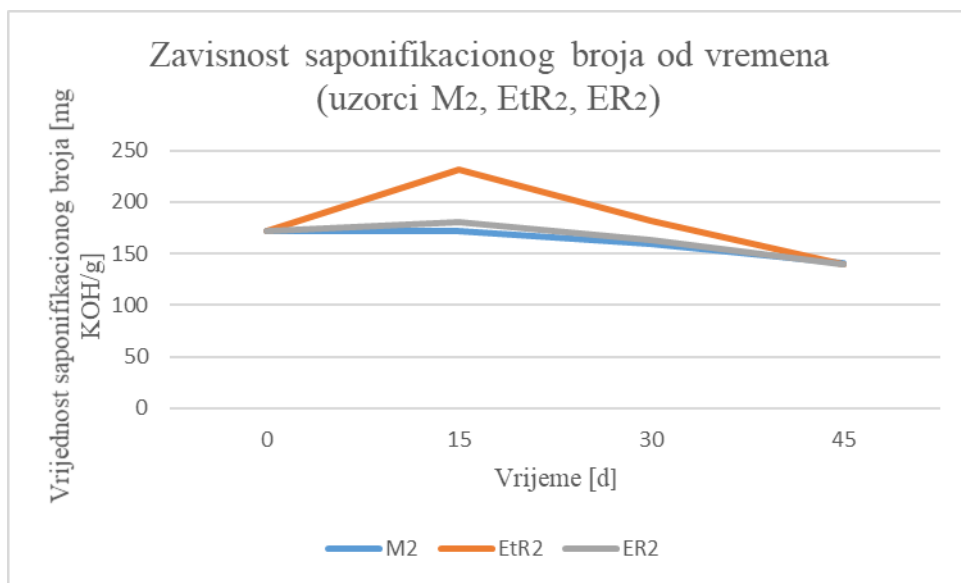
Upoređujući vrijednosti saponifikacionog broja u uzorcima M₂ i EtO₂ nisu primjećene velike razlike što dovodi do zaključka da eterično ulje origana, po ovom parametru, ne utiče znatno na produženje roka trajanja prehrambenog proizvoda. U uzorku EtO₂ nije došlo do velikog povećanja saponifikacionog broja što ukazuje na to da je povećanje u uzorku EtO₁, koji je flavorizovan istim agansom, podstaknuto dejstvom fotooksidativnog stresa.

Kada se uporede vrijednosti saponifikacionog broja u uzorcima M₂ i EO₂, primjećuje se da su vrijednosti saponifikacionog broja u uzorku EO₂ znatno veće nego u uzorku M₂.

Dodatak ekstrakta divljeg origana u uzorke EO₁ i EO₂ uticao je na znatno povećanje saponifikacionog broja. Primjećen je veći pad vrijednosti saponifikacionog broja u uzorku EO₁ nego u uzorku EO₂ što se može objasniti dejstvom fotooksidativnog stresa na taj uzorak.

4.4.4 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na vrijednost saponifikacionog broja maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa

Zavisnost saponifikacionog broja od vremena u uzorcima M₂, EtR₂ i ER₂ prikazana je na grafiku 13.



Grafik 13. Zavisnost saponifikacionog broja od vremena u uzorcima M₂, EtR₂ i ER₂

U uzorku EtR₂ vrijednosti saponifikacionog broja su iznosile 231 mg KOH/g, 182 mg KOH/g i 140 mg KOH/g a u uzorku ER₂ 180,73 mg KOH/g, 163 mg KOH/g i 140 mg KOH/g nakon 15, 30 i 45 dana od dana flavorizacije, respektivno.

Upoređujući vrijednosti saponifikacionog broja u uzorcima M₂, EtR₂ i ER₂ primjećene su neznatne razlike, osim u periodu nakon 15 dana od dana flavorizacije kada je vrijednost saponifikacionog broja u uzorku EtR₂ bila znatno veća nego u druga dva uzorka. Nakon toga u uzorku EtR₂ primjećen je veliki pad u vrijednosti saponifikacionog broja i nakon 45 dana, sva tri uzorka su imala gotovo istu vrijednost ovog parametra.

Posmatranjem dobijenih vrijednosti saponifikacionog broja u uzorcima EtR₁ i EtR₂, nakon 30 dana od flavorizovanja primjećen je veći pad u vrijednosti saponifikacionog broja u uzorku EtR₁ dok nakon 45 dana u uzorku EtR₂ vrijednost saponifikacionog broja je bila znatno niža od vrijednosti saponifikacionog broja u uzorku EtR₁. Dobijeni podaci ukazuju na to da eterično ulje ruzmarina, posmatrajući ovaj parametar, nije pouzdan antioksidant budući da se rezultati ne mogu predvidjeti.

U uzorku ER₁ nakon flavorizacije došlo je do znatnog povećanja u vrijednosti saponifikacionog broja što nije slučaj za uzorak ER₂ gdje se vrijednost saponifikacionog broja povećala za 8,53 mg KOH/g

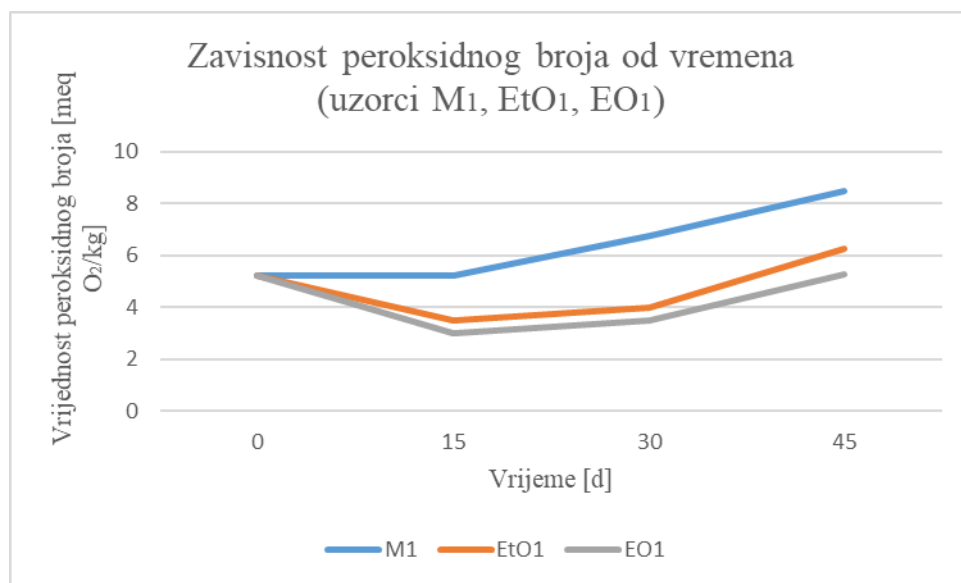
u odnosu na 67,8 mg KOH/g u uzorku ER₁. Nakon 30 dana od flavorizovanja, u uzorku ER₁ došlo je do velikog pada u vrijednosti saponifikacionog broja i taj trend se nastavio i posle 45 dana. U uzorku ER₂, pad vrijednosti saponifikacionog broja je gotovo linearan. Ipak, uporedivši krajnje vrijednosti saponifikacionog broja uzoraka, može se zaključiti da ekstrakt ruzmarina posjeduje dobra antioksidativna svojstva budući da je razlika između krajnjih vrijednosti saponifikacionih brojeva ova dva uzorka mala a da se uzorak ER₁ nalazio pod dejstvom antioksidativnog stresa.

