

# Povezanost fenolnog sastava lista masline i prihrane sadnica cinkom u hidroponskom uzgoju

---

Otočan, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:804405>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Petra Otočan

**POVEZANOST FENOLNOG SASTAVA LISTA MASLINE I PRIHRANE SADNICA  
CINKOM U HIDROPONSKOM UZGOJU**

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Petra Otočan

**POVEZANOST FENOLNOG SASTAVA LISTA MASLINE I PRIHRANE SADNICA  
CINKOM U HIDROPONSKOM UZGOJU**

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

**Mentor rada:** doc. dr. sc. Valerija Majetić Germek, dipl. sanit. ing.

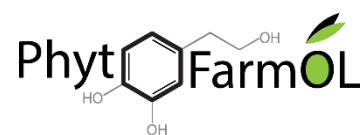
Diplomski rad obranjen je dana **6. srpnja 2020.** godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica, dipl. ing. bioteh.
2. prof. dr. sc. Olivera Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh.
3. doc. dr. sc. Valerija Majetić Germek, dipl. sanit. ing.

Rad ima 44 stranica, 19 slika, 6 tablica, 50 literaturnih navoda.

Istraživanje je provedeno u sklopu uspostavno istraživačkog projekta „Bilinogojstvom do sekundarnih biljnih metabolita: primjena mineralnih hraniva i elicitora za povećanje koncentracije fenola u listu masline“ (UIP-2017-05-8464; *Phytofarmol*) financiranog od Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču, Katedri za tehnologiju i kontrolu namirnica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i na Odsjeku za zajedničke analitičke tehnike Zdravstveno-ekološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.



## **Zahvale**

*Prvenstveno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Valeriji Majetić Germek, dipl. sanit. ing. na mentorstvu pri izradi diplomskog rada. Također joj se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, susretljivosti, prenesenom znanju, bezbrojnim savjetima i posvećenom vremenu i trudu u cijelom razdoblju pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Igoru Paskoviću, dipl. ing. agr. voditelju projekta Phytofarmol na osiguranim uzorcima maslinovog lišća za ovo istraživanje i pruženoj prilici za izradu diplomskog rada u sklopu spomenutog projekta kao i gostoprimstvu na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču.*

*Posebno se zahvaljujem Kristini Grozić, mag. ing. agr. s Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču na prenesenom znanju, savjetima, novim informacijama i posvećenom trudu u svako doba, tijekom izrade diplomskog rada. Također joj se zahvaljujem što mi je omogućila da se na Institutu osjećam kao dio njihovog tima i što se brinula o meni kada je bilo najmanje izdržljivije u plasteniku za vrijeme vrućih ljetnih dana. Hvala na predivnom iskustvu.*

*Zahvaljujem se Šimi Marčeliću, mag. ing. agr. na savjetima, prenesenom znanju o maslinama kao i brizi za vrijeme boravka u stakleniku. Hvala na ugodnom društvu u plasteniku.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Oliveri Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh. i Bojani Lukić, mag. sanit. ing., na svim dobronamjernim savjetima, podršci, strpljenju i angažiranosti tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Pauli Žurga, dipl. ing. biotehn. s Odsjeka za zajedničke analitičke tehnike Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ što nam je omogućila provedbu analiza fenolnih tvari tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima i sestri na uzajamnoj pomoći i podršci tijekom cjelokupnog studiranja.*

# **Povezanost fenolnog sastava lista masline i prihrane sadnica cinkom u hidroponskom uzgoju**

## **SAŽETAK**

U radu je ispitan utjecaj prihrane s višestruko povećanom koncentracijom cinka na fenolni sastav lista maslina uzgojenih u hidroponskom sustavu tijekom deset mjeseci. Pokus je proveden u plasteniku na jednogodišnjim sadnicama masline sorte Istarska bjelica. Sadnice su prihranjivane standardnom Hoaglandovom hranjivom otopinom bez cinka (0  $\mu\text{M}$ ) i hranjivom otopinom koja je imala povećanu koncentraciju cinka (32  $\mu\text{M}$ ). Analiza fenolnog sastava lišća provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s UV-VIS detekcijom. Prihrana s višestruko povećanom koncentracijom cinka rezultirala je statistički značajno većim vegetativnim prirastom sadnica maslina i povećanjem ukupnih identificiranih fenolnih tvari u lišću, za 48% odnosno 30% u odnosu na sadnice sa prihranom bez cinka. Lišće maslina tretirano hranjivom otopinom s povećanom koncentracijom cinka sadržavalo je 1,5 puta veći maseni udio oleuropeina te 1,3 puta više luteolin-7-*O*-glukozida u odnosu na sadnice koje su bile na prihrani bez cinka. Prihranom masline cinkom dobiveno je lišće veće prehrambene vrijednosti tj. bogatije fenolnim tvarima, osobito oleuropeinom.

**Ključne riječi:** maslinovo lišće, hidroponski sustav uzgoja, cink, fenolne tvari, HPLC-UV/VIS

# **Relationship of leaf phenolic composition and zinc fertilization of olive plantlets in hydroponic system**

## **SUMMARY**

In this thesis, the effect of fertilization with a multiply increased zinc concentration on olive plantlets leaf phenolic composition in the hydroponic system during a 10-months period has been investigated. The experiment was conducted in a greenhouse with one-year old olive plantlets of the olive cultivar Istarska bjelica. Olive plantlets were grown in the Hoagland nutrient solution with omission of zinc (0  $\mu\text{M}$ ) and nutrient solution with increased zinc concentration (32  $\mu\text{M}$ ). The phenolic composition of olive leaves was determined by high performance liquid chromatography with a UV/VIS detector. In zinc treated olive plantlets, vegetative growth and total identified phenols increased statistically significantly, by 48% and by 30% respectively, in relation to olive plantlets without zinc fertilization. Furthermore, olive leaf treated with a nutrient solution with a multiply increased zinc concentration contained 1.5-fold higher mass fraction of oleuropein and 1.3-fold higher luteolin-7-*O*-glucoside compared to olive plantlets with omission of zinc. Fertilization treatment with zinc resulted in higher nutritional values of leaves due to higher amounts of phenols, especially of oleuropein.

**Key words:** olive leaves, hydroponic cultivation system, zinc, phenols, HPLC-UV/VIS



## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Uvod .....	1
1.2. Hidroponski sustavi uzgoja .....	2
1.2.1. Tipovi hidroponskog uzgoja .....	2
1.2.2. Prednosti i nedostaci hidroponskog uzgoja.....	4
1.3. Potreba za hranjivima kod masline.....	5
1.4. Uloga cinka u biljkama i maslini .....	6
1.5. Posljedice nedostatka cinka kod masline.....	6
1.6. Utjecaj cinka na biosintezu fenolnih spojeva .....	7
1.7. Fenolni spojevi maslinovog lišća .....	8
1.7.1. Zdravstveni učinci fenolnih spojeva maslinovog lišća .....	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Uzorci maslinovog lišća.....	13
3.1.2. Kemikalije i standardi .....	14
3.1.3. Uređaji i pribor.....	15
3.2. METODE.....	16
3.2.1. Hidroponski uzgoj sadnica maslina .....	16
3.2.2. Uzorkovanje maslinovog lišća .....	18
3.2.3. Priprema uzoraka maslinovog lišća .....	19
3.2.4. Ekstrakcija fenolnih tvari iz maslinovog lišća .....	21
3.2.5. Određivanje sastava fenola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ..	22
3.2.6. Statistička obrada rezultata .....	24
4. REZULTATI.....	25
4.1. Rezultati vegetativnog prirasta sadnica masline kod prihrane cinkom .....	25
4.2. Fenolni sastav lišća od sadnica prihranjivanih cinkom .....	26

5. RASPRAVA .....	31
6. ZAKLJUČCI.....	35
7. LITERATURA .....	36
PRILOZI.....	40
POPIS SLIKA .....	43
POPIS TABLICA.....	44
ŽIVOTOPIS .....	45

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. Uvod

Maslina (*Olea europaea* L.) je jedna od najstarijih kultura koja pripada zimzelenom drveću. Porijeklom je iz Male Azije odakle se proširila Mediteranom i afričkim zemljama Mediterana. Stolne masline i maslinovo ulje najreprezentativnije su namirnice tradicionalne mediteranske prehrane. Prilikom njihove proizvodnje nastaju znatne količine otpada poput komine s košticama te maslinovo lišće, koji zahtijevaju adekvatno zbrinjavanje ili obradu. Biološka i prehrambena vrijednost te karakterizacija biološki aktivnih spojeva iz ovih otpadnih materijala predmet je istraživanja novijih znanstvenih studija (Molina-Alcaide i Yáñez-Ruiz, 2008; Rahmanian i sur., 2015; Peršurić i sur., 2019). Maslinovo lišće zbog visokog udjela biološki aktivnih tvari, osobito fenolnih tvari sa snažnim antioksidacijskim djelovanjem, ima veliki potencijal za iskorištavanje u prehrani ljudi i životinja.

Fenolne tvari su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju tijekom normalnog razvoja biljnih tkiva te uslijed izloženosti biljke nekom stresu (abiotički ili biotički čimbenici). Sadržaj fenola u listu masline može se povećati poljoprivrednom praksom tj. odgovarajućom gnojidbom. U dosadašnjim istraživanjima uglavnom je primjenjivana folijarna prihrana maslina odabranim nutrijentima (Del Rio i sur., 2003; Pasković i sur., 2019; Tekaya i sur. 2016).

Hidropon je inovativna tehnika uzgoja u kojoj se primjenjuju otopine hranjivih tvari koje su potrebne za normalan rast i razvoj biljke (Lee i Lee, 2015). Takvi sustavi osim što omogućuju uzgoj tijekom cijele godine, omogućuju i lako doziranje različitih hranjivih tvari te istraživanje suviška ili nedostatka pojedinih hranjiva kod odabrane poljoprivredne kulture. Stoga su u ovom radu sadnice maslina posađene u hidroponski sustav s inertnim supstratom u svrhu istraživanja utjecaja nedostatka i povećane koncentracije cinka u hranjivoj otopini na fenolni sastav lista masline. Cink je esencijalni mikroelement za rast biljke te ima važnu ulogu

u biljnom metabolizmu budući da utječe na aktivnost enzima uključenih u metabolizam ugljikohidrata, sintezu bjelančevina i formiranje peludi (Hafeez i sur., 2013).

## **1.2. Hidroponski sustavi uzgoja**

Hidroponski sustav podrazumijeva uzgoj biljaka u zaštićenom prostoru na inertnom supstratu, uglavnom neorganskog (pijesak, granitni šljunak) ili u manjoj količini organskog (treset, piljevina) podrijetla (Lee i Lee, 2015). Hidroponske tehnike uzgoja biljaka počele su se primjenjivati krajem 1920-ih godina u SAD-u, te je takva vrsta proizvodnje omogućila veće prinose i kvalitetu proizvoda (Brentlinger, 2007). Najčešće se upotrebljavaju za komercijalnu proizvodnju povrća kao što su rajčica, salata, špinat, jagode, krastavci, paprika ili kupus (Nichols, 2006.). No, istodobno raste i interes za istraživanja koje se bave poboljšavanjem produktivnosti usjeva i rješavanjem ograničenja hidroponskih sustava.

