

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 22. rujna 2021.

Angela Vujnović, 1378/PI

**ENDOGENI ENZIMI PLODA
MASLINE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Dubravke Škevin, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc.dr.sc. Klare Kraljić i tehničke suradnice Melise Trputec.



„Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom “Utjecaj inovativnih tehnologija na nutritivnu vrijednost, senzorska svojstva i oksidacijski stabilnost djevičanskih maslinovih ulja iz hrvatskih autohtonih sorti maslina“ (HRZZ CROInEVOO, IP-2020-02-7553)

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem prof.dr.sc. Dubravki Škevin što me prihvatila za izradu diplomskog rada, sveukupnoj pomoći i savjetima pri izradi diplomskog rada te doc.dr.sc. Klari Kraljić na cjelokupnoj pomoći pri provedbi eksperimentalnog rada meni dosada nepoznatog područja, pružanju savjeta te strpljenju i podršci. Veliki dio diplomskog rada ne bi bio ostvaren bez pomoći tehničke suradnice Melise Trputec i kolege Kristiana Pavlića uz koje sam mnogo naučila i uljepšali su mi vrijeme provedeno u laboratoriju.

Osobito se zahvaljujem obitelji i prijateljima koji su bili uz mene svaki korak studiranja, bez njih ne bih bila tu gdje sam sad

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ENDOGENI ENZIMI PLODA MASLINE

Angela Vujnović, 1378

Sažetak: Provedene su ekstrakcije enzima β -glukozidaze i lipoksigenaze iz pulpe i tijesta maslina hrvatske sorte Oblica smrznutih na dva različita temperatura režima ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ispitivanje aktivnosti β -glukozidaze se određivalo spektrofotometrijski na 405 nm , a lipoksigenaze na 234 nm . Spektrofotometrijska analiza nije pokazala aktivnost β -glukozidaze u tijestu i pulpi, dok je najveća aktivnost lipoksigenaze zabilježena u uzorcima tijesta smrznutih na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti β -glukozidaze iz badema (*Prunus Dulcis*) o varijacijama koncentracija p-nitrofenil glukopiranozida je rezultiralo u Michaelis Menten krivuljom s K_m $18,1204\text{ mmol L}^{-1}$ i V_{max} $3,6152\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}\text{ min}^{-1}$. Ovisnost aktivnosti sojine lipoksigenaze (*Glycine Max*) o varijacijama koncentracija linolenske masne kiseline je rezultiralo Michaelis Menten krivuljom s K_m $6,2800\text{ mmol L}^{-1}$ i V_{max} od $5,599\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}\text{ min}^{-1}$, dok s linolnom nije pokazalo Michaelis Menten krivulju. Aktivnost β -glukozidaze je proporcionalna s koncentracijom enzima, dok se kod lipoksigenaze nije uspjela utvrditi ovisnost bez obzira na supstrat.

Ključne riječi: pulpa masline, maslinovo tijesto, Oblica, β -glukozidaza, lipoksigenaza

Rad sadrži: 51 stranica, 16 slika, 6 tablica, 73 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof.dr.sc. Dubravka Škevin*

Pomoć pri izradi: *doc.dr.sc. Klara Kraljić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Sandra Albino*
2. Prof.dr.sc. *Dubravka Škevin*
3. Izv.prof.dr.sc. *Igor Stuparević*
4. Doc.dr.sc. *Marko Obranović* (zamjena)

Datum obrane: 22. rujna, 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat technology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

ENDOGENOUS ENZYMES IN OLIVE FRUIT

Angela Vujnović, 0058209405

Abstract: Extraction of β -glucosidase and lipoxygenase from pulp and paste of Croatian olive cultivar Oblica frozen at two different temperature regimes (-20 °C i -80 °C). β -glucosidase activity assay was determined at 405 nm and lipoxygenase activity at 234 nm. Spectrophotometric analysis did not determine β glucosidase activity, while the highest lipoxygenase activity was determined in olive paste frozen at -20°C. A study of dependence of almond β -glucosidase (*Prunus Dulcis*) activity on variations of p-nitrophenil glucopiranoside concentrations resulted in Michaelis Menten curve with K_m 18,1204 mmol L⁻¹ i V_{max} 3,6152 μ mol mL⁻¹ min⁻¹. Dependence of soy bean lipoxygenase (*Glycine Max*) activity on variations of linolenic acid resulted in Michaelis Menten curve with K_m 6,2800 mmol L⁻¹ i V_{max} 0,5504 μ mol/mL min, while on variation of linoleic acid concentrations did not result in Michaelis Menten curve. β glucosidase acitivity is proportional to the enzyme concentration, while lipoxygenase acitivity dependence was not determined regardless of the substrate

Keywords: *olive pulp, olive paste, Oblica, β -glucosidase, lipoxygenase*

Thesis contains: 51 pages, 16 figures, 6 tables, 73 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. *Dubravka Škevin*, Full profesor

Technical support and assistance: PhD. *Klara Kraljić*, Assistant Professor

Reviewers:

1. PhD. *Sandra, Balbino*, Full professor
2. PhD. *Dubravka, Škevin*, Full professor
3. PhD. *Igor, Stuparević*, Associate professor
4. PhD. *Marko, Obranović*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 22 th September, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MASLINA.....	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV PLODA MASLINE.....	3
2.3. ENDOGENI ENZIMI U PLODU MASLINE	4
2.4. PROCES PROIZVODNJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA	9
2.5. DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI.....	14
3.2. REAGENSI	15
3.3. APARATURA I PRIBOR.....	16
3.4. METODE	17
3.4.1. Određivanje enzimske aktivnosti β -glukozidaze.....	17
3.4.1.1. Priprema otopina.....	17
3.4.1.2. Postupak ekstrakcije β -glukozidaze	17
3.4.1.3. Postupak UV-VIS spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti β -glukozidaze prema Romero-Segura	18
3.4.1.4. Postupak određivanja aktivnosti β -glukozidaze prema Ramírez.....	18
3.4.2. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze	19
3.4.2.1. Priprema otopina	19
3.4.2.2. Postupak izolacije lipoksigenaze.....	20
3.4.2.3. Postupak UV-VIS spektrofotometrijskog određivanja lipoksigenazne aktivnosti	20
3.4.2.3.1. Izračun aktivnosti enzima	21
3.4.2.3.2. Određivanje proteina metodom po Bradfordu	22
3.4.2.3.2.1. Priprema otopina.....	22
3.4.2.3.2.2. Postupak određivanja proteina	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI β -GLUKOZIDAZE METODOM PO ROMERO-SEGURA	24
4.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI β -GLUKOZIDAZE PREMA RAMÍREZ	26
4.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI β -GLUKOZIDAZE U PULPI I TIJESTU SMRZNUTIM PRI RAZLIČITIM REŽIMIMA SMRZAVANJA PREMA ROMERO-SEGURA	27
4.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPOKSIGENAZE U PULPI I TIJESTU SMRZNUTIM PRI RAZLIČITIM REŽIMIMA SMRZAVANJA	29
4.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI OTOPINE LIOFILIZIRANE β -GLUKOZIDAZE	32
4.5.1. Ovisnost aktivnosti β -glukozidaze o koncentraciji enzima	32
4.5.2. Ovisnost aktivnosti β -glukozidaze o koncentraciji supstrata	33
4.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI OTOPINE LIOFILIZIRANE LIPOKSIGENAZE.....	36
4.6.1. Određivanje aktivnosti otopine liofilizirane lipoksigenaze pri različitim vremenima enzimske reakcije	36
4.6.2. Ovisnost aktivnosti lipoksigenaze o koncentraciji enzima.....	38
4.6.3. Ovisnost aktivnosti lipoksigenaze o koncentraciji supstrata	39
5. ZAKLJUČAK	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

Maslina je vrsta karakteristična za mediteransko podneblje i predstavlja temelj mediteranske prehrane. Uzgoj i konzumacija maslina i maslinovog ulja nije više ograničena na Mediteran i raste iz godine u godinu u ostatku svijeta zbog jedinstvenih senzorskih karakteristika i kemijskog sastava. Nutraceutička vrijednost maslina i maslinovog ulja se prepisuje fitokemikalijama među kojima su od najveće važnosti polifenoli.