4.5 Određivanje peroksidnog broja

Prema IOC-u vrijednosti peroksidnog broja za ekstradjevičansko maslinovo ulje nalaze se u opsegu od 0 do 20 meq O₂/kg [30]. Početna vrijednost peroksidnog broja uzoraka iznosila je 5,22 meq O₂/kg. Prema Mulagić i saradnicima peroksidni broj je varirao od $2,18 \pm 0,25$ meq O₂ /kg do $12,50 \pm 0,70$ meq O₂ /kg. U koncentracijama do 1,0%, utvrđeno je da eterično ulje ruzmarina poboljšava oksidativnu stabilnost maslinovog ulja, održavajući niže peroksidne brojeve. Koncentracija od 2,0% dovela je do povećanja peroksidnog broja, što ukazuje na prezasićenost. Posle 24 sata izlaganja fotooksidativnom stresu, peroksidni broj za ekstradjevičansko maslinovo ulje flavorizovano eteričnim uljima ruzmarina je u prosjeku iznosio oko 9,65 meq O₂/kg, što je blizu prihvatljivih granica [115]. Benkhoud i saradnici istraživali su uticaj šest eteričnih ulja na senzorne karakteristike i volatilna jedinjenja maslinovog ulja – eterična ulja crne papričice, ruzmarina, komorača, timijana, pomorandže i Brazilskeg drva bibera. Peroksidni broj se kretao od $15,61 \pm 0,6$ meq O₂/kg na početku do $22,5 \pm 1,4$ meq O₂/kg ulja nakon 12 mjeseci u kontrolnom uzorku [119]. da Cruz i saradnici koristili su eterična ulja ruzmarina, origana, lovora i limuna i posmatrali promjenu u peroksidnom broju. Peroksidni broj kontrolnog uzorka iznosio je 20 meq O₂ /kg ulja a kod flavorizovanih ulja varirao je od 9,59 do 12,16 meq O₂ /kg ulja [117].

4.5.1 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na vrijednost peroksidnog broja maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa

Zavisnost promjene peroksidnog broja od vremena za uzorke M₁, EtO₁ i EO₁ prikazana je na grafiku 14.



Grafik 14. Zavisnost peroksidnog broja od vremena u uzorcima M₁, EtO₁ i EO₁

Vrijednost peroksidnog broja u uzorku M₁ iznosila je 5,2 meq O₂/kg, 6,75 meq O₂/kg i 8,5 meq O₂/kg nakon 15, 30 i 45 dana od flavorizacije. Vrijednost peroksidnog broja u uzorku EtO₁ iznosila je 3,5 meq O₂/kg, 4 meq O₂/kg i 6,25 meq O₂/kg a u uzorku EO₁ 3 meq O₂/kg, 3,5 meq O₂/kg i 5,25 meq O₂/kg nakon 15, 30 i 45 dana od flavorizacije.

U uzorku M₁ primjećen je najveći rast peroksidnog broja od svih uzoraka tokom vremena što se objašnjava time što ovaj uzorak nije flavorizovan nijednim od agenasa i bio je izložen fotooksidativnom stresu. Nakon 45 dana, vrijednost peroksidnog broja u uzorku M₁ iznosi čak 8,5 meq O₂/kg što je i najveća izmjerena vrijednost peroksidnog broja u svim uzorcima i poklapa se sa hipotezom ovog rada da eterična ulja i ekstrakti ruzmarina i divljeg origana imaju antioksidativna svojstva i štite od fotooksidativnog stresa.

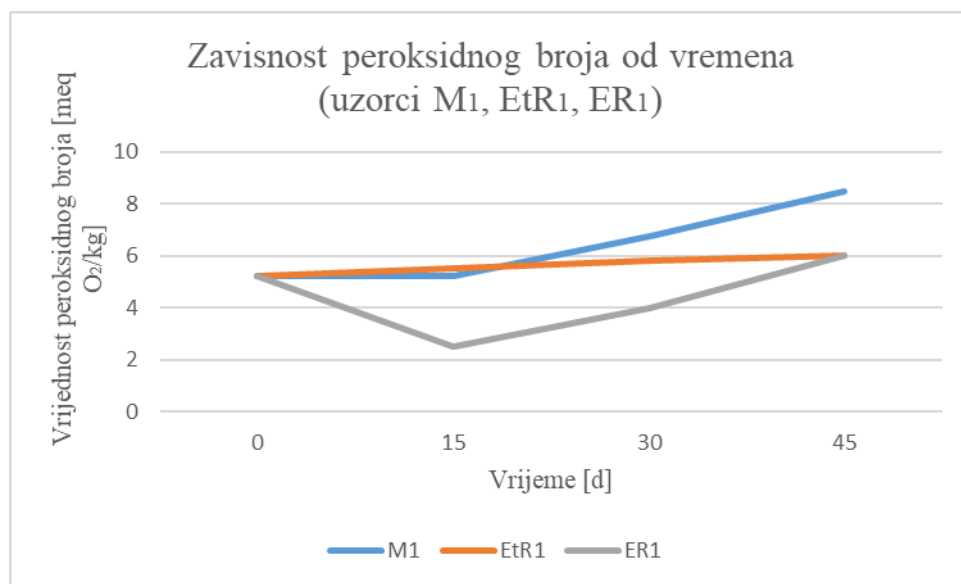
Vrijednost peroksidnog broja u uzorku EtO₁ se smanjila nakon flavorizovanja eteričnim uljem origana. Tokom vremenskog perioda od mjesec dana, peroksidni broj je rastao do 6,25 meq O₂/kg što je značajno manja vrijednost u odnosu na vrijednost peroksidnog broja u uzorku M₁.

Nakon flavoziracije ekstraktom origana, vrijednost peroksidnog broja u uzorku EO₁ je pala sa 5,2 meq O₂/kg na 3 meq O₂/kg a nakon 45 dana, vrijednost peroksidnog broja u ovom uzorku je dostigla vrijednost koju je uzorak M₁ imao nakon 15 dana od dana flavorizacije što ukazuje na dobra antioksidativna svojstva divljeg origana.

U radu Assensia i saradnika navodi se da se vrijednost peroksidnog broja tokom vremenskog intervala od 28 dana nije mijenjala u uzorku maslinovog ulja flavorizovanog eteričnim uljem origana izloženog fotooksidativnom stresu i iznosila je 10,91 meq O₂/kg. Ova vrijednost je znatno veća od vrijednosti izmjerene za uzorak naš uzorak EtO₁ koja je iznosila 6,25 meq O₂/kg [118].

4.5.2 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na vrijednost peroksidnog broja maslinovog ulja pod dejstvom fotooksidativnog stresa

Na grafiku 15 prikazana je zavisnost promjene peroksidnog broja od vremena za uzorke M₁, EtR₁ i ER₁.



Grafik 15. Zavisnost peroksidnog broja od vremena u uzorcima M₁, EtR₁ i ER₁

Vrijednost peroksidnog broja u uzorku EtR₁ iznosila je 5,5 meq O₂/kg, 5,8 meq O₂/kg i 6 meq O₂/kg nakon 15, 30 i 45 dana od flavorizacije a u uzorku ER₁ vrijednost peroksidnog broja iznosila je 2,5 meq O₂/kg, 4 meq O₂/kg i 6 meq O₂/kg nakon 15, 30 i 45 dana od flavorizacije, respektivno.

Vrijednosti peroksidnog broja u uzorku EtR₁ su znatno niža nego u uzorku M₁ što nam ukazuje da je dodatak eteričnog ulja ruzmarina u uzorak EtR₁ pokazao određena fotoprotektivna svojstva. Ipak, nakon dodatka eteričnog ulja ruzmarina u uzorak, vrijednost peroksidnog broja se nije smanjila u uzorku koji se nalazio pod dejstvom fotooksidativnog stresa.