### **1.2.1. Tipovi hidroponskog uzgoja**

Razlikuju se šest osnovnih tipova hidroponskog uzgoja, kod nekih se koristi čvrsti supstrat a kod nekih ne (Slika 1, Lee i Lee, 2015).

a) **Kapilarni hidroponski uzgoj** (*engl. wick system*) je najjednostavniji oblik u kojem se voda ili hranjiva otopina kapilarno prenosi putem materijala koji može apsorbirati i transportirati vodu do korijena. Koristi se za uzgoj biljaka koje zahtijevaju male količine vode i hranjive otopine poput sobnih biljaka (Lee i Lee, 2015).

b) **Kapajući sistem** (*engl. drip system*) je najčešće korišteni tip hidroponskog uzgoja, a upotrebljava se za uzgoj plodonosnog povrća. Hranjiva otopina i voda isporučuju se biljci pomoću vodene pumpe u određeno vrijeme. Ovisno o ponovnom korištenju hranjive otopine postoje dva modela. U zatvorenom sustavu hranjiva se otopina sakuplja i vraća u rezervoar te

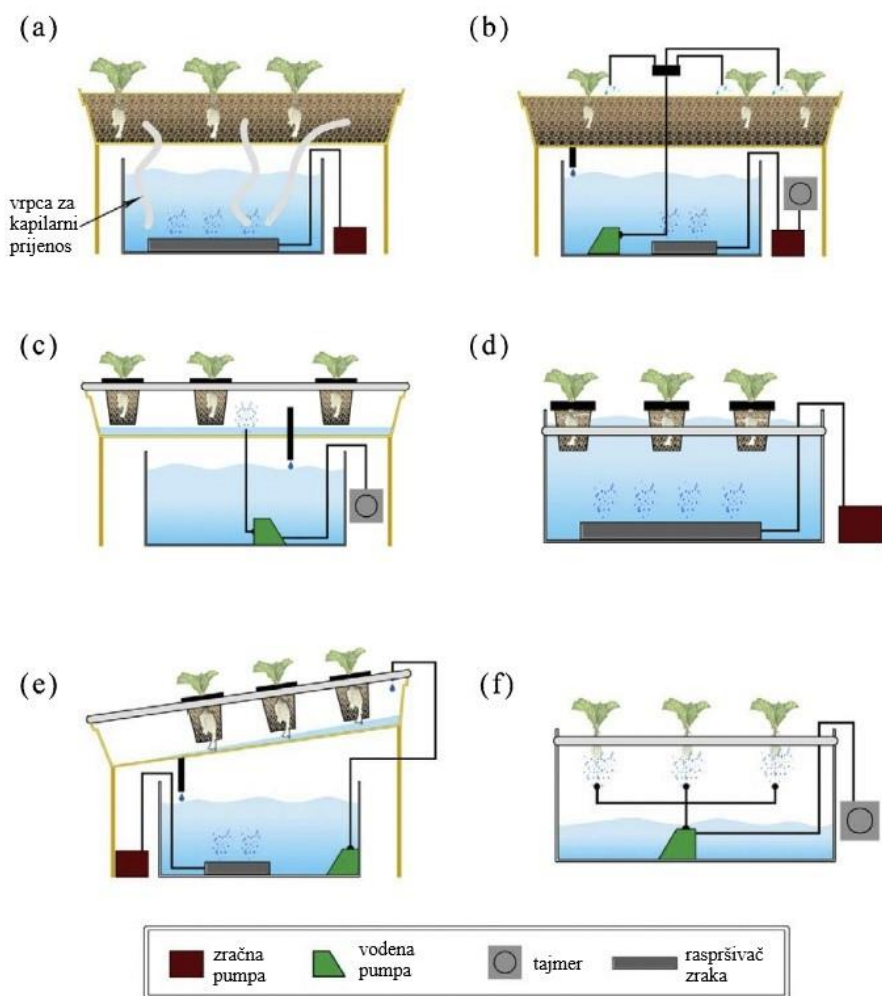
ponovo recirkulira, dok se u otvorenom sustavu hranjiva otopina ne koristi ponovno (Lee i Lee, 2015).

c) **Sistem oseke i plime** (engl. *ebb and flow system*) je zatvoreni sustav u kojem se uzgojna posuda povremeno puni hranjivom otopinom ili vodom uz pomoć vodene crpke te se nakon određenog vremena ista otopina vraća u spremnik. Može se koristiti za uzgoj više vrsta biljaka, a nedostatak je mogućnost razvoja bolesti korijena i rast algi u sustavu (Lee i Lee, 2015).

d) **Sustav vodene kulture** (engl. *deep water culture system*) se sastoji od vodenog bazena, zračne crpke i plutajuće podloge na koju su pričvršćene biljke s korijenjem stalno uronjenim u vodu ili hranjivu otopinu. Putem zračne crpke kontinuirano se doprema kisik do korijena biljke. Problem ovog sustava je svakodnevna promjena pH, temperature i sastava otopine što može negativno djelovati na rast biljke (Lee i Lee, 2015).

e) **Tehnika hranjivog filma** (engl. *nutrient film technique system*) neprekidno biljkama osigurava hranjive tvari uz dopremu kisika putem zračnih crpki. Biljke rastu u rupičastim posudama, a njihovo je korijenje u dodiru s vodom i hranjivom otopinom koje cirkuliraju kroz uzgojnu posudu postavljenu pod nagibom. Zbog stalne uronjenosti u vodu korijenje je podložno gljivičnim infekcijama (Lee i Lee, 2015).

f) **Aeroponski uzgoj** (engl. *aeroponic system*) omogućuje da se pomoću vodene pumpe i visokotlačne prskalice s mlaznicom voda ili hranjiva otopina raspršuju oko korijena i osiguravaju biljkama hranjiva obogaćena kisikom. Neprekidno izlaganje korijena kisiku daje bolje rezultate u odnosu na uzgoj sa supstratom (Lee i Lee, 2015).



**Slika 1.** Osnovni tipovi hidroponskog uzgoja (a) kapilarni hidroponski uzgoj (b) kapajući sistem (c) sistem oseke i plime (d) sustav vodene kulture (e) tehnika hranjivog filma (f) aeroponski uzgoj (Lee i Lee, 2015).

### 1.2.2. Prednosti i nedostaci hidroponskog uzgoja

U odnosu na kultivaciju u tlu, automatizirani hidroponski sustav pokazuje mnoge prednosti. Zatvoreni hidroponski sustav olakšava kontrolu uvjeta rasta uključujući temperaturu, pH, brzinu protoka vode i hranjivih tvari, relativnu vlažnosti te izloženosti svjetlu. Omogućuje kultivaciju tijekom cijele godine neovisno o klimatskim uvjetima (Manzocco i sur., 2011) te je smanjena upotreba pesticida, budući da je izbjegnuta pojava bolesti karakterističnih za biljke uzgojene na tlu.

Glavni problemi hidroponskog uzgoja su visoki početni troškovi postavljanja, velike količine otpadnih tvari, visoki zahtjevi za održavanje i pojava biofilma u sustavu (Lee i Lee,

2015). Ukoliko mikroorganizmi kao što su gljivice iz porodice *Verticillium*, *Pythium* i *Fusarium* kontaminiraju otopine ili usjeve, s vremenom se mogu brzo proširiti kroz čitav sustav i naposljetku uništiti cijeli uzgoj (Ikeda i sur., 2002). Unatoč nedostacima, Putra i Yuliando (2015) navode da bi se ovakav oblik uzgoja trebao intenzivnije uvoditi u poljoprivrednu praksu, naročito na područjima s klimatskim i pedološkim ograničenjima te u ekološkoj proizvodnji.

### **1.3. Potreba za hranjivima kod masline**

Masline su izdržljive biljke koje mogu tolerirati siromašne uvjete uzgoja, posebno siromašnu plodnost, za razliku od neke druge voćke. Unatoč tome potrebno je stalno pratiti mineralni status masline i održavati uravnoteženu ishranu mineralnim tvarima kako bi biljka mogla obavljati osnovne funkcije vegetativnog rasta i reproduktivnog razvoja (Carvalho i sur., 2013). Pretpostavlja se da nutritivni status biljke može utjecati na otpornost biljke na biotičke i abiotičke čimbenike. Iako ta povezanost nije u potpunosti istražena, osobito kod drvenastih biljaka, općenito se smatra da adekvatan nutritivni status za rast biljaka je optimalan i za otpornost biljke na ove učinke (Fernández-Escobar, 2019).

Za procjenu nutritivnog statusa biljke koristi se pregled biljke s ciljem utvrđivanja prisutnosti vizualnih simptoma deficijencije, te kemijska analiza tla, vode i listova (Haifa Group, 2019). Trenutno najbolja dostupna metoda za dijagnosticiranje nutritivnog statusa biljke i potrebe za gnojidbom je kemijska analiza listova maslina.

Godišnjom rezidbom stabala masline dolazi do velikog gubitka biomase te je važna nadoknada odgovarajućom gnojidbom. Souza i sur. (2019) utvrdili su da je nedostatak bora, kalcija i dušika je značajno ograničio rast masline. Provedenim istraživanjem utvrdili su sljedeći redoslijed nutritivnih potreba za rast maslina: bor > dušik > kalcij > fosfor > željezo > kalij > magnezij > cink > sumpor.

#### **1.4. Uloga cinka u biljkama i maslini**

Cink je esencijalni mikroelement za biljke budući da je sastavni dio enzima i proteina koji sudjeluju u mnogim biokemijskim reakcijama. Osim strukturne uloge u enzimima, ima i katalitičku aktivnost za pravilno odvijanje enzimskih procesa. Sadržaj cinka u biljkama je uglavnom nizak i ovisi o biljnoj vrsti. Potrebe masline za cinkom su zadovoljene ako je udio cinka veći od 10 mg/kg suhe tvari u lišću (Fernandez-Escobar i sur., 2019). Pokretljivost cinka u biljci je osrednja te se u značajnim količinama nakuplja u korijenu od kuda se slabo prenosi u gornje dijelove biljke.

Biljke ga usvajaju u obliku dvovalentnog ( $Zn^{2+}$ ) ili monovalentnog kationa ( $ZnOH^+$ ) te cinkovih kelata, dok se u biljci uvijek nalazi u kationskom obliku  $Zn^{2+}$  (Meharg, 2012). Transportira se putem floema, transportnog tkiva u vaskularnim biljkama kao slobodni kation ili vezan s organskim kiselinama. Cink je jedini biogeni metal koji je prisutan u svih šest enzimskih skupina, uključujući oksido-reduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze (Alloway, 2009).

#### **1.5. Posljedice nedostatka cinka kod masline**

Nedostatak cinka kod maslina manifestira se pojavom malih i blijedo zelenih listova s intervenalnom klorozom i žutim mrljama na starijem lišću. Također, u nedostatku cinka kod maslina karakterističan je nastanak rozeta na vrhovima masline kao posljedica skraćenog rasta internodija, a pojavljuje se i kod nedostatka željeza i mangana (Haifa Group, 2019).

Istraživanja provedena u Turskoj pokazala su da je nedostatak cinka prisutan kod većine sorti maslina i ostalih uljarica (Doran i sur., 2008). Nizak sadržaj cinka kod maslina posljedica je slabe apsorpcije korijenom, a ne niskim sadržajem cinka u tlima. Pretpostavlja se da su visoki pH tla i sadržaj  $CaCO_3$ , te niski udio organskih tvari i vlage glavni čimbenici tla koji utječu na raspoloživost cinka u korijenju biljaka (Alloway, 2009). Kod nekih kultura manjak cinka često

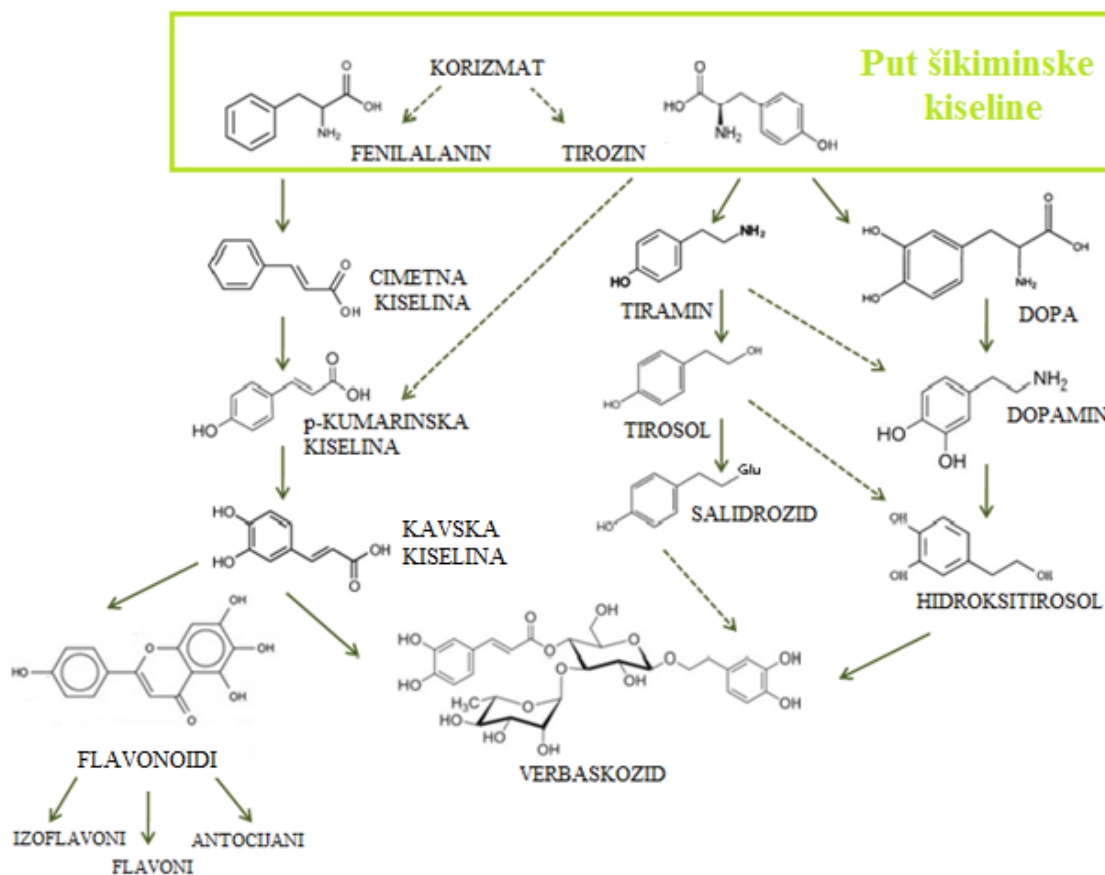


je praćen i nedostatkom drugih metala (npr. Mn ili Fe), ali kod maslina ove kombinacije nisu zabilježene (Sanzani i sur., 2012). Chatzistathis i sur. (2009) utvrdili su značajno veće koncentracije cinka u korijenskom sustavu u usporedbi s lišćem i stabljikom kod grčkih sorata maslina Kothreiki i Koroneiki.