Osim na biološku vrijednost i senzorski profil, polifenoli iz plodova znatno utječu na povišenje antioksidacijske stabilnosti ulja. Iz navedenih razloga, koncentracija polifenola u konačnom proizvodu je važan parametar u vođenju tehnološkog procesa. Polifenolni sastav i količina ovise o temperaturi, vremenu i prisutnosti zraka u tehnološkom procesu. Navedeni parametri utječu na aktivnost enzima koji su uključeni u sintezu i transformaciju polifenola i drugih fitokemikalija.

Najvažniji endogeni enzimi ploda masline su pektolitički i hemicelulotički enzimi, lipaze, fosfolipaze, galaktolipaze te β -glukozidaza, esteraze, polifenoloksidaze, lipoksigenaze, hidroperoksid liaza i peroksidaze. Pravilno vođenje tehnološkog procesa dovodi do optimalnog djelovanja enzima i time do povišenja iskorištenja izdvajanja ulja i oblikovanja senzorskog i antioksidacijskog profila konačnog proizvoda, no pojedini enzimi u nekontroliranim uvjetima kataliziraju sinteze nestabilnih produkata koji posljedično izazivaju degradaciju spojeva u ulju što se u konačnici može odraziti na senzorska i antioksidacijska svojstva.

Ciljevi ovog diplomskog rada su:

- ekstrahirati lipoksigenazu i β -glukozidazu iz maslinovog tijesta i pulpe smrznutih na različite temperature te odrediti njihove kvalitativne i kvantitativne aktivnosti,
- usporediti i validirati metode određivanja aktivnosti enzima i
- odrediti ovisnost aktivnosti enzima o koncentraciji supstrata i enzima

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MASLINA

Maslina (*Olea europea L.*) je zimzelena kultura koja pripada porodici *Oleaceae*. Gospodarski je drugi najvažniji plod za proizvodnju ulja nakon palme (Baldoni i Belaj, 2009). Podrijetlo rasta i uzgoja masline je Mediteran i Mala Azija, no domestificirana je i u drugim dijelovima svijeta kao što su Sjeverna i Južna Amerika.

Mediteranske zemlje su vodeće u svijetu u uzgoju i preradi maslina na čelu sa Španjolskom, Italijom i Grčkom sa 72 %, a Hrvatska se nalazi na 17. mjestu po proizvodnji maslinovog ulja s proizvodnjom manjom od 1 % (Soldo, 2016).

Maslina može dosegnuti visinu od 8 do 10 m na hrvatskom području, dok na područjima zaštićenim od vjetra može narasti i više (Kantoci, 2006).

Rast masline uspjeva se u umjereno toplim krajevima gdje se temperatura rijetko spušta ispod 0 °C. Listovi su mali, dugi i kožnati, a cvjetovi su bijelo-žućkaste boje i nakon cvatnje i oplodnje se razvije tehnološko i nutritivno najvrijedniji dio masline plod.



Slika 1. Plod masline sorte Oblica (Anomynus 1)

Osnovni dijelovi ploda masline (Slika 1) su kožica (epikarp), pulpa (mezokarp) i koštica (endokarp) sa sjemenkom. Kožica se sastoji od epidermalnih stanica koje su obložene masnom-voštanom prevlakom i u najvećoj količini sadrži tvari boje između kojima se kao

najvažniji mogu izdvojiti klorofil, ksantofili, karoteni i antocijani. Pulpa ploda je sastavljena od stanica čija stanična stijenka je sastavljena od celuloze, pektina i hemiceluloze (Koprivnjak, 2006). U vakuolama se nalazi ulje koje se nalazi u obliku mjehurića s membranom koja ga odvaja od ostatka vodenog dijela citoplazme. Sjemenka masline u sebi sadrži značajan udjel ulja koje se u najvećoj mjeri citoplazmatsko u obliku sitnih kapljica.

Prosječna masa kreće u rasponu od 2 do 12 g, no u pojedinim sorta može dosegnuti i do 20 g (Boskou, 2005). Faktori koji imaju u najvećoj mjeri utjecaj na masu ploda su genetičke karakteristike sorte i uvjeti uzgoja (Koprivnjak, 2006). Zabilježeno je postojanje oko 2600 različitih sorta maslina od čega su 600 njih talijanskog podrijetla (Muzzalupo i sur., 2014). Talijanske sorte velike primjene su: Minuta, Ottobratica, Calabrese, Ogliarola, Baddarica, Leccino, Pendolino, Frantoio i mnogobrojne druge. Hrvatske autohtone sorte od najvećeg značaja su Drobница, Lastovka, Levantinka i Oblica (Vuletin Selak i sur., 2011). Oblica (Slika 1) je sorta s udjelom ulja do 21 % i mase ploda 14 g što je čini povoljnom za proizvodnju maslinovog ulja i stolnih maslina (Strikić i sur., 2007). Karakterizira je velika otpornost prema zimi i suši, no prirod Oblice je neredovit i neujednačen (Strikić i sur., 2009). Djevičanska maslinova ulja proizvedena od sorte Oblica pokazuju više udjele oleinske i linolenske masne kiseline u odnosu na ona od Levantinke i Lastovke (Žanetić i sur., 2010).

2.2. KEMIJSKI SASTAV PLODA MASLINE

U Tablici 1. je prikazan prosječni kemijski sastav zelenih maslina. Najveći udio ploda maslina čine voda do 60 do 75 % i ulje od 10 do 25 % (Guo i sur., 2017). Šećeri prisutni u plodu su glukoza, fruktoza i manoza (Nergiz i Engez, 2000) u prosjeku od 2 do 5 %, a ostale važne komponente su flavonoidi (luteolin, apigenin i rutin) i antocijani. Jednostavni šećeri su supstrati za provođenje mliječno kiselog vrenja i oni tijekom prerade ne prelaze u ulje zbog netopljivosti, no u plodovima produkti mikrobne razgradnje šećera (kiseline, alkoholi) mogu postati nepoželjni sastojci ulja (Koprivnjak, 2006).

Uz šećere, u vodenom dijelu citoplazme stanica pulpe se nalaze organske kiseline, enzimi i fenoli. Od organskih kiselina u plodu masline su od najvećeg značaja limunska, jabučna i oksalna kiselina i doprinose pH pulpe u rasponu od 4,5 do 5. Fenolne tvari (fenolne kiseline, alkoholi i sekoiridoidi) se u stanicama pulpe nalaze kao nakupine i imaju više brojne uloge u plodu masline. Osim primarne zaštitne uloge od mikroorganizama, nametnika i biljoždera,

biofenoli se navode kao važna sastavna komponenta u povezivanju lanaca polisaharida i time pridonose čvrstoći (Koprivnjak, 2006). Biofenoli se javljaju u pulpi, sjemenci i pokožici najznačajniji predstavnici su oleuropein, verbaskozid, ligstrozid i demetiloleuropein (Soler-Rivas i sur., 2000). Polifenolni sastav ploda masline ovisi o mnogobrojnim faktorima kao što su sorta, dinamika zrenja, klimatski uvjeti i tehnike brige (Cirilli i sur., 2017).