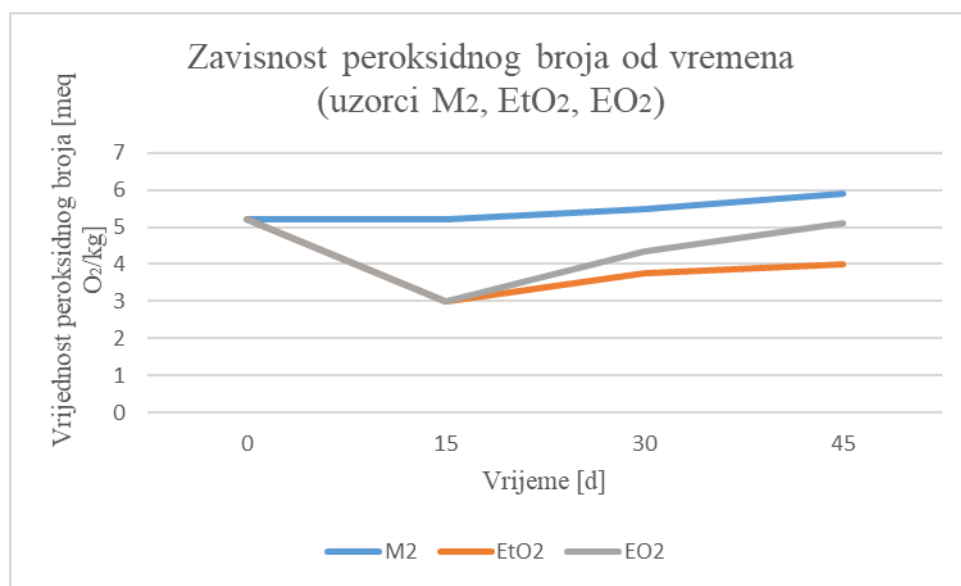
Iako je nakon 15 dana od dana flavorizovanja, u uzorku ER₁ izmjerena najmanja vrijednost peroksidnog broja, tokom idućih 30 dana primjećen je rapidan rast u vrijednosti peroksidnog broja što dugoročno gledano nije pozitivan rezultat. Ipak, vrijednosti peroksidnog broja u uzorku ER₁ su znatno

manji od vrijednosti peroksidnog broja u uzorku M₁ što pokazuje antioksidativna svojstva ekstrakta ruzmarina pod dejstvom fotooksidativnog stresa.

Benkhoud i saradnici su nakon 12 mjeseci skladištenja izmjerili vrijednost peroksidnog broja u uzorku flavorizovanom eteričnim uljem origana koja je iznosila $20,15 \pm 1,2$ meq O₂/kg, što je neznatno iznad dozvoljene vrijednosti za ekstradjevičanska maslinova ulja [119]. Ova vrijednost je znatno veća od one dobijene u uzorku EtR₁ ali je potrebno napomenuti da je vremenski interval skladištenja uzorka EtR₁ mnogo kraći i da ukoliko bi se trend rasta u peroksidnom broju ovog uzorka nastavio, očekuje se da bi vrijednosti nakon 12 mjeseci bile približne.

4.5.3 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana na vrijednost peroksidnog broja maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa

Zavisnost promjene peroksidnog broja od vremena za uzorke M₂, EtO₂ i EO₂ prikazana je na grafiku 16.



Grafik 16. Zavisnost promjene peroksidnog broja od vremena za uzorke M₂, EtO₂ i EO₂

U uzorku M₂ vrijednosti peroksidnog broja su iznosile 5,2 meq O₂/kg, 5,5 meq O₂/kg i 5,9 meq O₂/kg nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno. U uzorku EtO₂ vrijednosti peroksidnog broja su iznosile 3 meq O₂/kg, 3,75 meq O₂/kg i 4 meq O₂/kg a u uzorku EO₂ 3 meq O₂/kg, 4,35 meq O₂/kg i 5,1 meq O₂/kg nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno.

Upoređujući vrijednosti peroksidnog broja u uzorcima M₁ i M₂ jasno se vidi dejstvo fotooksidativnog stresa na uzorak M₁ u odnosu na njegov kontrolni uzorak, uzorak M₂ koji se nije nalazio pod dejstvom

fotooksidativnog stresa. Iako nakon prvih 15 dana od dana flavorizacije, uzorci M_1 i M_2 imaju istu vrijednost peroksidnog broja, 5,2 meq O_2/kg , u uzorku M_2 tokom perioda od 15 dana peroksidni broj raste na 5,5 meq O_2/kg , dok u uzorku M_1 njegova vrijednost iznosi 6,75 meq O_2/kg .

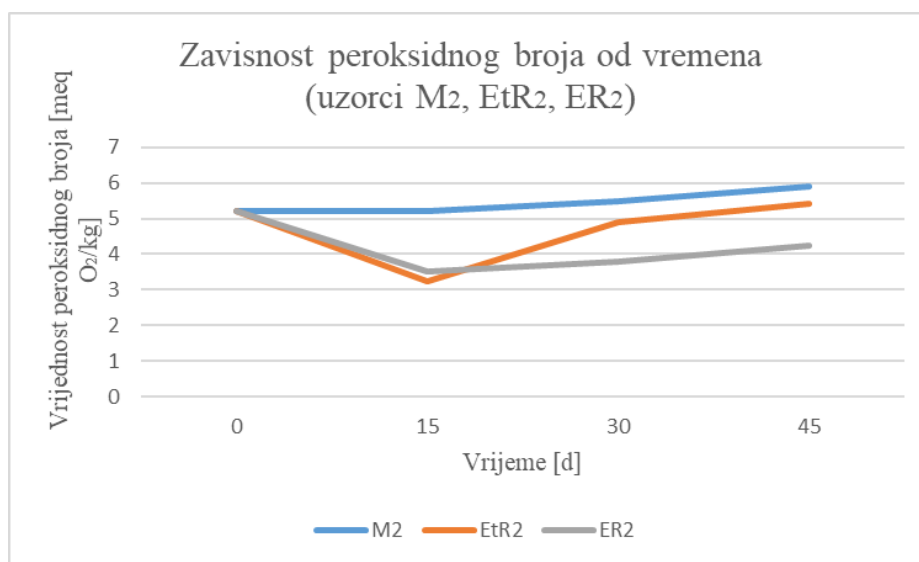
U uzorku EtO_2 , koji je predstavljao kontrolnu grupu za uzorak EtO_1 , peroksidni broj se smanjio nakon dodavanja eteričnog ulja divljeg origana i u periodu od prve do poslednje analize porastao sa 3 meq O_2/kg do 4 meq O_2/kg . Upoređujući ove rezultate sa rezultatima dobijenim za uzorak M_2 , primjetno je da dodatak eteričnog ulja pozitivno utiče na produženje roka trajanja maslinovog ulja kao prehrambenog proizvoda kao i na njegov kvalitet.

Upoređujući vrijednosti peroksidnog broja nakon 45 dana za uzorke EO_1 i EO_2 može se primjetiti da su one veoma blizu što ukazuje na to da pod dejstvom fotooksidativnog stresa ekstrakt divljeg origana pokazuje dobra antioksidativna svojstva i štiti proizvod.

Uzorak maslinovog ulja flavorizovan eteričnim uljem origana koji nije bio izložen dejstvu fotooksidativnog stresa u periodu od 28 dana pokazao je male promjene u vrijednosti peroksidnog broja koja je iznosila 10,63 meq O_2/kg , navode Assensio i saradnici [118]. Ova vrijednost je znatno veća od vrijednosti izmjerene u uzorku EtO_2 ali se nalazi u okviru dozvoljenih parametara.

4.5.4 Uticaj dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina na vrijednost peroksidnog broja maslinovog ulja bez dejstva fotooksidativnog stresa

Zavisnost promjene peroksidnog broja od vremena za uzorke M_2 , EtR_2 i ER_2 prikazana je na grafiku 17.