## **1.6. Utjecaj cinka na biosintezu fenolnih spojeva**

Metabolizam biljaka uključuje primarne putove koji se nalaze u svim stanicama i proizvode primarne metabolite kao što su ugljikohidrati, lipidi, proteini i nukleinske kiseline, te sekundarne metaboličke putove u specijaliziranim stanicama koji stvaraju spojeve poput terpena, fenilpropanoide, flavonoida i kumarina (Laura i sur., 2009).

Biosinteza fenolnih spojeva u biljci uključuje dva glavna sintetska puta: put šikiminske kiseline (Slika 2, prilagođeno prema Talhaoui, 2016) i malonske kiseline. Ključni enzim u biosintezi fenolnih spojeva je fenilalanin amonijak lijaza (PAL), a čiju sintezu regulira VvPAL gen. PAL enzim katalizira eliminaciju amonijaka iz fenilalanina ili tirozina, čime nastaje *trans*-cimetna kiselina i započinje sinteza fenola. Ovaj enzim je vrlo osjetljiv na okolišne uvjete poput temperature, ultraljubičastog zračenja i ozlijede biljke (El Riachy i sur., 2011). Utjecaj cinka na ekspresiju gena odgovornih za biosintezu fenola istražen je kod vinove loze sorte Merlot (Song i sur., 2015). Autori su utvrdili da primjena cinkovog sulfata pokazuje promovirajući učinak na fotosintezu, razvoj ploda i stvaranje ukupnih fenola, flavonoida, flavonola, tanina i antocijana. Povećane koncentracije cinka rezultirale su većom ekspresijom gena koji reguliraju sintezu fenolnih spojeva.



**Slika 2.** Biosinteza fenolnih tvari putem šikiminske kiseline (prilagođeno prema Talhaoui, 2016).

## 1.7. Fenolni spojevi maslinovog lišća

Maslinovo lišće smatra se jeftinim i lako dostupnim prirodnim izvorom fenolnih tvari (Quirantes-Piné i sur., 2013). Iako je maslinovo ulje primarni proizvod u kulturi maslina i izvor antioksidansa, utvrđeno je da list masline sadrži veću koncentraciju fenolnih spojeva u odnosu na ostale biljne organe (Vogel i sur., 2015). Fenolne tvari su glavni bioaktivni spojevi u listu masline, a prema karakteristikama molekula mogu se grupirati u tri osnovne skupine: sekoiridoidi, flavonoidi i jednostavni fenoli (Rahmanian i sur., 2015). Strukture fenolnih spojeva lista masline prikazani su u Tablici 1.

**Sekoiridoidi** su najzastupljeniji spojevi u maslinovom lišću. Najznačajniji predstavnici sekoiridoida u maslinovom lišću su oleuropein i ligstrozid. Oleuropein u maslinovom lišću može biti zastupljen u masenom udjelu od 25 mg/kg do 143 g/kg s.t. (Talhaoui, 2016).

Glavni **flavonoidi** karakteristični za masline su: antocijanini, flavoni, flavonoli i flavanoni. Rutin, luteolin-7-*O*-glikozid, apigenin i luteolin su najzastupljeniji flavonoidi u lišću i plodovima masline (Talhaoui, 2016).

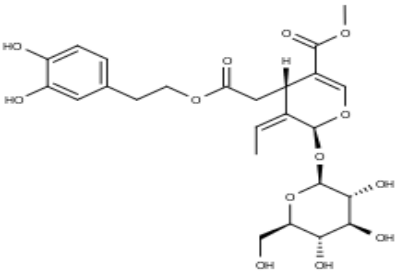
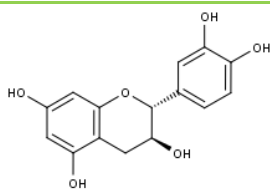
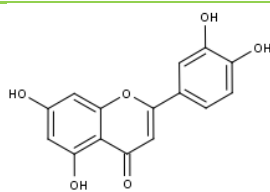
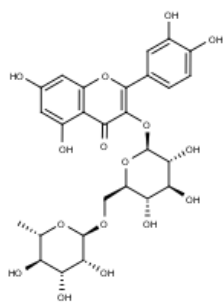
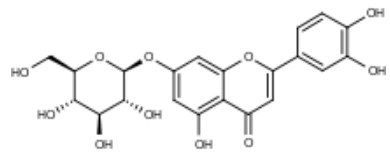
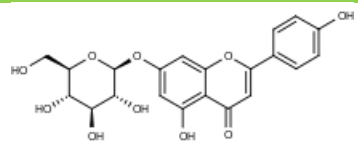
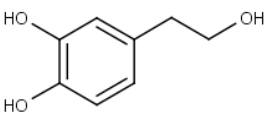
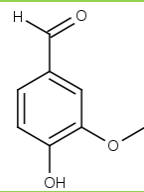
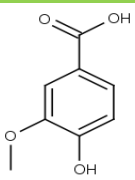
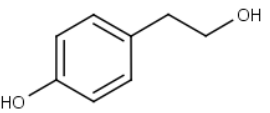
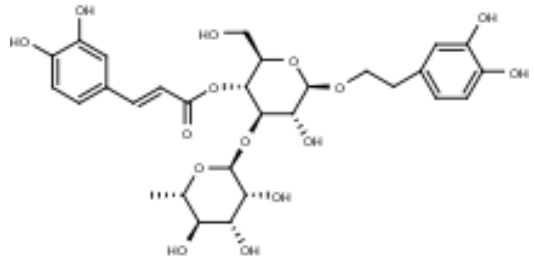
Fenolne kiseline i fenolni alkoholi pripadaju skupini **jednostavnih fenola**. S obzirom na osnovnu strukturu fenolne kiseline se dijele na derivate hidrosibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline. Derivati hidrosibenzojeve kiseline su vanilinska, 4-hidroksibenzojeva, siriginska i protokatehunska kiselina, a derivati hidroksicimetne kiseline su *p*-kumarinska, kavska, ferulična i sinapinska kiselina. Najzastupljeniji fenolni alkoholi u lišću, plodu i maslinovom ulju su hidroksitirozol i tirozol. Hidroksitirozol je glavni produkt u razgradnji oleuropeina, pa se za vrijeme sazrijevanja njegova količina u plodovima i listu masline povećava. Karakterizira ga snažno antioksidativno djelovanje.

Verbaskozid je složeni fenolni glikozid koji u strukturi ima kavsku kiselinu pa ga neki autori svrstavaju u skupinu fenolnih kiselina (Talhaoui 2016).

Oleanolična kiselina je triterpenski spoj koji prevladava u maslinovom lišću, te može biti zastupljena od 3,0 do 3,5% suhe tvari lišća.

Tekućinska kromatografija visoke/ultra djelotvornosti (HPLC/UPLC) povezana detektorom s nizom dioda (DAD) i/ili povezana s masenom spektrometrijom (MS) najviše se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih spojeva u listovima maslina. Ova analitička metoda pokazala se uspješnijom u odnosu na ostale kromatografske i spektroskopske metode. Njezine prednosti su visoki stupanj osjetljivosti i preciznosti, mogućnost detekcije komponenata širokog spektra te kraće vrijeme same analize (Quirantes-Piné i sur., 2013).

**Tablica 1.** Fenolne tvari u maslinovom lišću (Rahmanian i sur. 2015).

SEKOIRIDOIDI		
Oleuropein		
FLAVONOIDI		
FLAVONOLI	FLAVONI	
Katehin	Luteolin	
		
Rutin	Luteolin-7-O-glikozid	
		
	Apigenin-7-O-glukozid	
		
JEDNOSTAVNI FENOLI		
FENOLNI ALKOHOLI	FENOLNE KISELINE	
Hidroksitirozol	Vanilin	Vanilinska kiselina
		
Tirozol	Verbaskozid	
		

### 1.7.1. Zdravstveni učinci fenolnih spojeva maslinovog lišća

Fenolni spojevi u maslinovom lišću pokazuju brojne farmakološke aktivnosti potvrđene u pretkliničkim (*in vitro* i *in vivo*) i u manjem broju kliničkih studija. Stoga se ekstrakti fenolnih tvari mogu naći kao dodaci prehrani, ali ne i kao odobreni lijekovi (Obied i sur., 2012). U narodnoj medicini listovi maslina koristili su se za pripremu biljnih infuzija za smirenje kašlja, liječenje malarije i groznice. Žvakanje maslinovih listova koristilo se za ublažavanje zubobolje i ublažavanje iritacija u usnoj šupljini (Bartolini i Petruccelli, 2002).

Hidroksitirozol ima protuupalno djelovanje, pomaže u oslobađanju superoksidnih aniona i inhibira enzim ciklooksigenazu-2 u monolitima (Rosignoli i sur., 2013). Oleuropein i hidroksitirozol djeluju kardioprotektivno, zahvaljujući svojoj *orto*-difenolnoj strukturi koja je odgovorna za snažno antioksidacijsko svojstvo (Wang i sur., 2008). Zahvaljujući snažnom antioksidacijskom potencijalu oleuropeina, hidroksitirosola i flavonoida dokazano je da je ove fitokemikalije mogu značajno utjecati na proces karcinogeneze na način da inhibiraju stanični ciklus, staničnu proliferaciju i oksidativni stres, te stimuliraju imunološki sustav. Fenolni ekstrakti maslinovog lista inhibiraju staničnu proliferaciju adenokarcinoma dojke i karcinoma mokraćnog mjehura kod čovjeka (Fabiani i sur., 2008), a oleuropein aglikon i oleanolična kiselina imaju antidiijabetička svojstva (Kaeidi i sur., 2011).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj rada je istražiti utjecaj prihrane cinkom na pokazatelje vegetativnog prirasta i fenolni sastav lista sadnica maslina sorte Istarska bjelica na kraju desetomjesečnog hidroponskog uzgoja. Sadnice su bile prihranjivane standardnom Hoaglandovom otopinom koja sadrži optimalne količine hranjivih tvari za rast biljke, uz izmijenjenu koncentraciju cinka. Sorta Istarska bjelica je odabrana za istraživanje iz razloga što su prethodna istraživanja na različitim lokacijama u Hrvatskoj pokazala najveću koncentraciju oleuropeina u listovima ove sorte u usporedbi s drugim sortama. Pojedine fenolne tvari u ekstraktu maslinovog lišća određene su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-VIS detektorom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci maslinovog lišća

Uzorci maslinovog lišća dobiveni su od sadnica masline sorte Istarska bjelica iz hidroponskog uzgoja (sistem uzgoja biljaka bez tla) u plasteniku Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču. Sadnice maslina bile su u hidroponskom uzgoju od listopada 2018. do kolovoza 2019. godine u kojem su korištene dvije hranjive otopine koje su sadržavale sve potrebne nutrijente kao i standardna Hoaglandova otopina (Tablica 2) uz izmjenu koncentracija cinka (hranjiva otopina bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka). Kontrolni uzorak maslinovog lišća dobiven je od sadnica koje su tijekom hidroponskog uzgoja prihranjivane hranjivom otopinom koja nije sadržavala cink ( $0 \mu\text{M}$  cinka). Drugi uzorak maslinovog lišća dobiven je od sadnica koje su prihranjivane otopinom koja je imala 16 puta veću koncentraciju cinka u odnosu na Hoaglandovu otopinu ( $32 \mu\text{M}$  cinka). Hidroponski uzgoj sadnica maslina opisan je u poglavlju 3.2.1. *Hidroponski uzgoj sadnica maslina*, a lišće je uzorkovano sa srednjeg dijela mladice.

**Tablica 2.** Sastav i koncentracije u standardnoj Hoaglandovoj otopini i hranjivim otopinama bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka.

NUTRIJENTI	HOAGLANDOVA OTOPINA (100%)	HRANJIVA OTOPINA BEZ CINKA	HRANJIVA OTOPINA S POVEĆANOM KONC. CINKA
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5 mM	5 mM	5 mM
$\text{KNO}_3$	5 mM	5 mM	5 mM
$\text{MgSO}_4$	2 mM	2 mM	2 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 mM	1 mM	1 mM
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$	$6,25 \mu\text{M}$	$6,25 \mu\text{M}$	$6,25 \mu\text{M}$
Mn EDTA	$2 \mu\text{M}$	$2 \mu\text{M}$	$2 \mu\text{M}$
<b><math>\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}</math></b>	<b><math>2 \mu\text{M}</math></b>	<b><math>0 \mu\text{M}</math></b>	<b><math>32 \mu\text{M}</math></b>
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	$0,5 \mu\text{M}$	$0,5 \mu\text{M}$	$0,5 \mu\text{M}$
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 2\text{H}_2\text{O}$	$0,4 \mu\text{M}$	$0,4 \mu\text{M}$	$0,4 \mu\text{M}$
Fe EDDHA	$20 \mu\text{M}$	$20 \mu\text{M}$	$20 \mu\text{M}$

### 3.1.2. Kemikalije i standardi

Za izradu ovog rada korištene su navedene kemikalije i standardi za pojedinu svrhu.