Oleuropein je biofenol od najveće važnosti u maslini i maseni udjeli u suhoj tvari mladih maslina mogu doseći vrijednost do 140 mg g⁻¹, a kod listova 60 do 90 mg g⁻¹ (Haris Omar, 2010). Koncentracija oleuropeina pokazuje tendenciju smanjenja u plodovima tijekom zrenja, dok u listovima povećanje (Ortega-García i sur., 2017). Koncentracija oleuropeina je indikator fenolnog zrenja plodova. Pripada grupi spojeva zvanim sekoiridoidi koji su, osim u porodici *Oleaceae*, prisutni također u *Gentianaceae* i *Cornaleae*. Sekoiridoidi su produkti sekundarnog metabolizma terpena u pulpi, perikarpu i sjemenci (Lanza i Nimfali, 2020).

Kemijska struktura drugih navedenih polifenola je: verbaskozid ester kafeinske kiseline i hidroksitirosola, ligstrozid je sekoiridoid, a demetiloleuropein kiseli derivat oleuropeina. Pošto demetiloleuropin nije prisutan u svakoj sorti, njegova prisutnost može poslužiti kao identifikacija sorte (Soler-Rives i sur., 2000). U sjemenci masline je identificiran fenol nuzhenid koji je tamo prisutan kroz cijeli stadij zrenja (Servili i sur., 1999).

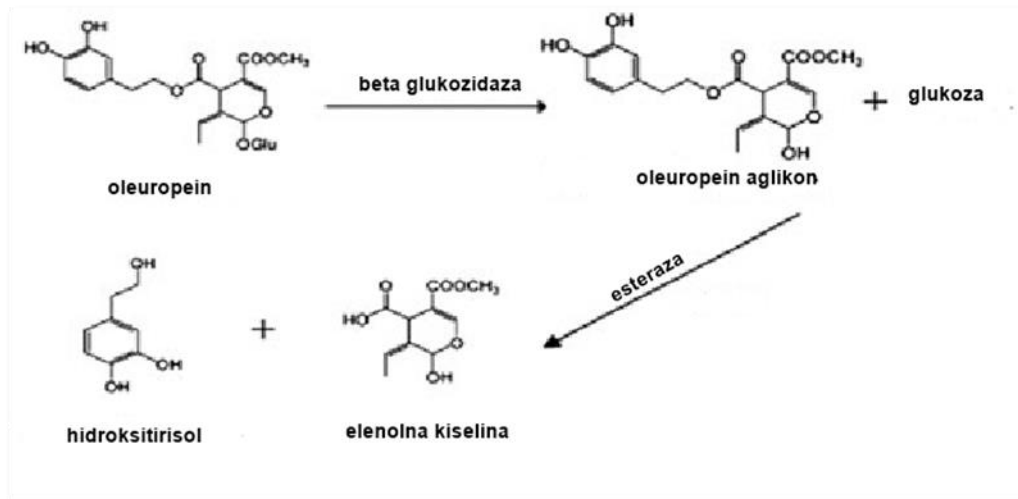
2.3. ENDOGENI ENZIMI U PLODU MASLINE

Tablica 1. Raspoređenost enzima u plodu i posljedica djelovanja (Koprivnjak, 2006)

Vrsta enzima	Endogeni enzimi	Glavni izvor	Posljedice djelovanja
Hidrolaze	lipaze	pulpa i sjemenka	Hidroliza triacilglicerola i oslobađanje masnih kiselina
	glukozidaze	Pulpa	Odvajanje šećera iz fenolnih glukozida pri čemu nastaju fenolni aglikoni koji su topljiviji u ulju
	Celulaze, poligalakturonaze,	Pulpa	Razgradnja celuloze, hemiceluloze i pektina;

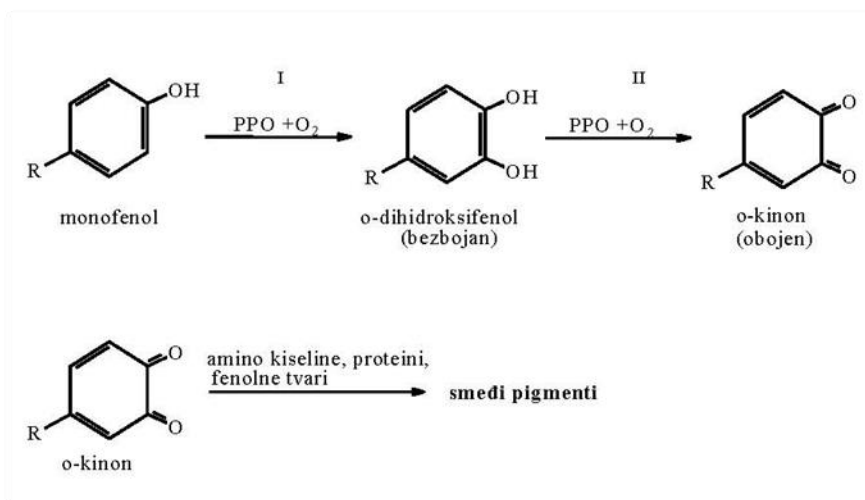
	pektin- metilesteraze		razgradnja stanične stijenke i time olakšavanja izdvajanja ulja
oksidoreduktaze	polifenoloksidaze	Pulpa	Oksidacija (degradacija) fenolnih tvari
	peroksidaze	Sjemenka	
	lipoksigenaze	pulpa i sjemenka	Oksidacija slobodnih masnih kiselina-početak niza enzimskih reakcija kojima nastaju poželjne tvari arome

U Tablici 2. su prikazani najvažniji enzimi prisutni u plodu masline i njihovo posljedično djelovanje na plod i maslinovo ulje. Na njihovu aktivnost utječu način vođenja tehnološkog procesa i genetske karakteristike masline (Veneziani i sur., 2015). Enzimi celulaze, poligalakturonaze i pektin metilesteraze imaju ulogu u razgradnji komponenti staničnih stijenki što posljedično utječe na njenu degradaciju i time izdvajanje ulja tijekom proizvodnje maslinovog ulja. Lipaze kataliziraju hidrolizu triacilglicerola pri čemu se oslobađaju masne kiseline, a fosfolipaze i galaktolipaze hidrolizu fosfolipida i galaktolipid. Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju, ulje i biofenoli se nalaze u stanici u obliku nakupina u vakuoli da se zaštite od djelovanja enzima citoplazme. Glavni enzimski sustav koji katalizira i kontrolira hidrolizu fenolnih glukozida u mehanički oštećenom ili mikrobiološki kontaminiranom plodu masline su β -glukozidaze. Važnost β -glukozidaze leži u tome da katalizira hidrolizu fenolnih glukozida i time oslobađanje aglikona koji doprinose senzoricima proizvoda (Romero Segura i sur., 2009). Optimalni parametri izoliranih β -galaktozidaza su 45 °C i pH 5,5 (Koprivnjak, 2006). Glavni supstrat je oleuropein te ga slijede ligstrozid i demetiloleuropein, dok manju aktivnost pokazuje prema flavonoidima kao što su luteolin i apigenin što se može povezati s njihovom slabom topljivošću u vodi (Romero Segura i sur., 2009). Spojevi nastali fenolnih glukozida kao što je oleuropein (Slika 2) su jednostavni šećeri i aglikon koji se esterazom cijepaju na fenolne kiseline i alkohole.