Grafik 17. Zavisnost promjene peroksidnog broja od vremena za uzorke M_2 , EtR_2 i ER_2

U uzorku EtR₂ vrijednosti peroksidnog broja su iznosile 3,25 meq O₂/kg, 4,9 meq O₂/kg i 5,4 meq O₂/kg a u uzorku ER₂ 3,5 meq O₂/kg, 3,8 meq O₂/kg i 4,25 meq O₂/kg nakon 15, 30 i 45 dana, respektivno.

Nakon dodatka eteričnog ulja i ekstrakta ruzmarina u uzorke EtR₂ i ER₂ došlo je do smanjenja peroksidnog broja. Tokom vremenskog perioda od 45 dana, uzorci EtR₂ i ER₂ su imali manje vrijednosti peroksidnog broja od uzorka M₂ što ukazuje na to da eterično ulje i ekstrakt ruzmarina pozitivno utiču na produženje roka trajanja i kvalitet maslinovog ulja.

4.6 Organoleptička analiza

Dodatak eteričnih ulja i ekstrakata divljeg origana i ruzmarina prema hipotezi treba pozitivno da utiče na senzorna svojstva ekstradjevičanskog maslinovog ulja. U početnom uzorku voćnost je iznosila 4,0 (zelena), gorčina 4,0 a pikantnost 5,0.

U tabeli 3 prikazane su vrijednosti voćnosti, gorčine i pikantnosti za uzorke neflavorizovane uzorke (M₁ i M₂)

Tabela 3. Voćnost, gorčina i pikantnost u uzorcima M₁ i M₂

Uzorak M₁	27.12.2023.	12.01.2024.	27.01.2024.
Voćnost	4,0 (zelena)	4,0 (zelena)	3,8-4,0 (zelena)
Gorčina	4,0	4,2	3,5
Pikantnost	5,5	6	5
Uzorak M₂			
Voćnost	4,0 (zelena)	4,0 (zelena)	4,0 (zelena)
Gorčina	4,0	4,2	3,8
Pikantnost	5,5	6	5,5

Prilikom analize uzorka M₁ nisu primjećene mane. Voćnost u uzorcima M₁ i M₂ je bila gotovo identična.

Kada se upoređuje gorčina, u uzorku M₂ je nakon 45 dana stepen gorčine bio blago uvećan u odnosu na uzorak M₁.

Prilikom analize pikantnosti nema velikih razlika osim nakon 45 dana kada je pikantnost uzorka M₂ uvećana u odnosu na uzorak M₁. Takođe, uzorak M₂ se nakon degustacije osjeća retronazalno, što nije slučaj kod uzorka M₁.

U tabeli 4 prikazane su vrijednosti voćnosti, gorčine i pikantnosti za uzorke flavorizovane eteričnim uljem divljeg origana (EtO₁ i EtO₂).

Tabela 4. Voćnost, gorčina i pikantnost u uzorcima EtO₁ i EtO₂

Uzorak EtO₁	27.12.2023.	12.01.2024.	27.01.2024.
Voćnost	3,6 (zelena)	4,0 (zelena)	3,5 (zelena)
Gorčina	3,1	3,0	2,8
Pikantnost	3,3	3,8	3,6
Uzorak EtO₂			
Voćnost	4,0 (zelena)	4,0 (zelena)	3,8 (zelena)
Gorčina	3,8	3,8	4,0
Pikantnost	5,0	4,0	4,6

Organoleptičkom analizom došlo se do zaključka da je uzorak EtO₁ komercijalno upotrebljiv zbog svog harmoničnog ukusa i da to što se divlji origano blago osjeća pozitivno uticalo na njegova senzorna svojstva. Voćnost uzorka EtO₁ je varirala u intervalu od 3,6 do 4,0, gorčina se smanjila sa 3,3 na 2,8 dok se pikantnost povećala sa 3,3 na 3,6.

U uzorku EtO₂ prisustvo eteričnog ulja divljeg origana je takođe poboljšalo karakteristike ali se ovaj uzorak osjećao blago retronazalno zbog povećane pikantnosti u odnosu na uzorak EtO₁. Voćnost i gorčina su takođe bile uvećane u odnosu na uzorak EtO₁.

Assensio i saradnici vršili su senzornu analizu ekstradjevičanskog maslinovog ulja flavorizovanog eteričnim uljem origana. Ispitivana je voćnost, gorčina i pikantnost kao i negativne karakteristike ulja svakih 21 dan tokom 126 dana skladištenja. Nakon 126 dana, voćnost je iznosila $4,03 \pm 0,25$, gorčina $2,62 \pm 0,2$ a pikantnost $2,73 \pm 0,0$. Početne vrijednosti su iznosile $5,5 \pm 0,13$ za voćnost, $3,67 \pm 0,2$ za gorčinu i $3,72 \pm 0,2$ za pikantnost [84]. Primjećene su male promjene u parametrima što se podudara sa rezultatima dobijenim za EtO₁ i EtO₂.

U tabeli 5 prikazane su vrijednosti voćnosti, gorčine i pikantnosti za uzorke flavorizovane ekstraktom divljeg origana (EO₁ i EO₂).

Tabela 5. Voćnost, gorčina i pikantnost u uzorcima EO₁ i EO₂

Uzorak EO₁	27.12.2023.	12.01.2024.	27.01.2024.
Voćnost	3,5 (zrela)	4,0 (zrela)	3,7 (zrela)
Gorčina	3,3	3,0	2,8
Pikantnost	3,6	3,1	3,0
Uzorak EO₂			
Voćnost	3,2 (zrela)	3,2 (zrela)	3,5 (zrela)
Gorčina	3,7	3,7	3,3

Pikantnost	4,3	4,2	4,2
------------	-----	-----	-----

Prilikom organoleptičke analize uzorka EO₁ primjećeno je da se ekstrakt divljeg origana osjeća blaže od eteričnog ulja divljeg origana dodatog u ekstradjevičansko maslinovo ulje. Uzorak EO₁ svojim karakteristikama je bliži djevičanskom maslinovom ulju nego ekstradjevičanskom maslinovom ulju zbog svoje smanjene pikantnosti u odnosu na druge uzorke. Uzorak EO₂, kontrolni uzorak za uzorak EO₁, zadržao je sve karakteristike ekstradjevičanskog maslinovog ulja i može se koristiti u komercijalne svrhe.

Akçar i Gümüşkesen ispitivali su senzorna svojstva maslinovog ulja flavorizovanog origanom, ljutom papričicom i bosiljkom kao i ekstraktima navedenih biljaka. Cilj istraživanja je bio određivanje koncentracije dodatog agensa sa najboljim senzornim svojstvima. Početne vrijednosti uzoraka prije flavorizacije iznosile su: voćnost 4,0 (zelena), gorčina 4,0 i pikantnost 5,5 [121]. Ove vrijednosti se ne razlikuju od početnih vrijednosti u uzorcima analiziranih za potrebe ovog master rada. Nakon organoleptičke analize, autori su došli do zaključka da je najbolja senzorna svojstva pokazao 20% ekstrakt origana.

U tabeli 6 prikazane su vrijednosti voćnosti, gorčine i pikantnosti za uzorke flavorizovane eteričnim uljem ruzmarina (EtR₁ i EtR₂).

Tabela 6. Voćnost, gorčina i pikantnost u uzorcima EtR₁ i EtR₂

Uzorak EtR₁	27.12.2023.	12.01.2024.	27.01.2024.
Voćnost	3,5 (zelena)	4,2 (zelena)	4,5 (zelena)
Gorčina	4,0	3,6	3,2
Pikantnost	7,0	3,5	4,0
Uzorak EtR₂			
Voćnost	4,0 (zelena)	4,5 (zelena)	4,3 (zelena)
Gorčina	4,0	4,2	4,2
Pikantnost	6,7	5,8	6,0

Prema organoleptičkoj analizi uzorka EtR₁ rađenoj 15 dana od flavorizovanja ekstradjevičanskog maslinovog ulja eteričnim uljem ruzmarina, osjeća se prisustvo ruzmarina nazalno i retronazalno i kroz ukus te eterično ulje ruzmarina prevazilazi note maslinovog ulja (što se može zaključiti po pikantnosti koja iznosi 7). Nakon 30 dana od flavorizovanja, pikantnost se drastično smanjila (vjerovatno kao posledica sedimentacije) i note maslinovog ulja se osjećaju bolje naspram eteričnog ulja ruzmarina.