*Hidroponski uzgoj:*

- 1) deionizirana voda
- 2) Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Yara, Mađarska), KNO<sub>3</sub> (Yara, Mađarska), MgSO<sub>4</sub> (Yara, Mađarska), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika, Hrvatska), Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>×10H<sub>2</sub>O (Gram-mol, Hrvatska), Mn EDTA (Tradecrop, Španjolska), ZnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O (Kemika, Hrvatska), CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O (T.T.T., Hrvatska), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>×2H<sub>2</sub>O (Kemika, Hrvatska), Fe EDDHA (Yara, Mađarska).

*Ekstrakcija i određivanje sastava fenolnih tvari iz maslinovog lišća:*

- 1) metanol, HPLC gradient grade, 80 %-tna vodena otopina, V:V, (Merck KgaA, Njemačka),
- 2) acetonitril, HPLC gradient grade, (Merck KgaA, Njemačka),
- 3) fosforna kiselina (2 %-tna vodena otopina, V:V), (Sigma-Aldrich, SAD)
- 4) standardne fenolne tvari korištene za identifikaciju i kvantifikaciju navedene su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Standardi fenolnih tvari.

FENOLNA TVAR	ČISTOĆA (HPLC)	PROIZVOĐAČ
Oleuropein	≥ 98 %	Extrasynthese (Francuska)
Apigenin	≥ 99 %	
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	≥ 99 %	
Luteolin	≥ 99 %	
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	≥ 98 %	
Katehin	≥ 99 %	
Rutin	≥ 99 %	
Hidroksitirozol	≥ 98 %	
Tirozol	≥ 99 %	
Ferulična kiselina	≥ 90 %	
Kavska kiselina	≥ 99 %	
Verbaskozid	≥ 99 %	
Vanilin	≥ 99 %	
Oleanolična kiselina	≥ 99 %	



### 3.1.3. Uređaji i pribor

U radu su korišteni navedeni uređaji i pribor za pojedinu svrhu.

*Uzorkovanje i priprema uzoraka maslinovog lišća:*

- 1) škare za rezidbu
- 2) sušionik UF-260 Universal Oven, (Mettmert GmbH + Co.KG, Njemačka)
- 3) ultra-centrifugalni mlin ZM200, (Retsch GmbH, Njemačka).

*Priprema ekstrakta fenola iz maslinovog lišća:*

- 1) semimikro analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- 2) ultrazvučna kupelj, 140/560 W, 35 kHz, (Bandelin Sonorex Digitec, Njemačka)
- 3) centrifuga Bench-top Versatil, (Electra Medical Corporation, SAD).

*Određivanje sastava fenolnih tvari (HPLC UV-VIS)*

- 1) tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Ulti-Mate 3000, Dionex (Thermo Fisher Scientific, SAD) sa UV-VIS detektorom Ulti-Mate 3000 VWD Variable Wavelength Detector, HPLC predkolonom Lichrospher 100, 4 × 4 mm, veličina stacionarne faze 5 μm (Agilent Technologies, SAD) te HPLC kolonom C18 obrnutih faza, Lichrospher 100 RP-18, 250 mm × 4 mm, veličina stacionarne faze 5 μm (Agilent Technologies, SAD).

*Plastični, stakleni i ostali pribor*

- 1) automatske pipete (Eppendorf Research, Njemačka)
- 2) staklene vialne volumena 2 mL, PTFE/silikonske septe promjera 8 mm i polipropilenski čepovi s otvorom 8 mm za vialne (Restek, SAD)
- 3) disk filtri od celuloznog acetata, promjera 13 mm, veličina pora 0,45 μm (Filtres Fioroni, Francuska)
- 4) plastični pribor: samostojeće Falcon epruvete od 50 mL, plastične epruvete od 15 mL s čepovima na navoj, šprice s iglama od 2 mL, lijevci

- 5) stakleni pribor: staklene teglice (50 mL) s čepovima na navoj, staklene epruvete od 15 i 20 mL s PP čepovima na navoj (Duran, Njemačka), prijenosne pipete (20 mL)
- 6) ostali pribor i materijal: gumene propipete, stalci za epruvete.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Hidroponski uzgoj sadnica maslina

Hidroponski sustav uzgoja postavljen je u plasteniku u listopadu 2018. godine s jednogodišnjim sadnicama masline sorte Istarska bjelica koje su posađene u plastične posude volumena 3,5 L s inertnim supstratom koji se sastojao od mješavine kvarcnog pijeska i perlita u omjeru 1:1 (Slika 3) u koji se dodavala hranjiva otopina poznatog sastava (Tablica 2).



**Slika 3.** Priprema supstrata za sadnju maslina sorte Istarska bjelica u plastičnim posudama.

Tijekom hidroponskog uzgoja (od listopada 2018. do kolovoza 2019. godine) tri sadnice bile su prihranjivane hranjivom otopinom koja je sadržavala sva potrebna hranjiva za optimalan rast biljke poput Hoaglandove otopine izuzev cinka ( $0 \mu\text{M}$  cinka). Druge tri sadnice bile su prihranjivane s hranjivom otopinom koja je imala isti sastav ostalih hranjiva uz povećanu koncentraciju cinka ( $32 \mu\text{M}$  cinka). Opisani pokus bio je dio većeg hidroponskog pokusa sa sadnicama masline u kojemu su primijenjene različite koncentracije makroelemenata (dušik,

magnezij, kalcij) i mikroelemenata (mangan, cink, bakar, bor) u hranjivim otopinama. Na Slici 4 je prikazan izgled plastenika za vrijeme postavljanja pokusa.



**Slika 4.** Izgled plastenika za vrijeme postavljanja pokusa.

Naknadno, posude sa sadnicama su prekriveni zaštitnim folijama kako bi se spriječio razvoj algi, pregrijavanje supstrata i prekomjeren gubitak vlage uslijed pojave povišenih temperatura (Slika 5).



**Slika 5.** Postavljena zaštitna folija koje sprječava razvoj algi u supstratu.

Biljke su u pravilnim razmacima, a sukladno prirastu zalijevane pripremljenim hranjivim otopinama. Na početku pokusa su zalijevane jedanput tjedno, a kasnije dva puta tjedno s količinom od 300 mL po zalijeivanju.

Tijekom pokusa kontrolirani su sljedeći parametri: temperatura supstrata i zraka, vlažnost supstrata i zraka te pH i električna provodljivost procjetka. Osim toga, na svakoj su biljci provedena mjerenja vegetativnog prirasta sadnica maslina u pravilnim razmacima. Za vrijeme mjerenja prirasta su izbrojeni nodiji tj. zadebljanja na stabljici koja nose jedan ili više listova i glavni listovi te je izmjerena ukupna visina biljke i prirast uz pomoć metra. Na bambusovom štapu je crnom točkom označen svaki novi prirast biljke kod pravog i potpuno razvijenog lista kao što je prikazano na Slici 6.



**Slika 6.** Označavanje i mjerenje vegetativnog prirasta maslina.

### **3.2.2. Uzorkovanje maslinovog lišća**

Uzorkovanje lišća provedeno je u kolovozu 2019. godine. Prije postupka uzorkovanja, sadnice su isprane deioniziranom vodom. Stabljika s listovima Istarske bjelice uzorkovana je tako da je podijeljena u tri dijela: na bazu, sredinu i vrh biljke. Za analizu fenola koristili su se samo listovi sa srednjeg dijela sadnice. Prije uzorkovanja svake iduće sadnice alat za rezidbu je dezinficiran etanolom.

Uzorkovanje je provedeno u ranijim jutarnjim satima. Neposredno nakon prikupljanja uzoraka u papirnate vrećice, uzorci su dostavljeni u laboratorij na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču kako je prikazano na Slici 7.



**Slika 7.** Uzorkovanje stabljike masline s listovima.

### **3.2.3. Priprema uzoraka maslinovog lišća**

Uzorci maslinovog lišća pripremljeni su u laboratoriju na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču. Najprije su odvojeni listovi od stabljike masline (Slika 8), a potom su uzorci lišća osušeni u sušioniku na temperaturi od 30 °C do stalne mase.



**Slika 8.** Odvajanje lista od stabljike.

Nakon sušenja, uzorci su samljeveni centrifugalnim mlinom sa sitom promjera rupica 0,2 mm, koji je spojen s usisnim uređajem što omogućava da se materijal uzorka dodatno ohladi strujom zraka i prikupi u epruvete putem nastavka na koji je nadograđen (Slika 9).



**Slika 9.** Centrifugalni mlin za mljevenje uzoraka maslinovog lišća.

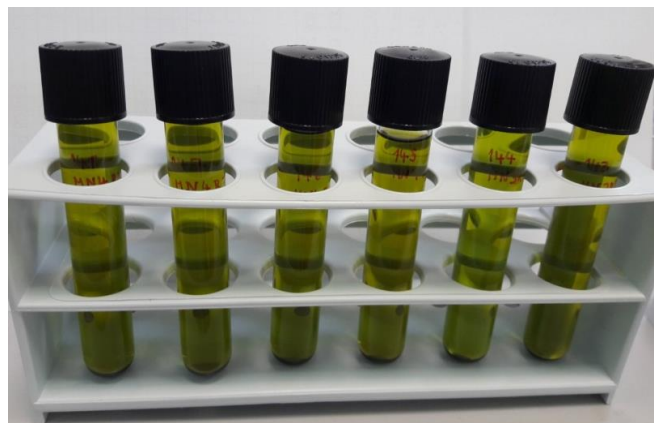
Mljeveni uzorci maslinovog lišća preneseni su u Falcon epruvete od 50 mL i čuvani na tamnom i suhom mjestu do provođenja analiza (Slika 10).



**Slika 10.** Samljeveni uzorci maslinovog lišća.

### 3.2.4. Ekstrakcija fenolnih tvari iz maslinovog lišća

Ekstrakcija fenolnih tvari iz maslinovog lišća, kao i priprema ekstrakta za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti provedena je u laboratoriju na Katedri za tehnologiju i kontrolu namirnica Medicinskog fakulteta u Rijeci. Na analitičkoj vagi izvagano je 0,5 g mljevenog lišća u staklene teglice od 50 mL s čepom na navoj u koje je uz pomoć trbušaste pipete dodano 20 mL 80%-tog metanola (V:V). Uzorci su stavljeni u ultrazvučnu kupelj i ekstrahirani 20 minuta. Budući da su se uzorci za vrijeme ultrazvučne ekstrakcije zagrijali, nakon ekstrakcije termostatorirani su na 20 °C u vodenoj kupelji. Metanolni ekstrakti (13,5 mL) su preneseni u plastične epruvete s čepovima na navoj i centrifugirani su na 4000 o/min u vremenu od 7 minuta. Izbistreni metanolni ekstrakti (supernatant) pažljivo su preneseni u staklene epruvete s čepom na navoj (10-12 mL) (Slika 11). Potom su izbistreni metanolni ekstrakti fenolnih tvari propušteni kroz disk filter od celuloznog acetata u staklene vialice volumena 2 mL. Za filtraciju su korištene šprice od 2 ml s iglom koje su kao i filter disk prethodno isprane 80%-tnim metanolom. Napunjene vialice su začepljene septama i šupljim čepom.



**Slika 11.** Ekstrakti maslinovog lišća.

### 3.2.5. Određivanje sastava fenola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

#### Postupak rada

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC) s UV-VIS detektorom je korištena za određivanje sastava fenola. Analize su provedene na Odsjeku za zajedničke analitičke tehnike Zdravstveno-ekološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije. HPLC uređaj se sastojao od autosamplera tj. automatskog sustava za uzimanje uzoraka, sustava za degaziranje tj. otplinjavanja otapala, binarne pumpe koja pokreće pokretnu fazu pod visokim tlakom, pretkolone, kolone i UV-VIS detektora kako je opisano u poglavlju 3.1.3. *Uređaji i pribor*. Pokretna faza (eluens) sastojala se od vodene otopine fosforne kiseline (otapalo A) i mješavine otopine metanola i acetonitrila (otapalo B) (1:1, V:V). Primijenjena je gradijentna elucija uzorka s kolone, a korišteni uvjeti prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Primijenjeni uvjeti i sastav pokretnih faza tijekom gradijentnog eluiranja.

VRIJEME ELUCIJE [min]	UDIO OTAPALA A (fosforna kiselina) [%]	UDIO OTAPALA B (metanol: acetonitril, 1:1) [%]
0 – 0,5	90	10
0,5 – 25	90 – 83,5	10 – 16,5
25 – 80	83,5 – 70	16,5 – 30
80 – 95	70 – 0	30 – 100
95 – 100	0	100
100 – 102	0 – 90	100 – 10
102 – 105	90	10



Primijenjeni su sljedeći uvjeti kromatografske analize:

- temperatura kolone: 25 °C
- vrijeme uspostavljanja početnog sastava pokretne faze: 10 min
- volumen injektiranog uzorka: 10 µL
- vrijeme analize: 105 min
- brzina protoka pokretnih faza: 0,8 mL/min

#### *Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva*

Izdvojeni fenolni spojevi detektirani su uz pomoć UV-VIS detektora pri valnim duljinama od 210 do 370 nm, prikazanim u Tablici 5, pri čemu su dobiveni karakteristični kromatogrami fenolnih ekstrakata.