Slika 2. Oleuropein i njegovi derivati nakon enzimske razgradnje β -glukozidazom i esterazom (prema Abdel- Shafy i sur., 2014)

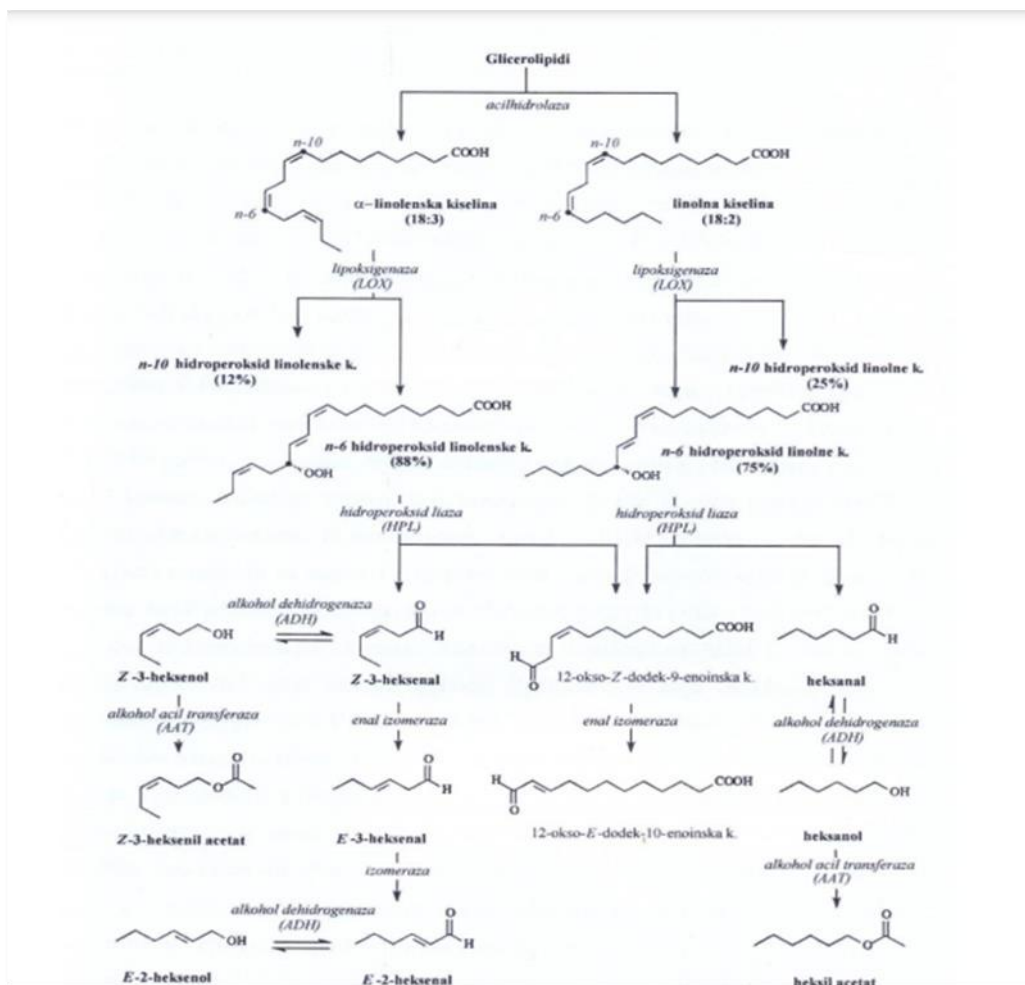
Polifenoloksidaza je glavni enzim koji sadrži bakar u strukturi i sudjeluje u oksidaciji polifenola tijekom zrenja i mehaničkog i mikrobiološkog oštećenja (García-Rodríguez i sur., 2011). Osim toga, sudjeluje u obrani biljke protiv biotičkog i abiotičkog stresa (Ortega-García i sur., 2008). Prva reakcija u oksidaciji polifenola je oksidacija monofenola u difenole, a druga oksidacija u kvinone koji mogu reagirati međusobno, te s aminima ili polifenolima pri čemu nastaju melanini nizom reakcija enzimskog posmeđivanja (Slika 3). Aktivnost polifenoloksidaze je niska u početnom razvijanju ploda, no povisuje se sa zrenjem (Cirilli i sur., 2017). Oleuropein se, djelovanjem β -glukozidaza i polifenoloksidaza, cijepa u spojeve koji imaju sposobnost denaturiranja i umrežavanja proteina te lizin-alkiliranja i posljedično štetan učinak na biljoždere, insekte i nametnike (Ortega-García i sur., 2017). Temperatura za optimalnu aktivnost polifenoloksidaze je 50°C , no pokazala je nisku stabilnost pri 40°C u velikim varijacijama među sortama masline (Taticchi i sur., 2013).



Slika 3. Slijed reakcija enzimskog posmeđivanja (Jakšić, 2013)

Peroksidaza je enzim smješten u pulpi i katalizira oksidaciju polifenola na račun peroksida nastalih lipoksigenaznim putem u visokoreaktivne radikale. Nastali produkti utječe na oksidaciju višenezasićenih masnih kiselina čiji produkti mogu dovesti do narušavanje oksidacijske stabilnosti ulja. Djelovanje peroksidaze i polifenoloksidaze je sinergističko-produkti reakcije polifenoloksidaze su supstrati peroksidaze (García-Rodríguez i sur., 2011). Sjemenka predstavlja mjesto s najvećim udjelom aktivne peroksidaze u plodu s više od 98 % (Luaces i sur., 2007a) i također je lokacija hidroperoksid dehidrataze i peroksidogene (Koprivnjak, 2006). Lipoksigenaze su uključene u lipoksigenazni put i posljedica njegovog djelovanja je stvaranje C6 i C5 spojeva koji su kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi arome djevičanskog maslinovog ulja (Luaces i sur., 2007b) i nosioci su zelenih nota. Biosinteza hlapljivih produkata lipoksigenaznog puta ovisna je o dostupnosti nezasićenih masnih kiselina i aktivnosti enzima lipoksigenaznog puta čiji su parametri sorta, zrelost masline i vođenje tehnološkog procesa (Sánchez-Ortiz i sur., 2018). Maslinovo ulje proizvedeno iz prezrelih maslina je slabijeg aromatskog karaktera zbog slabije aktivnosti enzima lipoksigenaznog puta (Servilli i sur., 2015). Osim u sintezi hlapljivih spojeva, lipoksigenaze su pokazale važnu ulogu u ostvarivanju fiziološkog odgovora na stres u početnim fazama rasta (Saras i sur., 1999). Parametri optimalnog djelovanja za lipoksigenazu je 25 °C i pH 5,0 do 5,5, a za hidroperoksid liazu temperature ispod 15 °C i pH 5,7 (Koprivnjak, 2006). Lipoksigenazni put (Slika 3) započinje acil hidrolazom koja oslobađa kiseline iz glicerolipida, zatim lipoksigenaza oksidira višenezasićene masne kiseline koje imaju u sastavu cis-cis-1,4-pentadien strukturu (arahidonska, linoleinska i linolna kiselina) do hidroperoksida (Angerosa i sur., 2000). Znanstvene spoznaje u vezi afinteta lipoksigenaze iz