U uzorku EtR₂, 27.12.2023., tekstura ulja je vodenkasta ali u odnosu na uzorak EtR₁, ruzmarin se blaže osjeća. Nakon 30 dana od dana flavorizovanja, uzorak EtR₂ je pikantan uz dozu gorčine ali boljih opštih karakteristika od uzorka EtR₁.

Kacalova i Jarosova ispitivale su senzorna svojstva maslinovog ulja flavorizovanog eteričnim uljem ruzmarina tokom šest mjeseci skladištenja. Nakon šest mjeseci, voćnost je iznosila $3,99 \pm 2,89$, gorčina $3,44 \pm 2,74$ a pikantnost $3,43 \pm 2,94$ [122]. Posmatrajući vrijednosti dobijene za uzorke EtR₁ i EtR₂ nakon 45 dana, može se primjetiti da su približne.

U tabeli 7 prikazane su vrijednosti voćnosti, gorčine i pikantnosti za uzorke flavorizovane ekstraktom ruzmarina (ER₁ i ER₂).

Tabela 7. Voćnost, gorčina i pikantnost u uzorcima ER₁ i ER₂

Uzorak ER₁	27.12.2023.	12.01.2024.	27.01.2024.
Voćnost	3,8 (zelena)	4,0 (zelena)	4,2 (zelena)
Gorčina	4,0	4,0	3,8
Pikantnost	4,5	4,6	4,5
Uzorak ER₂			
Voćnost	3,8 (zelena)	4,0 (zelena)	4,0 (zelena)
Gorčina	4,4	4,3	3,8
Pikantnost	4,2	4,6	4,0

U uzorku ER₁, voćnost ruzmarina se osjeća slabije u odnosu na uzorak EtR₁. Ekstrakt ruzmarina se osjeća blago retronazalno tokom analize 27.12.2023. Nakon mjesec dana, uzorak ER₁ je harmoničan i izbalansiran.

U uzorku ER₂ osjeća se prisustvo vegetativne vode (jedan od deskriptora) na dan prve analize. Posle treće analize ovog uzorka (27.01.2024.), ulje je izbalansirano i može se primjenjivati u ishrani iako mu tekstura nije dovoljno složena što može biti posledica ostataka vegetativne vode.

Arafat i saradnici su u maslinovo ulje dodali 2% ekstrakt ruzmarina. Organoleptičkom analizom dobijene su sledeće vrijednosti: voćnost $7,0 \pm 0,2$, gorčina $3,5 \pm 0,0$ i pikantnost $2,0 \pm 0,0$ [123]. Poredivši ove vrijednosti sa vrijednostima dobijenim za uzorke ER₁ i ER₂, može se primjetiti da je voćnost ovog uzorka mnogo veća od voćnosti uzoraka ER₁ i ER₂, dok je pikantnost mnogo manja.

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobijenih ispitivanjem uticaja dodatka eteričnih ulja i ekstrakata ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i origana (*Origanum vulgare*) na kvalitet ekstradjevičanskog maslinovog ulja mogu se izvesti sledeći zaključci:

Prilikom analize sadržaja ukupnih fenola nakon 45 dana pod dejstvom fotooksidativnog stresa, najveća koncentracija pronađena je u uzorku flavorizovanim eteričnim uljem ruzmarina (46,8 mg GAE/100g). Zbog visoke koncentracije fenolnih jedinjenja i nakon 45 dana, može se zaključiti da ovaj uzorak pokazuje dobra antioksidativna i fotoprotektivna svojstva. Najmanji sadržaj fenolnih jedinjenja pronađen je u uzorku flavorizovanom eteričnim uljem divljeg origana (16,28 mg GAE/100g). U ovom uzorku zabilježen je najveći pad u sadržaju fenolnih jedinjenja što ukazuje na moguće smanjenje stabilnosti i kvaliteta flavorizovanog maslinovog ulja usled degradacije fenolnih jedinjenja.

Najmanja vrijednost u sadržaju slobodnih masnih kiselina pronađena je u uzorku flavorizovanim ekstraktom divljeg origana (0,16%). Sadržaj SMK u ovom uzorku nije mnogo varirao što ukazuje da je uzorak bio stabilan a kvalitet skoro nepromijenjen. Najveća vrijednost u sadržaju slobodnih masnih kiselina nađena je u uzorcima flavorizovanim ekstraktom ruzmarina i neflavorizovanom uzorku (0,21%). Prisustvo ekstrakta ruzmarina nije pozitivno uticalo na smanjenje sadržaja slobodnih masnih kiselina te se može zaključiti da ekstrakt ruzmarina ne poboljšava kvalitet ulja, prema ovom parametru.

Posmatrajući vrijednosti saponifikacionog broja, najveća vrijednost nađena je u uzorcima flavorizovanim ekstraktom i eteričnim uljem divljeg origana (175 mg KOH/g). Najmanja vrijednost izmjerena je u neflavorizovanom uzorku (140 mg KOH/g). Očekivano je smanjenje saponifikacionog broja ali nakon dodatka eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana, došlo je do povećanja vrijednosti saponifikacionog broja što se objašnjava time da komponente eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana reaguju sa masnim kiselinama u maslinovom ulju i povećavaju saponifikacioni broj. Upoređujući dobijene vrijednosti sa vrijednostima u neflavorizovanom uzorku primjetno je da dodatak eteričnog ulja i ekstrakta divljeg origana pozitivno utiče na kvalitet i stabilizaciju maslinovog ulja.

Vrijednost peroksidnog broja bila je najmanja u uzorku flavorizovanom eteričnim uljem ruzmarina (6 meq O₂/kg). U neflavorizovanom uzorku vrijednost peroksidnog broja je bila najveća (8,5 meq O₂/kg).

Manja vrijednost peroksidnog broja ukazuje na bolji kvalitet maslinovog ulja te se može zaključiti da je prema ovom parametru, najbolja zaštitna svojstva pokazalo eterično ulje ruzmarina.

Organoleptičkom analizom uzoraka primjećeno je povećanje u voćnosti, a smanjenje u gorčini i pikantnosti, što ukazuje na poboljšanje organoleptičkih karakteristika. Najbolja organoleptička svojstva pokazao je uzorak flavorizovan eteričnim uljem divljeg origana koji se može komercijalno upotrebljavati.

Dodatak eteričnih ulja i ekstrakata ruzmarina i divljeg origana doprinio je smanjenju peroksidnog broja i sadržaja slobodnih masnih kiselina koji predstavljaju dva osnovna parametra za procjenu kvaliteta maslinovog ulja. Iako literaturni podaci sugerišu da su najbolja antioksidativna svojstva postignuta u uljima flavorizovanim eteričnim uljem ruzmarina, ovo istraživanje je pokazalo da su uzorci flavorizovani divljim origanom ostvarili bolja antioksidativna ali i organoleptička svojstva. Pored toga, senzorna analiza je pokazala da dodavanje ekstrakata i eteričnih ulja ove dvije biljke stvara složeniji i intenzivniji ukus koji je privlačan za potrošače i komercionalno upotrebljiv. Stabilnost ulja tokom skladištenja takođe je bila poboljšana, čime se produžava njegov rok trajanja i unapređuje kvalitet.