**Tablica 5.** Valne duljine za detekciju pojedinih fenolnih spojeva.

VALNA DULJINA	FENOLNI SPOJEVI
210 nm	oleanolična kiselina
250 nm	oleuropein, luteolin-7- <i>O</i> -glukozid
280 nm	katehin, apigenin-7- <i>O</i> -glukozid, hidroksitirosol, tirosol, vanilin
305 nm	apigenin, ferulična kiselina, kavaska kiselina, verbaskozid
370 nm	luteolin, rutin

Fenolni spojevi na kromatogramima su identificirani usporedbom vremena zadržavanja izoliranih vršaka s vremenima zadržavanja standarda. Kvantifikacija pojedinih spojeva provedena je na temelju baždarnih pravaca pojedinih standarda. Za izradu baždarnog pravca pojedinog standarda pripremljeno je pet otopina standarda fenolnih tvari (otopljeno u 80%-tnom metanolu) u rasponu masenih koncentracija od 0,5 mg/L do 50 mg/L. Program *Cromeleon Chromatography Data System* (verzija 7.2 SR4, Termo Fisher Scientific, SAD) korišten je za obradu podataka i izradu baždarnih pravaca na način da su na osi x prikazane poznate

koncentracije standardnih tvari, a na osi y površine vršaka (primjer baždarnog pravca za luteolin 7-O-glukozid prikazan je na Slici 19 u Prilozima). Pomoću baždarnih pravaca pojedinih fenolnih spojeva izračunati su maseni udjeli fenolnih spojeva u lišću i iskazani su u mg/kg suhe tvari lišća.

### 3.2.6. Statistička obrada rezultata

Rezultati nedestruktivnih mjerenja vegetativnog prirasta sadnica prikazani su kao srednje vrijednosti tri mjerenja (tri sadnice × jedno mjerenje) sa standardnim devijacijama. Također, maseni udjeli pojedinačnih fenola prikazani su kao srednje vrijednosti tri određivanja (tri sadnice × jedno analitičko određivanje). Svi su rezultati testirani pomoću jednosmjerne analize varijance (*one-way ANOVA*). Homogenost varijance testirana je Levenovim testom, a srednje vrijednosti rezultata uspoređivane su Tukeyevim testom značajnih razlika – *The Tukey's honest significant difference test - HSD* ( $p < 0,05$ ). Svi testovi provedeni su pomoću programskog paketa *Statistica verzija 13.3*. (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornija – SAD). Za izradu grafičkih prikaza korišten *Microsoft Office Excel 2016* (Microsoft, Novi Meksiko – SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati vegetativnog prirasta sadnica masline kod prihrane cinkom

U Tablici 6 prikazani su rezultati mjerenja vegetativnog prirasta sadnica maslina odnosno broj nodija i listova te prirast sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka (Zn 0  $\mu$ M) i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 32  $\mu$ M). Prihrana s povećanom koncentracijom cinka statistički je značajno povećala vrijednosti pokazatelja vegetativnog prirasta.

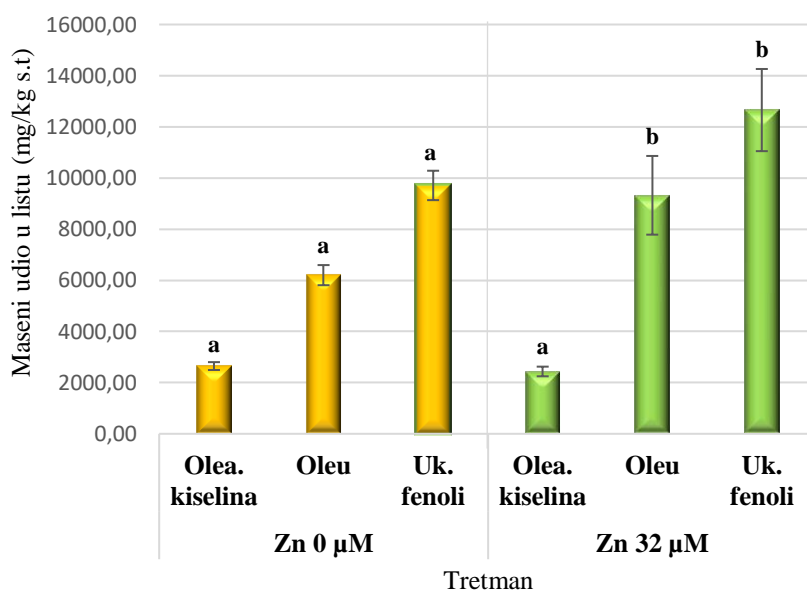
**Tablica 6.** Broj nodija i listova na sadnici te prirast sadnice kod gnojidbenih tretmana bez cinka i (Zn 0  $\mu$ M) i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 32  $\mu$ M) u hranjivoj otopini.

TRETMAN	BROJ NODIJA	BROJ LISTOVA	PRIRAST [cm]
Zn 0 $\mu$ M	17,80 $\pm$ 0,92 <b>a</b>	35,47 $\pm$ 1,36 <b>a</b>	57,54 $\pm$ 3,71 <b>a</b>
Zn 32 $\mu$ M	21,67 $\pm$ 1,14 <b>b</b>	41,87 $\pm$ 1,85 <b>b</b>	84,91 $\pm$ 14,66 <b>b</b>

Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri sadnice  $\times$  jedno mjerenje)  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova unutar istog stupca označavaju statističke značajne razlike (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ) između tretmana.

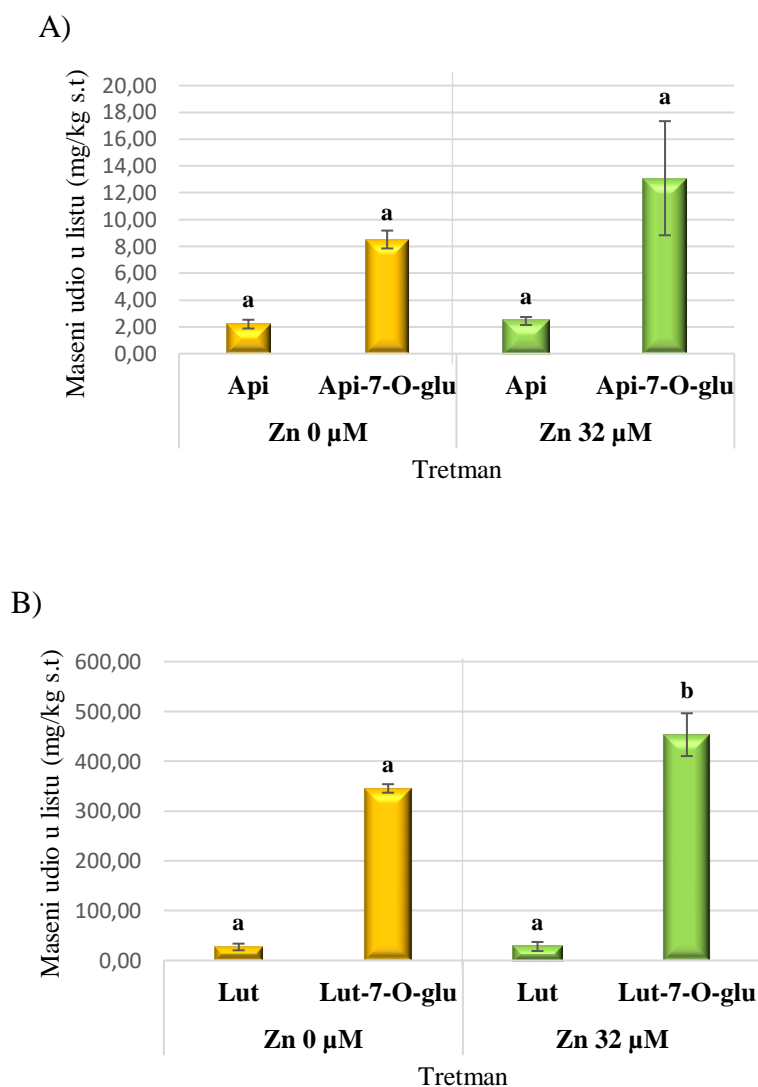
## 4.2. Fenolni sastav lišća od sadnica prihranjivanih cinkom

Slika 12 prikazuje utjecaj prihrane otopinom bez cinka (Zn 0  $\mu$ M) i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 32  $\mu$ M) na maseni udio oleuropeina i oleanolične kiseline te ukupnih fenola (dobiveni zbrajanjem masenih udjela pojedinačnih fenola). Prihrana s povećanom koncentracijom cinka statistički je značajno povećala maseni udio oleuropeina i ukupnih fenola.



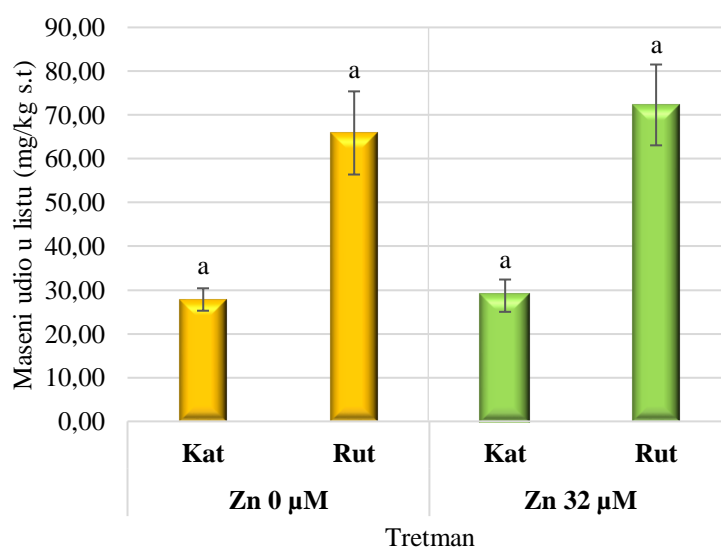
**Slika 12.** Maseni udio (mg/kg s.t.) oleanolične kiseline, oleuropeina i ukupnih fenola u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 $\mu$ M, Zn 32  $\mu$ M). Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri sadnice  $\times$  jedno analitičko određivanje)  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana za pojedinu fenolnu tvar (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ). Kratice: *Olea. kiselina* – oleanolična kiselina, *Oleu* – oleuropein, *Uk. fenoli* – ukupni fenoli (zbroj pojedinačnih fenola).

Slika 13 prikazuje utjecaj prihrane otopinom bez cinka (Zn 0 $\mu$ M) i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 32  $\mu$ M), na maseni udio apigenina, apigenin-7-*O*-glukozi, luteolina i luteolin-7-*O*-glukozi, fenolnih spojeva iz skupine flavona. Prihrana s povećanom koncentracijom cinka statistički je značajno povećala maseni udio luteolin-7-*O*-glukozi u listu.

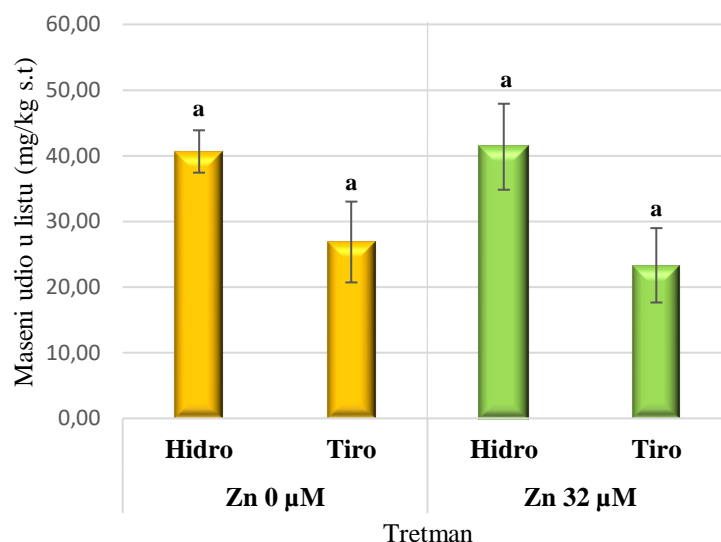


**Slika 13.** Maseni udio (mg/kg s.t.) A) apigenina i apigenin-7-*O*-glukozi, B) luteolina i luteolin-7-*O*-glukozi u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 $\mu$ M, Zn 32  $\mu$ M). Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri sadnice  $\times$  jedno analitičko određivanje)  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana za pojedinu fenolnu tvar (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ). Kratice: *Api* – apigenin, *Api-7-O-glu* – apigenin-7-*O*-glukozid, *Lut* – luteolin, *Lut-7-O-glu* – luteolin-7-*O*-glukozid.