masline prema linolnoj i linolenskoj su oprječne u smislu da je veći afinitet lipoksigenaze iz masline prema linolenskoj (Ranalli i sur., 2001), dok postoje rezultati kojima se dobio veći afinitet prema linolnoj (Lorenzi i sur., 2014). Različitost afiniteta enzima prema supstratima može proizaći iz toga što lipoksigenaze iz fotosintetskog tkiva imaju veći afinitet prema linolenskoj, a iz nefotosintetskog prema linolnoj (Vick, 1993). Hidroperoksid liaza je enzim smješten u kloroplastima (Salas i Sánchez, 1999) i cijepa 6-hidroperoksid i 10-hidroperoksid u cis ili trans konfiguraciji (Ridolfi i sur., 2002) u hlapljive aldehide. Alkohol dehidrogenaza, koja je koncentrirana u sjemenci (Luaces i sur., 2003), reducira aldehide do alkohola koji stupaju u esterifikaciju s acil CoA. Produkti esterifikacije katalizirane acil transferazom su hlapljivi esteri i CoA-SH. Heksanal, (E)-2-heksenal, (E)-2-heksen-1-ol, heksan-1-ol i (Z)-3-heksenil acetat su 5 indikatora odvijanja lipoksigenaznog puta i degradacije lipida te su jedni od najvažnijih hlapljivih spojeva u aromi maslinovog ulja (Muzzalupo i sur., 2012).



Slika 4. Lipoksigenazni put (LOX) nastanka tvari s poželjnim mirisnim svojstvima tijekom mljevenja i miješenja (Koprivnjak, 2006)

2.4. PROCES PROIZVODNJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja (Slika 5) se provodi u navedenom slijedu: priprema ploda masline za odvajanje ulja (pranje plodova i uklanjanje nečistoća, mljevenje i miješenje), separacija ulja iz maslinovog tijesta i stabilizacija maslinovog ulja.



Slika 5. Opća tehnološka shema proizvodnje maslinovog ulja

Masline zajedno s lišćem se transportiraju u uljaru gdje se ubacuju u koš s rešetkom. Na rešetci zaostaju ostali dijelovi biljke koji se uklanjaju provjetravanjem, a kroz koš prolaze plodovi. Uklanjanje ostalih dijelova biljke kao što su listovi i grančice mogu stvoriti probleme u proizvodnji kod rada strojeva, a i svojim prisustvom mogu utjecati negativno na senzorska svojstva i mikrobiološku stabilnost ulja. Uklanjanje lišća je češća kod primjene metalnih mlinova nego kod kamenih jer se ostvaruje veće mljevenje i time aktivna površina čime se može postići povećana difuzija tvari iz lišća u ulje. Ipak, listovi u postotku od 1 do 3 % u odnosu na ukupnu masu zrelih maslina mogu utjecati pozitivno na senzoricu. Ulja proizvedena s navedenom zaostalom količinom lišća imaju zabilježene više koncentracije klorofila, C6 aldehida (trans-2-heksenal) i C6 alkohola (heksanal) nastalih razgradnjom linolenske kiseline lipoksigenaznim putem (Di Giovacchino i sur., 1996). Navedeni spojevi pridonose mirisu po travi, zelenilu i okusu gorčine. Osim doprinosu senzoricu ulja, komponente iz lišća kao što su tokoferoli, karotenoidi, oleuropein i flavonoidi imaju

antioksidacijska svojstva što pridonosi stabilnosti ulja (Tarchoune i sur., 2019). Proces pranje se odvija namakanjem plodova u vodi i ispiranjem mlazevima vode čime se uklanjaju ostatci zemlje.

Očišćeni plodovi idu na mljevenje i drobljenje čime se postiže razbijanje stanične strukture i separacija ulja iz vakuole pomoću kamenih i metalnih mlinova. Kameni mlinovi imaju manji stupanj usitnjavanja od metalnih i priprema maslina kamenim mlinovima dovodi do ulja sa smanjenim intenzitetom gorčine i oštine zbog smanjene količine polifenola za razliku od pripreme metalnim mlinovima (Di Giovacchino i sur., 2002). Tijekom mljevenja i time narušavanja vakuole dolazi do oslobađanja bioaktivnih komponenti i ulja čime triacilgliceroli postanu dostupni djelovanju lipaza, masne kiseline lipoksigenazama i peroksidazama, a polifenoli glikozidazama i polifenoloksidazama čime se oblikuje sastav i svojstva maslinovog ulja. Odvajanje sjemenke u tehnologiji maslinovog ulja je rijetka jer sjemenka ima ulogu drenažnog materijala i njena odsutnosti dovodi do promjene hlapljivih mirisnih tvari u konačnom proizvodu. Razlog u promjeni senzorskog profila ulja od otkoštičenih i neotkoštičenih maslina leži u različitosti kvantitativnog i kvalitativnog profila enzima u sjemenci i pulpi. Enzimi lipoksigenaznog puta imaju različiti stupanj aktivnosti u drugačijim dijelovima ploda, za sjemenku je karakteristična manja aktivnost hidroperoksid liaze i viša alkohol dehidrogenaze u odnosu na pulpu (Luaces i sur., 2007a). Alkohol dehidrogenaza iz sjemenke pokazuje viši afinitet prema zasićenim C6 aldehidima nego prema C5 alkoholima i osim toga, sjemenka je odgovorna za biosintezu od 30 do 50 % estera u maslinovom ulju (Luaces i sur., 2003). Ulja dobivena okoštićavanjem maslina su bogatija na C6 aldehidima i karotenoidima, za razliku od onih bez okoštićavanja koja imaju viši udio C5 komponenti i klorofila (Gugić i Ordulj, 2006) zbog aktivnosti endogenih enzima maslina tijekom miješenja. U uljima iz otkoštičenih maslina je zabilježen viši udio derivata sekoiroida i aktivnost peroksidaze, dok na polifenoloksidazu nema utjecaj (Servilli i sur., 2007).

Jedan od problema koji se nailazi tijekom tehnologije djevičanskog maslinovog ulja je stvaranje emulzije što otežava odvajanje ulja. Tom problemu se priskače miješenjem u inoks koritu čime se postiže razbijanje emulzije miješanjem samljevene mase maslinovog tijesta. Raspršene masne kapljice u vegetabilnoj vodi se skupljaju u veće čime se postiže destabilizacija emulzije i uspješnije izdvajanje ulja. Povišena temperatura djeluje na smanjenje viskoznosti maslinovog tijesta i ulja što pripomaže njegovoj separaciji, a s dužim vremenom miješenja dolazi do smanjenja udjela polifenola (Di Giovacchino i sur., 2002). Spojevi nastali hidrolizom fenolnih glukozida i ostale bioaktivne komponente se procesom

miješenja raspoređuju između uljne i vodene faze na što najviše utječe temperatura. 30 °C pridonosi optimalnom transfera fenola iz uljne u vodenu fazu, no takva temperatura potiče djelovanje polifenoloksidaza i peroksidaza (Koprivnjak, 2006). Prinos i zadržavanje hidrosolubilnih fenola ovisan je o aktivnosti polifenoloksidaze i peroksidaze u miješenju i kontroliranje njihove aktivnosti se može izvršavati sniženom koncentracijom kisika (Servili i sur., 2004). Aktivnost polifenoloksidaze je najviša u procesu mljevenja, a peroksidaze u miješenju (García-Rodríguez i sur., 2015). Posljedice djelovanja navedenih enzima je degradacija nutritivne i senzorske kvalitete maslinovog ulja. Enzimi lipoksigenaznog puta su aktivirani u procesu miješenja maslinovog tijesta (Salas i sur., 1999). Preporučeno vrijeme miješenja je između 30 i 45 minuta jer u tim uvjetima koncentracija sekoiroida i estera visoka što pridonosi antioksidacijskoj stabilnosti i poželjnim senzorskim svojstvima, a koncentracija trans-2-heksen-1-ol i heksan-1-ol, koji su nositelji nepoželjnih svojstava, je niska (Angerosa i sur., 2001).