6. LITERATURA

1. Diamond, J. (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418:700-707.
2. Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J., Khadari, B. & Besnard, G. (2012) Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidences from the middle east. *Biological Reviews*, 87: 885-899.
3. Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., El Bakkali, A., Arrigo, N. et al. (2013) The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings. Biological sciences*, 280(1756): 20122833.
4. Green, P. (2002) A Revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 57(1):91-140
5. Baldoni, L., Tosti, N., Claudia, R., Belaj, A., Arcioni, S., Pannelli, G. et al. (2006) Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. *Annals of Botany*, 98(5):935-942
6. Baldoni, L., Pellegrini, M., Mencuccini, M., Angiolillo, A. & Mulas, M. (2000) Genetic relationships among cultivated and wild olives revealed by AFLP markers. *Acta Horticulturae*, 521: 275-284.
7. Camarda, I. & Valsecchi, F. (1983) Alberi e arbusti spontanei della Sardegna (1 ed.) Gallizzi, Sassari, Italia
8. Muzzalupo, I. (2012) Olive germplasm - the olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy. InTech, Rijeka, Croatia
9. Pinney, J., & Polito, V. (1990) Flower initiation in “Manzanillo” olive. *Acta Horticulturae*, 286: 203-206
10. Muzzalupo, I., Perri, E., & Chiappetta, A. (2012) Fruit germplasm characterization: genomics approaches for the valorisation of genetic diversity. In M. Caliskan (Ed.), Genetic Diversity in Plants (pp. 55-86). InTech, Rijeka, Croatia
11. Besnard, G., Terral, J.-F., & Cornille, A. (2018) On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Annals of Botany*, 121(3):385–403
12. Torres, M., Pierantozzi, P., Searles, P., Rousseaux, M. C., García-Inza, G., Miserere, A., et al. (2017) Olive cultivation in the Southern hemisphere: flowering, water requirements and oil quality responses to new crop environments. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1830.

13. Villalobos, F. J., López-Bernal, Á., & García-Tejera, O. T. (2023) Is olive crop modelling ready to assess the impacts of global change? *Frontiers in Plant Science*, 14: 1249793
14. Tubeileh, A., Turkelboom, F., Al-Ibrahim, A., Thomas, R., & Sultan-Tubeileh, K. (2014) Modelling the effects of soil conditions on olive productivity in Mediterranean hilly areas. *International Journal of Agronomy*, 2014(2):1-12
15. Gómez, J. A., Infante-Amate, J., De Molina, M. G., Vanwalleghem, T., Taguas, E. V., & Lorite, I. (2014) Olive cultivation, its impact on soil erosion and its progression into yield impacts in Southern Spain in the past as a key to a future of increasing climate uncertainty. *Agriculture*, 4:170-198
16. Melloni, R. & Cardoso, E. J. (2023) Microbiome associated with olive cultivation: a review. *Plants*, 12(4):897
17. Tadić, J., Dumičić, G., Veršić Bratinčević, M., Vitko, S. & Radić Brkanac, S. (2021) Physiological and biochemical response of wild olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) to salinity. *Frontiers in plant science*, 12: 712005.
18. Espinoza Vidaurre, S., Velásquez Rodríguez, N., Gambetta Quelopana, R., Martinez Valdivia, A., Leo Rossi, E. & Laura De La Cruz, K. (2023) Understanding factors that influence pest risk in olive production. *Sustainability*, 15:16445
19. Nasini, L. & Proietti, P. (2014) Olive ripening. In C. Peri (Ed.), *The extra-virgin olive oil handbook* (pp. 89-105). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, West Sussex
20. Saglam, C., Tuna, Y., Gecgel, U. & Atar, E. S. (2014) Effects of olive harvesting methods on oil quality. *APCBEE Procedia*, 8:334-342.
21. Plasquy, E., Florido, M. D. & Sánchez, A. H. (2021) Effects of a manual harvesting device on the quality of the fermented green olives (cv. Manzanilla). *Research in Agricultural Engineering*, 67(4):164–170
22. Bernardi, B., Falcone, G., Stillitano, T., Benalia, S., Strano, A., Bacenetti, J. & De Luca, A. I. (2018) Harvesting system sustainability in Mediterranean olive cultivation. *Science of the Total Environment*, 625:1446–1458
23. Chetter, I. C., Kent, P. J. & Kester, R. C. (1998) The hand arm vibration syndrome: a review. *Cardiovascular surgery (London, England)*, 6(1):1-9
24. Bovenzi, M. (2005) Health effects of mechanical vibration. *Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia*, 27(1):58-64

25. Cerruto, E., Manetto, G., & Schillaci, G. (2012) Vibration produced by hand-held olive electrical harvesters. *Journal of Agricultural Engineering*, XLIII(12):79-85
26. MONSTAT (2020.) Biljna proizvodnja 2020. godina. Podgorica: Uprava za statistiku (MONSTAT).
27. Lazović, B., Adakalić, M. & Perović, T. (2014) Olive growing in Montenegro – current state and perspectives. *Integrated Protection of Olive Crops*, 108(2014):3-11.
28. Adakalić, M. & Lazović, B. (2018) Morphological, Chemical and Molecular Characterization of ‘Old olive’ (*Olea europaea* L.) from Montenegro . *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61:18170767
29. Ambrosewicz, M., Tańska, M. & Rotkiewicz, D. (2012) Comparison of the quality of two classes of olive oil: Extra virgin and refined oil. *Polish Journal of Natural Science* , 27(2):229-241
30. International Olive Council (IOC) (2019) *TRADE STANDARD APPLYING TO OLIVE OILS. In COI/T.15/NC No 3/Rev. 13.*
31. Conte, L. (2020) The chemistry of olive oil: an endless story. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 27:241-256.
32. Mailer, R. (2006) Chemistry and quality of olive oil. *Primefact*, 227:1-4
33. Köseoğlu, O., Sevim, D. & Kadiroğlu, P., (2016) Quality characteristics and antioxidant properties of Turkish monovarietal olive oils regarding stages of olive ripening. *Food Chemistry*, 212:628-634
34. Beltrán, G., Del Rio, C., Sánchez, S. & Martínez, L., (2004) Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11):3434–3440
35. Prieto, N. Adeseun Adigun, O., Pham, T., Mumtaz, A., Manful, C., Callahan, G. et al. (2018) The effects of cold saponification on the unsaponified fatty acid composition and sensory perception of commercial natural herbal soaps. *Molecules*, 23(9):23-56
36. Romera, S. (2020) Virgin olive oil sensorial analysis and tasting guide - Libro Sommelier Profesional. ESAO - Olive Oil School of Spain, Valencia, Spain
37. Vossen, P. (2007) Olive oil: history, production and characteristics of the world's classic oils. *HortScience*, 42(5):1093–1100
38. Yüksel Aydar, A. (2019) Emerging extraction technologies in olive oil production. (I. Muzzalupo, Ed.) IntechOpen, Rijeka, Croatia

39. Markoč, M. & Krstajić, J. (2024) Conventional and contemporary practices in Montenegrin oliviculture: Relying on tradition heading towards an innovative future. *Agriculture and Forestry*, 70(2):37-47
40. Begum, A., Sandhya, S., Shaffath Ali, S., Vinod, K. R., Reddy, S. & Banji, D. (2013) An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, 12(1):61–73.
41. Borges, R. S., Sánchez Ortiz, B. L., Pereira, A. C., Keita, H., & Tavares Carvalho, J. C. (2019) *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, antiinflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology* 229:29-45.
42. Pawłowska, K., Janda, K., & Jakubczyk, K. (2020) Properties and use of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 66(3):76-82
43. Jovović, Z., Muminović, Š., Baričević, D., & Stešević, D. (2020). Tehnologija proizvodnje ljekovitog, aromatičnog i začinskog bilja (1st ed.). Univerzitet Crne Gore, Podgorica, Crna Gora
44. Lešnik, S., Furlan, V. & Bren, U. (2021) Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): extraction techniques, analytical methods and health-promoting biological effects. *Phytochemistry Review*, 1273-1328
45. González-Minero, F. J.-D., & Ayala-Gómez, A. (2020) *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary): an ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics, *Cosmetics* 7(77):1-17.
46. Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H. & Fourmentin, S. (2015) Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydrate Polymers*, 131(1):264-272.
47. Tawfik, A., Read, P., & Cupett, S. (1998) *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary): in vitro culture, regeneration of plants, and the level of essential oil and monoterpenoid constituents. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants X* 41:349-365, Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg.
48. Sadia, B., Irfan, S. & Bazai, Z. A. (2016) Chemical composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves under salt stress. *Pure Application Biology*, 5(2):355-360
49. Nadeem, M., Imran, M., Gondal, T. A., Imran, A., Shahbaz, M., Amir, R. M. et al. (2019) Therapeutic potential of rosmarinic acid: a comprehensive review. *Applied Sciences*, 9(15):3139

50. Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.-J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.-J. et al. (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32(1):63-68
51. Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Pastuszka, M., Bienias, W. & Kowalczyk, E. (2013) The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*, 18(8):9334-9351
52. Bendeddouche, M. S., Benhassaini, H., Hazem, Z. & Romane, A. (2011) Essential oil analysis and antibacterial activity of *Rosmarinus tournefortii* from Algeria. *Natural product communications*, 6(10):1511-1514
53. Senanayake, J. (2018) Rosemary extract as a natural source of bioactive compounds. *Journal of Food Bioactives*, 2(2):51-57.
54. O'Neil, E., Den Hartogh, D., Azizi, K. & Tsiani, E. (2020) Anticancer properties of carnosol: A summary of in vitro and in vivo evidence. *Antioxidants*, 9(10):961
55. Loussouarn, M., Krieger-Liszkay, A., Svilar, L., Krieger-Liszkay, A., Birtić, S. & Havaux, M. (2017) Carnosic acid and carnosol, two major antioxidants of rosemary, act through different mechanisms. *Plant Psychology*, 175(3):1381–1394
56. Kuhlmann, A. & Röhl, C. (2006) Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro cultures of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia. *Pharmaceutical Biology*, 44(6):401-410
57. Dhouibi, N., Manuguerra, S., Arena, R., Messina, C. M., Santulli, A. & Kacem, S. E. (2023) Impact of the extraction method on the chemical composition and antioxidant potency of *Rosmarinus officinalis* L. extracts. *Metabolites*, 13(2):290
58. Christopoulou, S., Androutopoulou, C., Hahalis, P., Kotsalou, C., Vantarakis, A. & Lamari, F. N. (2021) Rosemary extract and essential oil as drink ingredients: an evaluation of their chemical composition, genotoxicity, antimicrobial, antiviral and antioxidant properties. *Foods*, 10(12):3143
59. Blank, D. E., Alves, G. H., Nascente, P. d., Freitag, R. A., & Cleff, M. B. (2020) Bioactive compounds and antifungal activities. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 9:85-96
60. Alekseeva, M., Zagorcheva, T., Atanasov, I. & Rusanov, K. (2020) *Origanum vulgare* L. – a review on genetic diversity, cultivation, biological activities and perspectives for molecular breeding. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(6):1183–1197

61. Solanki, J., Khanpara, P., Tilva, T., & Faldu, S. (2023) A review on miracle plant oregano. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 12(20):271-303
62. Kokkini, S. (1997) Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In S. Pabulosi (Ed.), *Oregano* (pp. 2-12), Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, International Plant Genetic Resources Institute, 8-12 May 1996, Bari, Italy
63. Soltani, S., Shakeri, A., Iranshahi, M. & Boozari, M. (2021) A review of the phytochemistry and antimicrobial properties of *Origanum vulgare* L. and subspecies. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20(2):268-285
64. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N., & al., e. (2013) Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11):2707-2714
65. Escobar, A., Perez, M., Romanelli, G. & Blustein, G. (2020) Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12):9243-9269
66. Heydari, A., Hadiad, J., Esmaeili, H., Kanani, M., Mirjalili, M. & Sarkhosh, A. (2019) Introduction of *Thymus daenensis* into cultivation: Analysis of agro-morphological, phytochemical and genetic diversity of cultivated clones. *Industrial Crops and Products*, 31:14-24
67. Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. Z., Contreras, M. et al. (2018) Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32:1675–1687
68. Gandova, V., Lazarov, A., Fidan, H., Dimov, M., Stankov, S., Denev, P., & al., e. (2023) Physicochemical and biological properties of carvacrol. *Open Chemistry*, 21(1):20220319
69. Nezhadali, A., Nabavi, M., Rajabian, M., Akbarpour, M., Pourali, P. & Amini, F. (2014) Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2):87-92f
70. Blank, D. E., de Oliveira Hübner, S., Alves, G. H., Cardoso, C. A., Freitag, R. A. & Cleff, M. B. (2019) Chemical composition and antiviral effect of extracts of *Origanum vulgare*, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 10:188-196
71. Zaman, A., Hasnat, H., Al Noman, Z., Islam, M., Al Nakib, A., Mukherjee, S. et al. (2023) Exploring pharmacological potentials of p-coumaric acid: A prospective phytochemical for drug discovery, *Bangladesh Pharmaceutical Journal* , 26(2):185-194

72. Blank, D., Correa, R., Freitag, R., Cleff, M. & Hubner, S. (2017) Anti-equine arteritis virus activity of ethanolic extract and compounds from *Origanum vulgare*, 4th Brazilian Conference on Natural Products, Belém, Brasil
73. Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. & Shekar, H. (2012) Oxidative stress and human health, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(7A): 997-1019
74. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19):7879-7885
75. Munné-Bosch, S. & Alegre, L. (2001) Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary, *Plant Physiology*, 125(2):1094–1102
76. Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R. & Löliger, J. (1992) Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid, *Xenobiotica*, 22(2):257–268
77. Hopia, A., Huang, S., Schwarz, K., German, G., & Frankel, E. (1996) Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44(8):2030-2036.
78. Huang, S., Frankel, E., Schwarz, K., Aeschbach, R., & German, J. (1996) Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44(10):2951-2956
79. Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. M. & Raneva, V. G. (1999) Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, *Food Chemistry*, 64:59-66
80. Basavegowda, N. & Baek, K.-H. (2021) Synergistic antioxidant and antibacterial advantages of essential oils for food packaging applications, *Biomolecules*, 11(9):1267
81. Cömert, E. D. & Gökmen, V. (2018) Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century, *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 105:76-93
82. Fadda, A., Sanna, D., Sakar, E., Gharby, S., Mulas, M., Medda, S. et al. (2022) Innovative and sustainable technologies to enhance the oxidative stability of vegetable oils, *Sustainability*, 14(2):849
83. Konfo, T., Djouhou, F., Alain Koudoro, Y., Dahouenon-Ahoussi, E., Avlessi, F., Sohounhloue, C., & Simal-Gandara, J. (2023) Essential oils as natural antioxidants for the control of food preservation, *Food Chemistry Advances*, 2: 100312