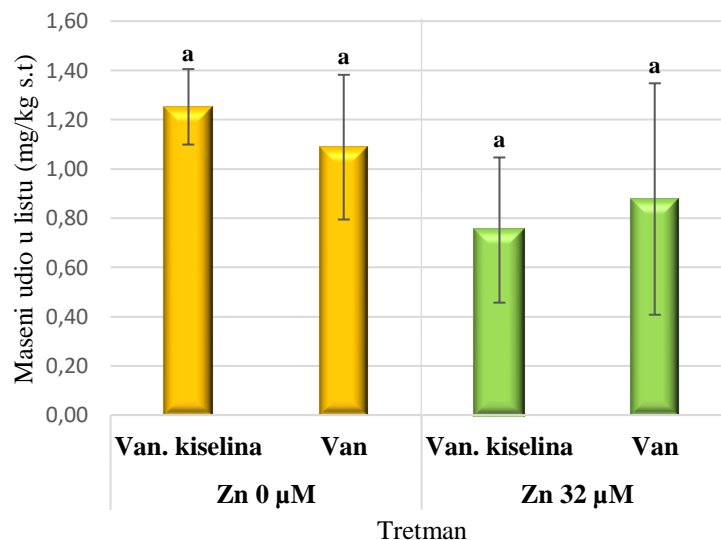
Slike 14 – 17 prikazuju utjecaj prihrane otopinom bez cinka (Zn 0 $\mu$ M) i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 32  $\mu$ M) na maseni udio katehina i rutina iz skupine flavonola, hidroksitirosola i tirosola koji pripadaju fenolnim alkoholima, vanilina (fenolni aldehid), verbaskozida (fenolni ester) i vanilinske kiseline iz skupine fenolnih kiselina. Prihrana s povećanom koncentracijom cinka nije statistički značajno povećala maseni udio ovih fenolnih tvari u listu.



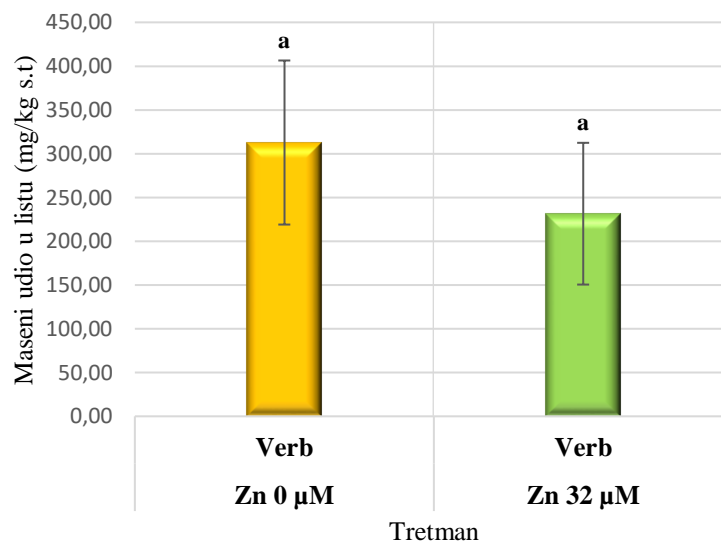
**Slika 14.** Maseni udio (mg/kg s.t.) katehina i rutina u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0  $\mu$ M, Zn 32  $\mu$ M). Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri sadnice  $\times$  jedno analitičko određivanje)  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana za pojedinu fenolnu tvar (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ). Kratice: *Kat* – katehin, *Rut* – rutin.



**Slika 15.** Maseni udio (mg/kg s.t.) hidroksitirosola i tirosola u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 µM, Zn 32 µM). Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri sadnice × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana za pojedinu fenolnu tvar (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ). Kratice: *Hidro* – hidroksitirozol, *Tiro* – tirosol.



**Slika 16.** Maseni udio (mg/kg s.t.) vanilinske kiseline i vanilina u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 µM, Zn 32 µM). Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri sadnice × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana za pojedinu fenolnu tvar (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ). Kratice: *Van. kiselina* – vanilinska kiselina, *Van* – vanilin.



**Slika 17.** Maseni udio (mg/kg s.t.) verbaskozida u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 µM, Zn 32 µM). Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri sadnice × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana za pojedinu fenolnu tvar (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ). Kratice: *Verb* – verbaskozid.



## 5. RASPRAVA

S ciljem istraživanja gnojidbenog tretmana s povećanom koncentracijom cinka, jednogodišnje sadnice Istarske bjelice posađene su u inertni supstrat hidroponskog sustava uzgoja. Sadnicama su dozirane hranjive otopine koje su imale optimalne količine hranjivih tvari za rast biljke tj. sastavom su odgovarale standardnoj Hoaglandovoj otopini (Hoagland i Arnon, 1950) uz promijenjenu koncentraciju cinka. Kontrolna hranjiva otopina nije sadržavala cink ( $Zn\ 0\ \mu M$ ) a otopina s povećanom koncentracijom cinka sadržavala je 16 puta veću koncentraciju cinka u odnosu na Hoaglandovu otopinu ( $Zn\ 32\ \mu M$ ).

Praćenjem vegetativnih pokazatelja prirasta (prirast sadnice, broj novih nodija i listova), nedostatak cinka statistički je značajno utjecao na vrijednosti ovih pokazatelja i rast sadnica maslina (Tablica 6). Sadnice maslina podvrgnute prihrani bez cinka ( $Zn\ 0\ \mu M$ ) bile su kraće za 48% od sadnica na prihrani s povećanom koncentracijom cinka ( $Zn\ 32\ \mu M$ ). Povećanje koncentracije cinka vjerojatno je stimuliralo aktivnost auksina, fitohormona koji regulira rast i razvitak biljke (Sanzani i sur., 2012). Souza i sur. (2019) utvrdili su da je nedostatak cinka u hranjivoj otopini primijenjenoj u hidroponskom uzgoju maslina sorte Arbequina doveo do smanjenog prirasta sadnica koji nije bio statistički značajno različit u odnosu na sadnice prihranjivane Hoaglandovom otopinom ( $Zn\ 2\ \mu M$ ). Stoga su zaključili da nedostatak cinka ne utječe značajno na relativni rast biljke, za razliku od nedostatka bora i željeza koji su statistički značajno smanjili prirast biljke. Za razliku od jednogodišnjih biljaka, masline kao višegodišnje biljke sadrže organe za skladištenje hranjivih tvari i imaju mogućnost ponovne upotrebe tih hranjivih elemenata kako bi podržali rast biljke. Iz tih razloga potrebe maslina i ostalih drvenastih biljaka za cinkom niže su od jednogodišnjih biljaka (Fernández-Escobar i sur., 2015).

Listovi biljaka smatraju se primarnim mjestom biljnog metabolizma uključujući i proizvodnju fenolnih tvari (Ryan i sur., 2001). Fenolne tvari iz maslinovog lišća ekstrahirane su 80%-tnim metanolom a analiza fenolnog sastava provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s UV-VIS detekcijom. Lišće maslina sadrži složenije fenole kao što su sekoiridoidi i flavonoidi s vrlo malo jednostavnih fenolnih kiselina (Ryan i sur., 2001). Glavni fenolni spojevi u listu masline su oleuropein iz skupine sekoiridoida (do 14% suhe tvari lišća) i triterpenski spoj oleanolična kiselina (oko 3% suhe tvari lišća) (Guinda i sur., 2015). U lišću Istarske bjelice (Zn 0  $\mu$ M) također su najzastupljeniji spojevi bili oleuropein (6,2 g/kg s.t. lišća) i oleanolična kiselina (2,7 g/kg s.t. lišća) te su ova dva spoja činila 91,2% ukupnih identificiranih fenolnih tvari (Slika 12). Od ostalih fenolnih spojeva u lišću su bili zastupljeni luteolin-7-*O*-glukozid iz skupine flavona (345,4 mg/kg s.t., Slika 13) te verbaskozid (312,7 mg/kg s.t., Slika 17). Uz oleuropein i verbaskozid, luteolin-7-*O*-glukozid prisutan je u značajnim količinama u maslinovom lišću (Silva i sur., 2006; Benavente-Garcia i sur., 2000). Povećana koncentracija cinka (Zn 32  $\mu$ M) u hranjivu dovela je do statistički značajnog porasta oleuropeina u lišću za 1,5 puta u odnosu na prihranu bez cinka. Sličan učinak imala je prihrana cinkom i na luteolin-7-*O*-glukozid, čiji se udio u lišću povećao za 1,3 puta u odnosu na prihranu bez cinka.

Ostale identificirane fenolne tvari u lišću Istarske bjelice bile su prisutne u nižim masenim udjelima (< 100 mg/kg) poput luteolina, apigenina, apigenin-7-*O*-glukozida, flavonola katehina i rutina te fenolnih alkohola i fenolnih kiselina (Slike 13 – 16). Povećana koncentracija cinka u hranjivoj otopini (Zn 32  $\mu$ M) blago je povećala masene udjele apigenin-7-*O*-glukozida i rutina u lišću ali povećanje nije bilo statistički značajno. Na masene udjele ostalih fenolnih tvari prihrana s povećanom koncentracijom nije imala statistički značajan utjecaj.

Cink ima važnu ulogu u metabolizmu sekundarnih biljnih metabolita odnosno fenolnih spojeva. Fenilalanin amonijak liaza (PAL) je enzim koji ima ključnu ulogu u biosintezi fenola jer pokreće sintezu širokog spektra fenilpropanoidnih sekundarnih spojeva uključujući flavone, flavonole i fenolne alkohole (Slika 2, prilagođeno prema Talhaoui, 2016). Oleuropein je po kemijskoj strukturi ester hidroksitirosola i elenolne kiseline karakterističnog za porodicu *Oleaceae* kojoj pripada maslina (Tripoli i sur., 2005). Ortega-García i Peragón (2009) uočili su da masline izložene abiotičkom stresu kao što je niska temperatura pokazuju pojačanu aktivnost PAL enzima koji sudjeluju u sintezi fenolnih spojeva detektiranih u lišću. Prema istraživanju Songa i sur. (2015), veće koncentracije cinka dovele su do pojačane ekspresije VvPAL gena za PAL enzim kod jagoda, crvenog grožđa, kruška i jabuka. Barrameda-Medina i sur. (2017) uočili su da je dodatak cinka u hranjivu otopinu povećao enzimsku aktivnost uključenu u asimilaciju sumpora i sintezu fenola kod kupusnjača. Stoga je povećana koncentracija cinka u hranjivoj otopini (Zn 32  $\mu$ M) mogla povećati aktivnost PAL enzima kod sadnica Istarske bjelice i povećati udio fenolnih tvari u lišću osobito složenijih fenola kao što su oleuropein i flavonoidi.

U ovome inovativnom načinu uzgoja masline su usvajale cink preko korijena u obliku dvovalentnog kationa. Korijen masline ima ulogu svojevrsnog „pufera“ budući da regulira prijenos mikroelementa iz korijena u izdanak biljke (Chatzistathis i sur., 2009). Uz to, White (2012) navodi da cink ima nisku pokretljivost u floemu pa će njegovu mobilnost odrediti akumulacija u nekom od tkiva biljke. Također, autor sugerira da folijarna primjena gnojiva ima značajniju nutritivnu važnost za rast i razvoj biljke posebno ako se uzgajaju u supstratima s niskom raspoloživosti cinka (White, 2012). Folijarna primjena mikroelemenata uspješnija je od primjene iste u supstrat ili tlo (Vishekaii i sur., 2019). Njezina prednost je u korištenju nižih koncentracija elemenata, jednolikoj raspodjeli hranjivih tvari u biljci i naposljetku se manifestira bržim fiziološkim odgovorom biljke. Navedeno su potvrdili Başar i Gürel (2016) kod masline sorte Gemlik ustanovivši da cink primijenjen u tlo nije utjecao na sadržaj cinka u

biljci, dok se kod folijarne primjene povećao udio cinka u listovima masline. Naime, vrlo malo se zna o zahtjevima masline za cinkom jer je koncentracija ovog mikroelementa u maslini obično adekvatna, i ne postoje podaci o tome koji će način primjene hranjiva rezultirati većim udjelom fenola. Folijarna gnojidba cinkom povećala je sadržaj fenola u ljutim papričicama sorte Habanero (García-López i sur., 2019) te kod anisa (*Pimpinella anisum* L.) poznatog kao ljekovito i začinsko bilje (Tavallali i sur., 2017).

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave, zaključci ovoga rada su sljedeći:

1. Višestruko povećanje koncentracije cinka u standardnoj hranjivoj otopini statistički značajno povećava visinu sadnica (za 48%), broj novih nodija (za 22%) i listova (za 18%) u odnosu na sadnice maslina na prihrani standardnom hranjivom otopinom bez cinka.
2. Najzastupljenije fenolne tvari u maslinovom lišću sadnica prihranjivanih standardnom otopinom bez cinka su oleuropein (6,2 g/kg suhe tvari u listu), oleanolična kiselina (2,7 g/kg suhe tvari u listu) i luteolin-7-*O*-glikozid (345,4 mg/kg suhe tvari u listu).
3. Višestruko povećana koncentracija cinka u standardnoj hranjivoj otopini statistički značajno povisuje maseni udio oleuropeina i luteolin-7-*O*-glikozida u lišću maslina u hidroponskom uzgoju.