Odvajanje ulja se može vršiti s mnogobrojnim operacijama kao što su prešanje, centrifugalna ekstrakcija (dvofazna i trofazna) i procjeđivanjem. Prešanje se odvija stavljanjem pripremljenog maslinovog tijesta na filtrirajućim slojnicama između kojih se postavlja metalni disk za postizanje ravnomjernog tlaka (Koprivnjak, 2006). Dekanteri za centrifugalnu ekstrakciju s dva ili tri izlaza rade na principu odvajanja ulja od vode i čvrstog dijela (komina) na temelju razlike između njihovih gustoća (Koprivnjak, 2006). Ulje se kao prva faza smješta u sredini zbog najmanje gustoće, a vegetabilna voda kao druga faza u vanjskom dijelu. Komina (3.faza) se prazni iz konusnog dijela. Količina otpadne vode u centrifugalnoj ekstrakciji s tri izlaza je značajna i u svrhu rješavanja tog problema je konstruiran integralni dekanter s dvije faze prilikom čijeg se rada ne dodaje voda ili minimalno za postizanje optimalne konzistencije tijesta (Koprivnjak, 2006). Nusproizvod dekantera s 2 faze je vlažna komina. Treća izvedba dekantera je opsijska centrifuga s 2 ili 3 izlaza kod kojeg postoji mogućnost odabira rada i tijekom njegovog rada se ne dodaje vode ili tek u količini od 10 do 25% (Koprivnjak, 2006).

Procjeđivanje je separacija ulja koja se temelji na različitoj površinskoj napetosti i adheziji između vode i ulja vrhunske kvalitete, no sklono oksidacijskom kvarenju zbog velike kontaktne površine između ulja i zraka (Koprivnjak, 2006).

Mlado ulje je mutno zbog prisutnosti usitnjenog biljnog tkiva i zaostale vode. U svrhu sprječavanja hidrolitičkog i drugih vrsta kvarenja se provodi stabiliziranje. Može se provoditi

na više načina kao što je prirodno bistrenje, no duže zaostajanje taloga može dovesti do kvarenja i ostvarivanja negativnih senzorskih karakteristika ulja. Operacije kojima se češće pribjegava su filtriranje na filter prešama s pomoćnim filtracijskim sredstvima. Izbistreno ulje se zatim privremeno skladišti u inoks tankovima nakon čega se pakira u određenu odgovarajuću ambalažu.

2.5. DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE

Djevičansko maslinovo ulje se sastoji od osapunjive i neosapunjive frakcije. Osapunjivu frakciju čine triacilgliceroli (97-98 %), slobodne masne kiseline, fosfolipidi i drugi mnogobrojni spojevi. Najveći udio masnih kiselina zauzima oleinska s postotkom od 55 do 83 % (Beltrán i sur., 2004). Ostale značajne masne kiseline su palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2) i linolenska (C18:3). Profil masnih kiselina je ovisan o više faktora kao što su mjesto proizvodnje, klima, sorta i stupanj zriobe (Boskou i sur., 2006).

Neosapunjivu frakciju čine fenoli, ugljikovodici, steroli, tokoferoli i drugi spojevi u kojima leži većinska biološka vrijednost maslinovog ulja. Fenoli, α -tokoferoli i β -karoten su komponente zaslužene za sprečavanje oksidacije u ulju i doprinose stabilnosti ulja tijekom skladištenja (Baccouri i sur., 2008). Triterpenoid skvalen (2, 6, 10, 15, 19, 23-heksametil-2, 6, 10, 14, 18, 22-tetrakosaheksaen) je glavni ugljikovodik u neosapunjivoj frakciji djevičanskog maslinovog ulja u udjelu od 0,8 do 12 g/kg ulja. Karakterizira ga visoka stabilnost u autooksidaciji i doprinosi stabilnosti ulja tijekom izlaganja svjetlosti (Grigoriadou i sur., 2007).

Steroli su produkti izoprena i najznačajniji steroli u maslinovom ulju su β -sitosterol i stigmasterol. Njihov udjel ovisi o kvaliteti ploda ili sjemenke, agronomskom i klimatskim uvjetima, procesu odvajanja ulja i rafinacije te uvjetima skladištenja (Cañabate-Diaz i sur., 2007). Stigmasterol se značajnije očuvao u ulju tijekom prešanja nego centrifugalnom ekstrakcijom (Koutsaftakis i sur., 1999).

Tokoferoli su također prisutni u maslinovom ulju, no u manjem udjelu u odnosu na druga biljna ulja. Forme prisutnog tokoferola u maslinovom ulju su α , β , γ i δ , no preko 90 % čini biološki najaktivniji α -oblik (Trombetta i sur., 2017) u udjelu od 100 do 300 mg kg⁻¹ ulja (Grigoriadou i sur., 2007). Udjel tokoferola je viši u ulju izdvojenom dvofaznom centrifugom

nego trofaznom (Gimeno i sur., 2002). Stabilnost tokoferola u maslinovom ulju tijekom skladištenja se značajno mijenja jer su prvi supstrati autooksidacije što ih čini djelomično prooksidansima i oksidiraju druge komponente neosapunjive frakcije kao što su o-difenoli i skvalen (Rastrelli i sur., 2002).

Fosfolipida u maslinovom ulju nema mnogo i najznačajniji su fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol i fosfatidilserin. Djeluju kao sekundarni antioksidansi i djeluju kao sinergisti fenolnim spojevima (Koprivnjak i sur., 2008).

Od pigmenata su važni za spomenuti klorofil i karotenoidi. Klorofil potječe iz pokožice ploda i listova masline te na svjetlosti djeluje prooksidacijski, a u mraku antioksidacijski (Giuliani i sur., 2011). Tijekom proizvodnje ulja dolazi do transformacije klorofila u feofitin a gubitkom magnezija iz strukture (İnanç i sur., 2011).

β -karoten i lutein su karotenoidi pronađeni u djevičanskom maslinovom ulju i djeluju kao hvatači reaktivnog kisika i inhibiraju oksidaciju. Kod maslinovog ulja ne pokazuju varijaciju u koncentraciji tijekom skladištenja (Bengana i sur., 2013) i udjel β -karotena i polifenola je viši u uljima proizvedenim od zelenih maslina nego od zrelih (Gimeno i sur., 2002)

Terpenski alkoholi eritrodol i uvaol su prisutni u djevičanskom maslinovom ulju u intervalu od 10 do 200 mg kg⁻¹ ulja i predstavljaju značajniji udjel u uljima ekstrahiranim otapalima nego prešanim uljima. Udjel navedenih terpenskih alkohola je značajnije viši u uljima proizvedenim iz sjemenki nego plodovima te taj parametar može poslužiti za utvrđivanje patvorenosti maslinovog ulja (Martínez-Vidal i sur., 2007). Udjel sterola i terpenskih alkohola može poslužiti također za utvrđivanje pojedinih sorti i stupnja zrelosti kod djevičanskih maslinovih ulja (Lukić i sur., 2013).