84. Asensio, C., Nepote, V. & Grosso, N. (2012) Sensory attribute preservation in extra virgin olive oil with addition of oregano essential oil as natural antioxidant, *Journal of food science*, 77(9):294–301
85. Kačániová, M., Terentjeva, M., Vuković, N., Puchalski, C., Roychoudhury, S., Kunová, S. et al. (2017) The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(8):1108-1116
86. Prakash, B., Singh, P., Yadav, S., Singh, S. & Dubey, N. (2013) Safety profile assessment and efficacy of chemically characterized *Cinnamomum glaucescens* essential oil against storage fungi, insect, aflatoxin secretion and as antioxidant, *Food and Chemical Toxicology*, 53:160-167
87. Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E. & Mortazavian, A. (2018). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45:62-72.
88. Al-Maqtari, Q., Al-Ansi, W., Mahdi, A. A., Al-Gheethi, A. A., Mushtaq, B. S. & Al-Adeeb, A. (2021) Supercritical fluid extraction of four aromatic herbs and assessment of the volatile compositions, bioactive compounds, antibacterial, and anti-biofilm activity, *Environmental science and pollution research international*, 28(20):25479–25492
89. Al-Maqtari, Q., Mahdi, A., Al Ansi, W., Mohammed, J., M., W., Yao, W. et al (2020) Evaluation of bioactive compounds and antibacterial activity of *Pulicaria jaubertii* extract obtained by supercritical and conventional methods, *Food Measure*, 15:449–456
90. Al-Maqtari, Q., Rehman, A., Mahdi, A., Al-Ansi, W., Wei, M., Yanyu, Z. et al. (2022) Application of essential oils as preservatives in food systems: challenges and future perspectives – a review, *Phytochemistry Review*, 21:1209–1246
91. Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. & Hernández-Carlos, B. (2019) Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism, *Antioxidants*, 10:1-29
92. Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P. et al. (2011) Tackling antibiotic resistance *Nature reviews Microbiology*, 9:894–896
93. Wagner, H. & Ulrich-Merzenich, G. (2009) Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals, *Phytomedicine* , 16:97-110
94. Bassolé, I., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J. et al. (2010) Composition and antimicrobial activities of *Lippia multi-flora* Moldenke, *Mentha piperita* L. and *Ocimum basilicum*, *Molecules*, 15:7825–7839

95. García-García, R., López-Malo, A. & Palou, E. (2011) Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*, *Journal of Food Sciences*, 76:95-100
96. Hossain, F., Follett, P., Dang Vu, K., Harich, M., Salmieri, S. & Lacroix, M. (2016) Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food, *Food Microbiology*, 53:24–30.
97. Stevic, T., Beric, T., Savikin, K., Sokovic, M., Gocevac, D., Dimkic, I. & Stankovic, S. (2014) Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant, *Industrial Crops and Products*, 55: 116–122
98. Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation, *Journal of Food Science*, 79(7):1231-1249
99. Ramos, C., dos Santos, D. N., Claudino, L. L., de Albuquerque, J. P., & Silva, M. F. (2022) Use of hydrodistillation to obtain and fractionate essential oils simultaneously, *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, 9(37):72-83
100. Marković, M. (2018) Frakciona hidrodestilacija i rektifikacija etarskog ulja kleke (*Juniperus communis* L.). doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija
101. Fagbemi, K., Aina, D. & Olajuyigbe, O. (2021) Soxhlet extraction versus hydrodistillation using the cleverger apparatus: A comparative study on the extraction of a volatile compound from *Tamarindus indica* seeds, *The Scientific World Journal* , 2:1-8
102. Patel, K., Panchal, N., & Ingle, P. (2019). Review of extraction techniques; Extraction methods: microwave, ultrasonic, pressurized fluid, Soxhlet extraction, etc, *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 6(3):6-21
103. Sena, S., Dantas, T., & Pereira, C. (2018) Extracts from *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* L. obtained by different separation processes: Global yield and functional profile, Islamic Azad University, Shahrood Branch Press, Sharood, Iran
104. Zengin, G., Cvetanović, A., Gašić, U., Dragičević, M., Stupar, A., Uysal, A. et al. (2020) UHPLC-LTQ OrbiTrap MS analysis and biological properties of *Origanum vulgare* subsp. *viridulum* obtained by different extraction methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154:112747

105. Khadhraoui, B., Ummat, V., Tiwari, B., Fabiano-Tixier, A., & Chemat, F. (2021) Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products, *Ultrasonics Sonochemistry*, 76:105625
106. Weggler, B. A., Gruber, B., Teehan, P., Jaramillo, R. & Dorman, F. (2020) Inlets and sampling, *Separation Science and Technology*, 12:141-203
107. Pérez, M., Dominguez-López, I. & Lamuela-Raventós, R. (2023) The chemistry behind the Folin–Ciocalteu method for the estimation of (poly)phenol content in food: total phenolic intake in a Mediterranean dietary pattern, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71:17543-17553.
108. Blainski, A., Lopes, G. & Palazzo de Mello, J. (2013) Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L., *Molecules*, 18(6):6852-6865
109. Čorbo, S., & Đorđević, Đ. (2010) Promjene ukupnog sadržaja fenola u maslinovom ulju tokom skladištenja, *Uljarstvo*, 41(1-2):7-12.
110. Cobzaru, A., Bordeianu, G., Apostolescu, G., Marinoiu, A. & Cernatescu, C. (2016) Quality evaluation of the olive oil during storage, *Revue Roumaine de Chimie* , 61(8-9):705-710
111. Stepanyan, V., Arnous, A., Petrakis, C., Kefalas, P. & Calokerinos, A. (2005) Chemiluminescent evaluation of peroxide value in olive oil, *Talanta*, 65(4):1056-1058.
112. Saad, B., Wai, W. T., Lim, B. P. & Saleh, M. I. (2006) Flow injection determination of peroxide value in edible oils using triiodide detector, *Analytica Chimica Acta*, 565(2):261-270.
113. Ait Taleb, S., Boutoial, K., Kzaiber, F. & Oussama, A. (2016) Effect of aromatization on physicochemical, sensorial and oxidative stability of oil, *International Journal of Chemical, Material and Environmental Research*, 3(4):73-77.
114. Barreca, S., La Bella, S., Maggio, A., Licata, M., Buscemi, S. & Leto, C. E. (2021) Flavouring extra-virgin olive oil with aromatic and medicinal plants essential oils stabilizes oleic acid composition during photo-oxidative stress, *Agriculture* , 11(266):1-14.

115. Baiano, A., Terracone, C., Gambacorta, G., & La Notte, E. (2009) Changes in quality indices, phenolic content, and antioxidant activity of flavored olive oils during storage, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(11):1083–1092
116. Mulagić, A., Begić, M., Čorbo, S., Ašimović, Z., Gavrić, T. & Vujasinović, V. (2020) The influence of essential oils on the quality and stability of olive oil, In M. Brka (Ed.). (pp. 33-44). CE-Food 2020, 10th Central European Congress on Food
117. da Cruz A.C. S., de Cunha I.S.B., da Silva L.M.S.X., Gonzalez A.R.A., Santos L.F.P., Leal I.L. et al. (2022) Olive oils flavored by essential oils: a comparison between physicochemical and sensorial analyses to attend different consumer profiles, *Research, Society and Development*, 11(5): e6411527912
118. Asensio, C. M., Nepote, V., & Grosso, N. R. (2011). Chemical stability of extra-virgin olive oil added with oregano essential oil. *Journal of Food Science*, 76(7):445-450
119. Benkhoud H., M'Rabet Y., Gara ali M., Mezni M., Hosni K.(2021) Essential oils as flavoring and preservative agents: Impact on volatile profile, sensory attributes, and the oxidative stability of flavored extra virgin olive oil, *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(4):00:e15379
120. Méndez, A. & Falqué, E. (2007) Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil, *Food Control*, 18(5):521-529.
121. Akçar H.H. & Aytac G. (2011) Sensory evaluation of flavoured extra virgin olive oil, *GIDA / The Journal of Food*, 36(5): 249-25
122. Kacalova, T. & Jarosova, A. (2023) How storage time affects sensory, chemical, and physical characteristics of flavored olive oil, *Food science & nutrition*, 11(10):6648–6659.
123. Arafat, S. M., Basuny, A. M., Awad-Allah, M. M. A., Abdein, M. A., & Hikal, D. M. (2023), Quality indices, phenolic compounds, and sensory evaluation of flavored olive oil, *Journal of Oleo Science*, 72(4):369-377