Hidroponski sustavi uzgoja prikladni su za istraživanje različitih gnojidbenih tretmana. Višestruko povećanje koncentracije cinka u hranjivoj otopini doprinosi porastu sadnica maslina i povećanju ukupnih identificiranih fenolnih tvari u lišću (za 30%). Dobiveni rezultati upućuju na to da se prihranom masline cinkom dobiva lišće bogatije fenolnim tvarima koje se može koristiti za proizvodnju čajeva, za dobivanje prirodnih prehrambenih aditiva i dodataka prehrani.

## 7. LITERATURA

1. Alloway, B. J. (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 31(5), 537-548.
2. Barrameda-Medina, Y., Blasco, B., Lentini, M., Esposito, S., Baenas, N., Moreno, D. A., & Ruiz, J. M. (2017). Zinc biofortification improves phytochemicals and amino-acidic profile in Brassica oleracea cv. Bronco. *Plant science*, 258, 45-51.
3. Bartolini, G., & Petruccelli, R. (2002). *Classification, origin, diffusion and history of the olive*. Food & Agriculture Org.
4. Başar, H., & Gürel, S. (2016). The influence of Zn, Fe and B applications on leaf and fruit absorption of table olive “Gemlik” based on phenological stages. *Scientia horticulturae*, 198, 336-343.
5. Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A. D. R. J., & Del Río, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food chemistry*, 68(4), 457-462.
6. Brentlinger, D. J. (2005). New trends in hydroponic crop production in the US. In *International Conference and Exhibition on Soilless Culture: ICESC 2005*, 742, 31-33.
7. Carvalho, R. P. D., Cruz, M. D. C. M. D., Oliveira, A. F. D., & Fagundes, M. C. P. (2013). Teores de nutrientes de dois cultivares de oliveira durante o crescimento vegetativo e o florescimento. *Revista Ceres*, 60(4), 569-576.
8. Chatzistathis, T., Therios, I., & Alifragis, D. (2009). Differential uptake, distribution within tissues, and use efficiency of manganese, iron, and zinc by olive cultivars Kothreiki and Koroneiki. *HortScience*, 44(7), 1994-1999.
9. Del Río, J. A., Báidez, A. G., Botía, J. M., & Ortuño, A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora*. *Food Chemistry*, 83(1), 75-78.
10. Doran, İ., Koca, K. Y., Pekkolay, B., & Mungan, M. (2008). The nutrient status of the olive trees grown in Derik province. *Journal of the Faculty of Agriculture of Akdeniz University (Turkey)*.
11. El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L., & Luque de Castro, M. D. (2011). Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), 692-707.
12. Escobar, R. F., Parra, M. A., Navarro, C., & Quilez, O. A. (2009). Foliar diagnosis as a guide to olive fertilization. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1, 212-223.
13. Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F., & Morozzi, G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil,

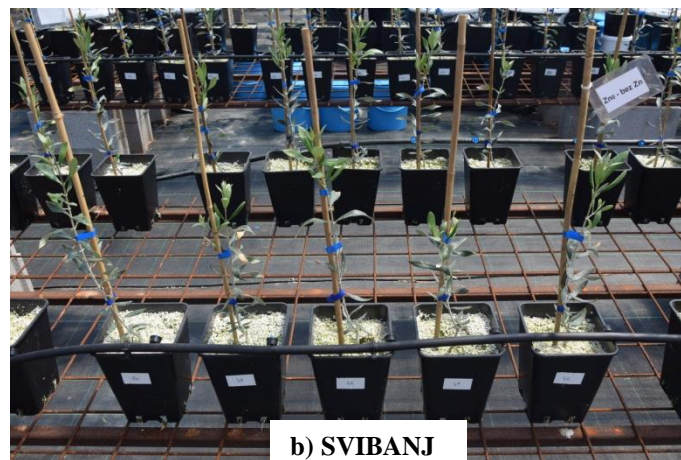
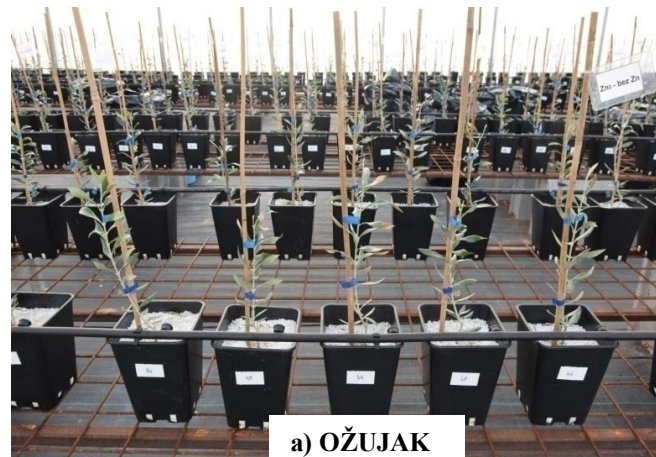
- hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *The Journal of Nutrition*, 138(8), 1411-1416.
14. Fernández-Escobar, R. (2019). Olive nutrition and tolerance to abiotic and biotic stresses. *Frontiers in plant science*, 10, 1151.
  15. Fernández-Escobar, R., Sánchez-Zamora, M. A., García-Novelo, J. M., & Molina-Soria, C. (2015). Nutrient removal from olive trees by fruit yield and pruning. *HortScience*, 50(3), 474-478.
  16. García-López, J. I., Niño-Medina, G., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldivar, R. H., Barriga-Castro, E. D., Vázquez-Alvarado, R., Rodríguez-Salinas, P. A., & Zavala-García, F. (2019). Foliar application of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate boosts the content of bioactive compounds in Habanero peppers. *Plants*, 8(8), 254.
  17. Guinda, Á., Castellano, J. M., Santos-Lozano, J. M., Delgado-Hervás, T., Gutiérrez-Adánez, P., & Rada, M. (2015). Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 431-438.
  18. Hafeez, B., Khanif, Y. M., & Saleem, M. (2013). Role of zinc in plant nutrition-a review. *Journal of Experimental Agriculture International*, 3(2), 374-391.
  19. Haifa Group (2019). Crop guide, Olive trees nutrition (Pristupljeno 14. Travanj 2020.) Dostupno na: <https://www.haifa-group.com/olives-fertilizer/crop-guide-olive-trees-nutrition>
  20. Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultura lexperiment station*, 347 (2).
  21. Ikeda, H., Koohakan, P., & Jaenaksorn, T. (2001, April). Problems and countermeasures in there-use of the nutrients olution in soilless production. In *International Symposium on Design and Environmental Controlof Tropical and Subtropical Greenhouses 578*, 213-219.
  22. Kaeidi, A., Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Abbasnejad, M., Rasoulian, B., Hajjalizadeh, Z., & Afrazi, S. (2011). Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: in vitro and in vivo studies. *Journal of ethnopharmacology*, 136(1), 188-196.
  23. Laura, A., Alvarez-Parrilla, E., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (Eds.). (2009). *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. John Wiley & Sons, 89-101.
  24. Lee, S., & Lee, J. (2015). Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems: type sand characteristics of hydroponic food production methods. *Scientia Horticulturae*, 195, 206-215.
  25. Manzocco, L., Foschia, M., Tomasi, N., Maifreni, M., Dalla Costa, L., Marino, M., Cortella, G., & Cesco, S. (2011). Influence of hydroponic and soil cultivation on quality and shelf life of ready-to-eat lamb's lettuce (*Valerianellalocusta* L. Laterr). *Journal ofthe Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1373-1380.

26. Meharg, A. (2012). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. *Experimental Agriculture*, 48(2), 305-305.
27. Molina-Alcaide, E., & Yáñez-Ruiz, D. R. (2008). Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 247-264.
28. Nichols, M. A. (2006). Berry fruit in Belgium. *Pract. Hydroponics Green houses*, 90, 41-46.
29. Obied, H. K., Prenzler, P. D., Omar, S. H., Ismael, R., Servili, M., Esposto, S., Taticchi, A., Selvaggini, R., & Urbani, S. (2012). Pharmacology of olive biophenols. In *Advances in molecular toxicology*, 6, 195-242.
30. Ortega-García, F., & Peragón, J. (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1565-1573.
31. Pasković, I., Herak Ćustić, M., Pecina, M., Bronić, J., Ban, D., Radić, T., Pošćić, F., Jukić Špika, M., Soldo, B., Palčić, I., & Goreta Ban, S. (2019). Manganese soil and foliar fertilization of olive plantlets: the effect on leaf mineral and phenolic content and root mycorrhizal colonization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 360-367.
32. Peršurić, Ž., Saftić, L., Klisović, D., & Pavelić, S. K. (2019). Polyphenol-based design of functional olive leaf infusions §. *Food technology and biotechnology*, 57(2), 171.
33. Putra, P. A., & Yuliando, H. (2015). Soilless culture system to support water use efficiency and product quality: a review. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 3(1), 283-288.
34. Quirantes-Piné, R., Lozano-Sánchez, J., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). HPLC–ESI–QTOF–MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochemical Analysis*, 24(3), 213-223.
35. Rahmanian, N., Jafari, S. M., & Wani, T. A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology*, 42(2), 150-172.
36. Rosignoli, P., Fuccelli, R., Fabiani, R., Servili, M., & Morozzi, G. (2013). Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(8), 1513-1519.
37. Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 147-176.
38. Sanzani, S. M., Schena, L., Nigro, F., Sergeeva, V., Ippolito, A., & Salerno, M. G. (2012). Abiotic diseases of olive. *Journal of Plant Pathology*, 94(3), 469-491.