Uz tokoferole, hidrofilni i lipofilni polifenoli su najvažniji antioksidansi u djevičanskom maslinovom ulju. Osim sa strane antioksidacijske stabilnosti nositelji su karakterističnih senzorskih svojstava maslinovog ulja kao što je izomer aglikona oleuropeina za gorčinu i aglikon ligstrozida za trpkou. Polifenoli nađeni u maslinovom ulju (Lanza i Nimfali, 2020) su:

- a) fenolne kiseline (kava kiselina, p-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, siriginska kiselina i vaniliska kiselina),
- b) fenolni alkoholi i najznačajniji predstavnici su hidroksitirozol (3,4-dihidroksifenil etanol ili 3,4 DHPEA) i tirozol (p-hidroksifeniletanol ili p-HPEA),

- c) sekoiridoidi (oleacein (dialdehidna forma dekarboksimetilne elenolne kiseline vezane za hidroksitirozol), izomer aglikona oleuropeina (3,4-dihidroksifenil etanol elenolna kiselina), aglikon ligstrozida (p-hidroksifeniletanol elenolna kiselina) i oleacantal (dialdehidna forma dekarboksimetilne elenolne kiseline vezane za tirozol),
- d) lignani ((+)-1-acetoksinopiresinol i (+)-pinopiresinol) i
- e) flavoni (apigenin i luteolin).

Derivati aglikona oleuropeina, demetiloleuropein i ligstrozid su sekoiridoidi ulja nastali hidrolizom glukozida β -glukozidazom iz ploda te su spojevi najvažnije antioksidacijske sposobnosti u maslinovom ulju (Servili i Montedoro, 2002). Na udjel polifenola u maslinovom ulja utječe više faktora kao što je sorta i stupanj zrenja plodova, parametri miješenja i primijenjene tehnološke operacije za izdvajanje ulja. Vrijednosti ukupnih fenola u autohtonim hrvatskim sortama su 212,21 mg galne kiseline kg^{-1} (Oblica), 206,09 mg galne kiseline kg^{-1} (Lastovka) i 144,60 mg galne kiseline kg^{-1} (Levantinka) (Šarolić i sur., 2015), dok je raspon u španjolskih sorata 300 do 500 mg galne kiseline kg^{-1} . Picual sadrži 1299,99 mg galne kiseline kg^{-1} (García i sur., 2003), dok Abou Kanani i Shengei do 790 mg kg^{-1} . Centrifuge s 2 izlaza proizvodi ulje s višim udjelom hidrofilnih polifenola u odnosu na 3 izlaza i to se objašnjava činjenicom dodatkom veće količine tople vode u centrifugi s 3 izlaza, dok na tokoferole i β -karotene nema utjecaja zbog njihove lipofilnosti (Gimeno i sur., 2002).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao materijal u ovom radu korištne su masline sorte Oblice sezone berbe 2020./2021. koje su nakon branja zaleđene u struji tekućeg dušika i čuvane pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon odmrzavanja na sobnu temperaturu, pulpa masline se pomoću noža odvojila od sjemenke i koristila u daljnjim analizama. Dio maslina je prije zamrzavanja samljeven na mlinu čekičaru te je tijesto također čuvano na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do danjih analiza. Osim toga, kao materijal u ovom radu bili su korišteni i komercijalno dostupni enzimi β -glukozidaza (iz *Prunus Dulcis*, Sigma-Aldrich) i lipoksigenaza (iz *Glycine max*, Sigma-Aldrich).

3.2. REAGENSI

Albumin govedjeg seruma (Santa Cruz Biotechnology)
2-amino heksanska kiselina (trgovačko ime D-Norleucin, Sigma-Aldrich)
Borna kiselina (Gram-mol)
Benzamidin (Sigma-Aldrich)
Coomasie Brilliant Blue G-250) (Sigma-Aldrich)
D-Norleucin (Sigma-Aldrich)
DL- ditiotretiol (Sigma-Aldrich)
Etanol (96% v/v) (Gram-mol)
Etilendiamintetraoctena kiselina (Sigma-Aldrich)
Fenil metansulfonilfluorid (Sigma-Aldrich)
Fosforna kiselina (85% v/v) (Carlo Erba Reagens)
Kalijev klorid (Kemika)
Klorovodična kiselina (37% v/v) (Fischer Scientific)
Linolenska kiselina (Sigma-Aldrich)
Linolna kiselina (Sigma-Aldrich)
4-nitrofenil glukopiranozid (Sigma-Aldrich)
Metanol (J.T.Baker®)
Mravlja kiselina (T.t.t. d.o.o.)
Natrijev acetat (Kemika)
Natrijev hidroksid (Kemika)
Natrij dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika)
Natrijev hidrogenfosfat (bezdvodni) (Kemika)
Natrijev karbonat (Gram Mol)
Octena kiselina (99 % v/v) (Lachner)
Polivinilpirolidon (trgovačko ime Kollidon 25, Sigma-Aldrich)
TritonTM X-100 (Sigma-Aldrich)
Tween 40 (Fluka)

3.3. APARATURA I PRIBOR

Amicon® epruveta s veličinama pora 30 kDa

Analitička vaga (Ohaus Analytical Plus, Kanada)

Automatska pipeta (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL, Eppendorf®)

Buchnerov lijevak

Boca za odsisavanje

Centrifuga s hlađenjem (Eppendorf® Centrifuge 5425 R, Njemačka)

Digitalna Vortex mješalica za epruvete (LLG Labaware uniTexer, Njemačka)

Epica

Epruvete

Falcon epruvete za čuvanje uzorka

Kvarcne kivete

Magnetski grijач i miješalica (C-MAG MS7, Sjedinjene Američke Države)

Mira cloth, EMD Milipore Corp

Odmjerne tikvice (0,5 i 1 L)

Stakleni lijevci

Staklena časa (1 L)

Staklena menzura

Stakleni štapić

pH metar (Jenway 3510)

Kvarcne kivete

Polimerne mikrokivete

UV -Vis spektrofotometar (Specord® 50 Plus Bu, Švicarska)

UV-Vis spektrofotometar (Secomam UviLine 9400, Sjedinjene Američke Države)

Ultraturrax homogenizator (IKA T 18 basic plus, Sjedinjene Američke Države)

3.4. METODE

3.4.1. Određivanje enzimske aktivnosti β -glukozidaze

3.4.1.1. Priprema otopina

- Boratni pufer pH 9 ($c=0,1 \text{ mol L}^{-1}$)- 6,1800 borne kiseline i 7,400 g kalijevog klorida se otopi u 400 mL deionizirane vode. Otopina se prenese u odmjernu tikvicu od 500 mL i nadopuni do oznake deioniziranom vodom
- Standardna vodena otopina *p*-nitrofenil glukopiranozida ($c=15 \text{ mmol L}^{-1}$) pripremljena u acetatnom puferu pH 5,5
- Otopina za izolaciju β -glukozidaze: 0,7360 g etilenditetrooctene kiseline, 0,0871g fenilmetansulfonilfluorida i 1,2500 g ditiotretiola se otopi u 400 mL boratnog pufera pH 9. Sadržaj se homogenizira u ultrazvučnoj kupelji nakon čega slijedi nadopunjavanje boratnim puferom pH 9 do oznake odmjerne tikvice od 500 mL
- Standardna vodena otopina natrijevog karbonata ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$)
- Otopina liofilizirane β -glukozidaze (5 mg mL^{-1})