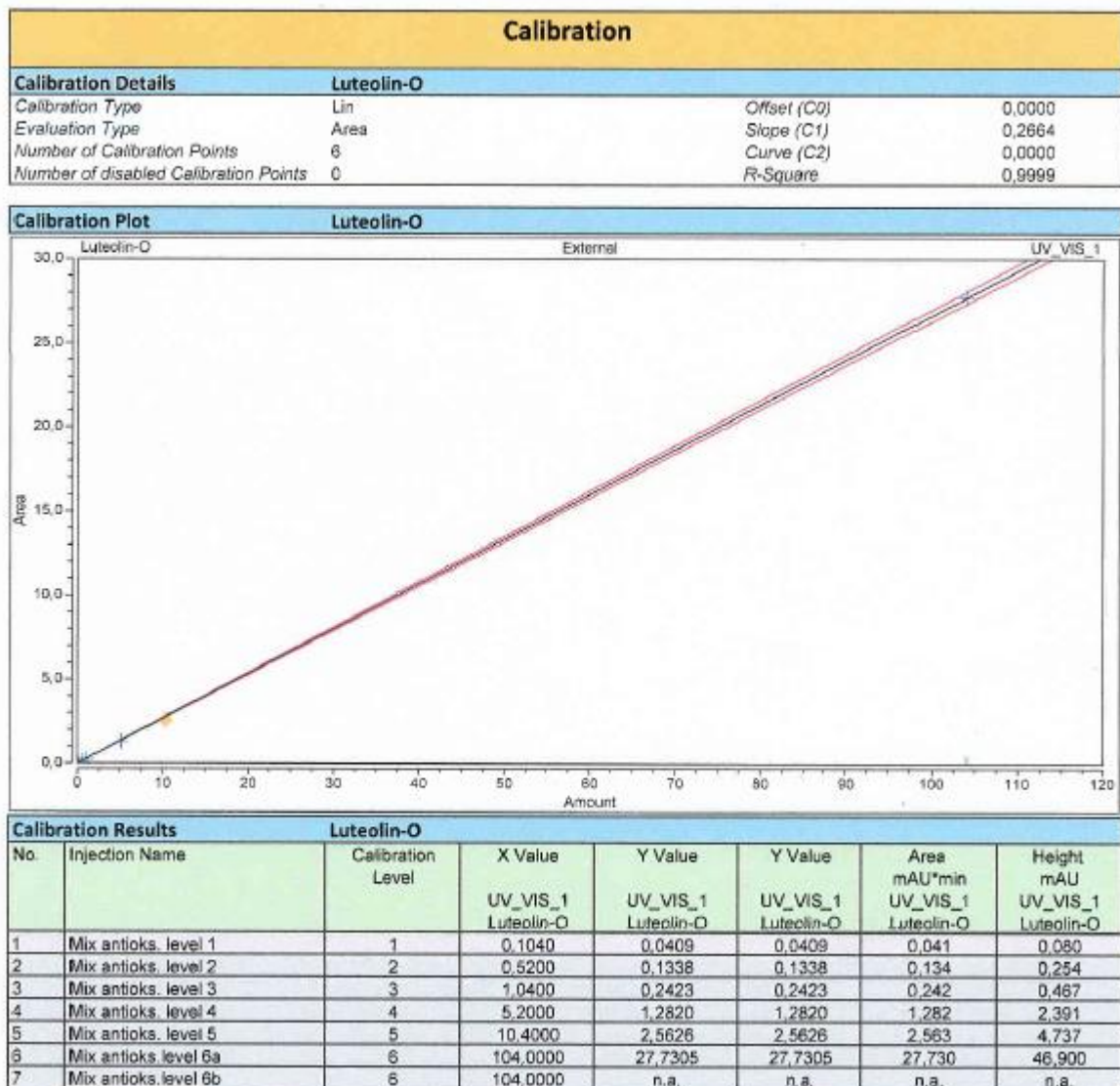


39. Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., & Boas, L. V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 12(5), 385-395.
40. Song, C. Z., Liu, M. Y., Meng, J. F., Chi, M., Xi, Z. M., & Zhang, Z. W. (2015). Promoting effect of foliage sprayed zinc sulfate on accumulation of sugar and phenolics in berries of *Vitis vinifera* cv. Merlot growing on zinc deficient soil. *Molecules*, 20(2), 2536-2554.
41. Souza, F. B. M. D., Coelho, V. A. T., Pio, R., Rodas, C. L., Silva, I. P. D., Melo, E. T. D., & Farias, D. D. H. (2019). Visual symptoms and nutritional deficiencies in olive plants subjected to nutrient deprivation. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 41.
42. Talhaoui, N. (2016). Analytical, agronomic, and biological evaluation of phenolic compounds in *olea europaea* products and by-products. Doctoral thesis, University of Granada.
43. Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.
44. Tavallali, V., Rahmati, S., & Bahmanzadegan, A. (2017). Antioxidant activity, polyphenolic contents and essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. as affected by zinc fertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(14), 4883-4889.
45. Tekaya, M., El-Gharbi, S., Mechri, B., Chehab, H., Bchir, A., Chraief, I., Ayachi, M., Boujnah, D., Attia, F., & Hammami, M. (2016). Improving performance of olive trees by the enhancement of key physiological parameters of olive leaves in response to foliar fertilization. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 101.
46. Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majò, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews*, 18(1), 98-112.
47. Vishekaii, Z. R., Soleimani, A., Fallahi, E., Ghasemnezhad, M., & Hasani, A. (2019). The impact of foliar application of boron nano-chelated fertilizer and boric acid on fruit yield, oil content, and quality attributes in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 257, 108689.
48. Vogel, P., Machado, I. K., Garavaglia, J., Zani, V. T., de Souza, D., & Dal Bosco, S. M. (2015). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutrición hospitalaria*, 31(3), 1427-1433.
49. Wang, L., Geng, C., Jiang, L., Gong, D., Liu, D., Yoshimura, H., & Zhong, L. (2008). The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis. *European journal of nutrition*, 47(5), 235-243.
50. White, P. J. (2012). Long-distance transport in the xylem and phloem. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, Academic Press, 49-70.

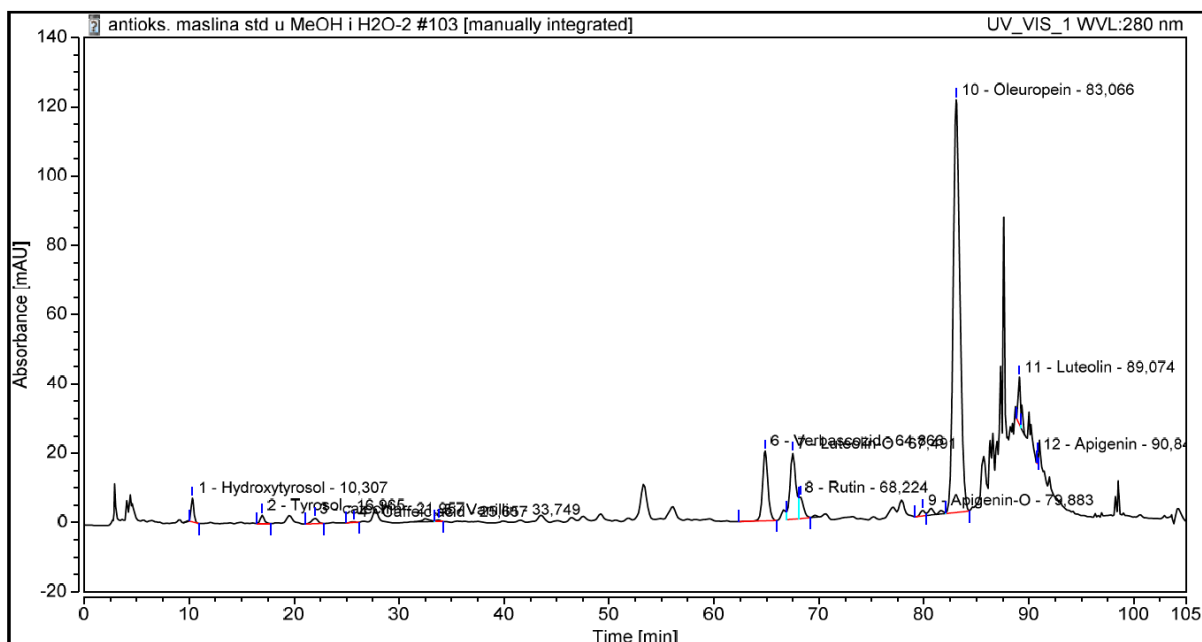
## PRILOZI



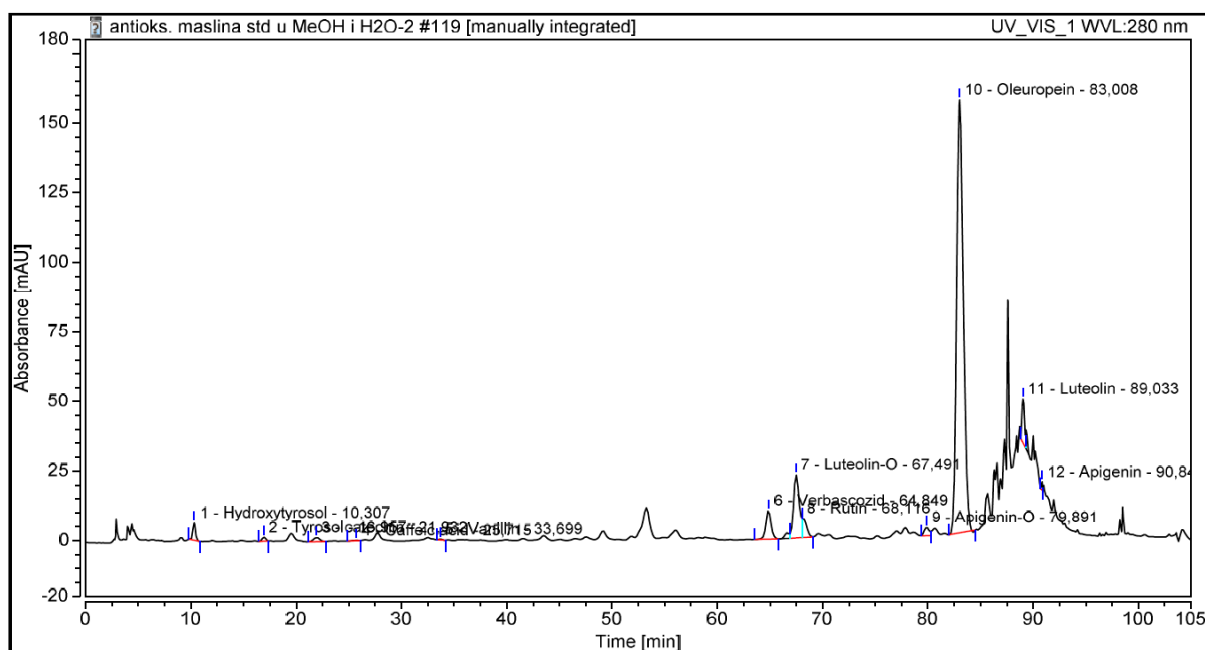
**Slika 18.** Sadnice maslina prihranjivane hranjivom otopinom bez cinka ( $\text{Zn } 0 \mu\text{M}$ ) u a) ožujku, b) svibnju i c) srpnju 2019. godine.



Slika 19. Baždarni pravac za kvantifikaciju luteolin-7-O-glukozi.



a)



b)

**Slika 20.** Kromatogrami fenolnog ekstrakta od a) lišća sadnica maslina prihranjivanih hranjivom otopinom bez cinka ( $Zn\ 0\ \mu M$ ) b) lišća sadnica maslina prihranjivanih hranjivom otopinom s povećanom koncentracijom cinka ( $Zn\ 32\ \mu M$ ). Detekcija fenolnih tvari pri 280 nm.

## POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b> Osnovni tipovi hidroponskog uzgoja (a) kapilarni hidroponski uzgoj (b) kapajući sistem (c) sistem oseke i plime (d) sustav vodene kulture (e) tehnika hranjivog filma (f) aeroponski uzgoj (Lee i Lee, 2015).....	4
<b>Slika 2.</b> Biosinteza fenolnih tvari putem šikiminske kiseline (prilagođeno prema Talhaoui, 2016).....	8
<b>Slika 3.</b> Priprema supstrata za sadnju maslina sorte Istarska bjelica u plastičnim posudama.	16
<b>Slika 4.</b> Izgled plastenika za vrijeme postavljanja pokusa.....	17
<b>Slika 5.</b> Postavljena zaštitna folija koje sprječava razvoj algi u supstratu.....	17
<b>Slika 6.</b> Označavanje i mjerenje vegetativnog prirasta maslina. ....	18
<b>Slika 7.</b> Uzorkovanje stabljike masline s listovima. ....	19
<b>Slika 8.</b> Odvajanje lista od stabljike.....	19
<b>Slika 9.</b> Centrifugalni mlin za mljevenje uzoraka maslinovog lišća.....	20
<b>Slika 10.</b> Samljeveni uzorci maslinovog lišća. ....	20
<b>Slika 11.</b> Ekstrakti maslinovog lišća.....	21
<b>Slika 12.</b> Maseni udio (mg/kg s.t.) oleanolične kiseline, oleuropeina i ukupnih fenola u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 $\mu$ M, Zn 32 $\mu$ M). ....	26
<b>Slika 13.</b> Maseni udio (mg/kg s.t.) A) apigenina i apigenin-7-O-glukozida, B) luteolina i luteolin-7-O-glukozida u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 $\mu$ M, Zn 32 $\mu$ M).....	27
<b>Slika 14.</b> Maseni udio (mg/kg s.t.) katehina i rutina u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 $\mu$ M, Zn 32 $\mu$ M).....	28
<b>Slika 15.</b> Maseni udio (mg/kg s.t.) hidroksitirosola i tirosola u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 $\mu$ M, Zn 32 $\mu$ M).....	29
<b>Slika 16.</b> Maseni udio (mg/kg s.t.) vanilinske kiseline i vanilina u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 $\mu$ M, Zn 32 $\mu$ M).....	29
<b>Slika 17.</b> Maseni udio (mg/kg s.t.) verbaskozida u lišću maslina dobivenih od sadnica tretiranih hranjivom otopinom bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 0 $\mu$ M, Zn 32 $\mu$ M). ....	30
<b>Slika 18.</b> Sadnice maslina prihranjivane hranjivom otopinom bez cinka (Zn 0 $\mu$ M) u a) ožujku, b) svibnju i c) srpnju 2019. godine.....	40
<b>Slika 19.</b> Baždarni pravac za kvantifikaciju luteolin-7-O-glukozida.....	41
<b>Slika 20.</b> Kromatogrami fenolnog ekstrakta od a) lišća sadnica maslina prihranjivanih hranjivom otopinom bez cinka (Zn 0 $\mu$ M) b) lišća sadnica maslina prihranjivanih hranjivom otopinom s povećanom koncentracijom cinka (Zn 32 $\mu$ M). Detekcija fenolnih tvari pri 280 nm. ....	42

## POPIS TABLICA

<b>Tablica 1.</b> Fenolne tvari u maslinovom lišću (Rahmanian i sur. 2015).....	10
<b>Tablica 2.</b> Sastav i koncentracije u standardnoj Hoaglandovoj otopini i hranjivim otopinama bez cinka i s povećanom koncentracijom cinka. ....	13
<b>Tablica 3.</b> Standardi fenolnih tvari. ....	14
<b>Tablica 4.</b> Primijenjeni uvjeti i sastav pokretnih faza tijekom gradijentnog eluiranja. ....	22
<b>Tablica 5.</b> Valne duljine za detekciju pojedinih fenolnih spojeva. ....	23
<b>Tablica 6.</b> Broj nodija i listova na sadnici te prirast sadnice kod gnojidbenih tretmana bez cinka i (Zn 0 $\mu$ M) i s povećanom koncentracijom cinka (Zn 32 $\mu$ M) u hranjivoj otopini. ....	25

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 29. ožujka 1997. u Puli. Od 2003. do 2011. godine, pohađala sam Osnovnu školu Vladimira Gortana u Žminju. Po završetku osnovnoškolskog obrazovanja, upisujem opću gimnaziju Gimnazija Pula, koju pohađam do 2015. godine. Nakon položene državne mature, 2015. godine upisala sam Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Status sveučilišnog prvostupnika sanitarnog inženjerstva ostvarujem 2018. godine, te iste godine upisujem Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na istoimenom fakultetu. Tijekom svog diplomskog studija aktivno sam sudjelovala u projektu studenata sanitarnog inženjerstva *Čiste ručice* te obavljala demonstrature na katedri za Medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju. U rujnu, 2019. godine sudjelovala sam u organizacijskom odboru 3. studentskog kongresa *Okolišnog zdravlja*.