3.4.1.2. Postupak ekstrakcije β -glukozidaze

Ekstrakcija β -glukozidaze se mjerila prema Romero-Segura i sur., (2009). Prenese se 2 g pulpe ili tijesta, 14 mL otopine za ekstrakciju β -glukozidaze i 0,7 g kollidona u Falcon epruvetu od 50 mL i sadržaj u Falcon epruveti u ledenoj kupelji se homogenizira u Ultraturrax homogenizatoru u 2 perioda od 1 minute, uz minutu pauze između. Homogenizirani uzorak se profiltira vakuum filtracijom preko Buchnerova lijevka s dvostrukim Miracloth filtracijskim materijalom u bocu za odsisavanje s Falcon epruvetom okruženom ledom. Filtrat se prenese u kivete i centrifugira na 21000 g pri 4 °C kroz 30 minuta. Bistri supernatant koristi se kao enzimski ekstrakt. Dio tog bistrog supernatanta prebaci se u Amicon® epruvete s veličinama pora 30 kDa i centrifugira pri 5000 o/20min i 4 °C kroz 20 min (5 puta po 4 minute). Iznad pora zaostaje koncentrat s uzorcima proteina veličina većim od 30 kDa, a u permeautu zaostaju proteini molekulskih masa manjih od 30 kDa.

3.4.1.3. Postupak UV-VIS spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti β -glukozidaze prema Romero-Segura

Aktivnost β -glukozidaze se mjerila prema Romero-Segura i sur., (2009) na 405 nm uz određene modifikacije metode. Temperiranje otopine supstrata, acetatnog pufera i enzimskih preparata se vršilo na magnetskoj miješalici na temperaturi od 45 °C kroz 15 minuta.

1,5 mL otopine *p*-nitrofenil glukopiranozida i 20 μ L enzimskog ekstrakta ili otopine liofiliziranog enzima homogenizira se na Vortex miješalici kroz 10 sekundi, prebaci u kivetu u spektrofotometar, nakon čega se mjeri aktivnost nakon 1 minute (računajući od dodavanja enzima supstratu) na 405 nm. Na isti način izmjere se i apsorbancije slijepih proba (100 μ L enzimskog ekstrakta i 1,5 mL acetatnog pufera pH 5,5 ili otopine liofiliziranog enzima u 1,5 mL acetatnog pufera 5,5 te 20 μ L otopine za ekstrakciju u 1,5 mL 15 mmol L⁻¹ *p*-nitrofenil glukopiranozida).

3.4.1.4. Postupak određivanja aktivnosti β -glukozidaze prema Ramírez

Aktivnost β -glukozidaze se mjerila prema Ramírez i sur., 2014. Temperiranje otopine supstrata, acetatnog pufera i enzimskih preparata se vršilo na magnetskoj miješalici na temperaturi od 45 °C kroz 15 minuta. 1,5 mL *p*-nitrofenil glukopiranozida i 100 μ L enzimskog ekstrakta homogenizira se na Vortex miješalici kroz 10 sekundi, prekidanje reakcije nakon 1 i 30 minuta (računajući od dodavanja enzima supstratu) se odvija dodatkom 1 mL otopine natrijevog karbonata. Sadržaj se prebaci u kivetu i mjeri se aktivnost na 405 nm i na isti način izmjere se i apsorbancije slijepih proba (100 μ L enzimskog ekstrakta i 1,5 mL acetatnog pufera pH 5,5 te 100 μ L otopine za ekstrakciju i 1,5 mL acetatnog pufera pH 5,5 za čije se uzorke mjeri aktivnost nakon 1 minute i nakon 30 minuta (računajući od dodavanja enzima u pufer te otopine za ekstrakciju u supstrat).

3.4. 2. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze

3.4.2.1. Priprema otopina

- Fosfatni pufer pH 6,7 ($c=100 \text{ mmol L}^{-1}$): otopljeno je 6,374 g natrij dihidrogen fosfata dihidrata i 8,1300 g bezvodnog dinatrij hidrogen fosfata koji su otopljeni u 800 mL destilirane vode. Uspostavljanje željene pH vrijednosti se podešavalo s 35%-tnom klorovodičnom kiselinom pri čemu se kontrola izvodila s pH metrom. Nakon podešene pH vrijednosti, odmjerna tikvica od 1 L se nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Otopina za izolaciju lipoksigenaze: u 500 mL fosfatnog pufera pH 6,7 je potrebno otopiti 0,1461 etilendiaminotene kiseline, 0,00878 g fenilmetil sulfonilfluorida, 0,00601 g benzamida i 0,3279 g D-Norleucina. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 1000 mL i nadopunjena fosfatnim puferom pH 6,7 do oznake.
- Fosfatni pufer pH 6,0 ($c=0,1 \text{ mol L}^{-1}$): 6,7322 g natrij dihidrogenfosfata dihidrata i 0,82184 bezvodnog dinatrij hidrogenfosfata se otopi u 400 mL destilirane vode. Podešavanje pH se izvršava dodatkom 37%-tne klorovodične kiseline uz kontrolu pH vrijednosti uz pomoć pH metra. Otopina se prenese preko lijevka i staklenog štapića u odmjernu tikvicu od 0,5 L. Tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Koncentrirana otopina linolne masne kiseline ($c=25 \text{ mmol L}^{-1}$): otopina linolne kiseline je pripravljena prema Axelord i sur. (1998). 155 μL linolne kiseline i 256 μL Tween-40 se dodalo u 5 mL deionizirane vode u koju se prethodno upuhivao dušik. Sadržaj se pažljivo miješa pazeći da se ne zapjeni, a otapanje emulzije se pospiješi dodatkom 600 μL 1 mol/L NaOH te se tikvica od 25 mL nadopuni vodom u koju se prethodno upuhivao dušik, do oznake. Nakon pripreme otopinu je potrebno čuvati na -80°C .
- Standardna otopina linolne masne kiseline ($c=10 \text{ mmol/L}$): čuva se na -20°C do korištenja
- Koncentrirana otopina linolenske masne kiseline ($c=25 \text{ mmol/L}$): otopina linolenske kiseline je pripravljena prema Axelord i sur. (1998). 155 μL linolne kiseline i 256 μL Tween-40 se dodalo u 5 mL deionizirane vode u koju se prethodno upuhivao dušik. Sadržaj se pažljivo miješa pazeći da se ne zapjeni, a otapanje emulzije se pospiješi dodatkom 600 μL 1 M NaOH te se tikvica od 25 mL nadopuni vodom u koju se prethodno upuhivao dušik do oznake. Nakon pripreme otopinu je potrebno čuvati na -80°C .

- Standardna otopina linolenske masne kiseline (c=10 mmol/L)
- Otopina liofilizirane lipoksigenaze (5 mg/mL)

3.4.2.2. Postupak ekstrakcije lipoksigenaze

Ekstrakcija lipoksigenaze se izvodilo prema metodi iz rada Luaces i sur. (2005) Prenese se 5,00 g pulpe ili tijesta, 45 mL otopine za ekstrakciju lipoksigenaze i 2,00 g kollidona u Falcon epruvetu od 50 mL i sadržaj u Falcon epruveti u ledenoj kupelji se homogenizira u Ultraturrax homogenizatoru u 2 perioda od 1 minute, uz minutu pauze između. Homogenizirani uzorak se profiltira vakuum filtracijom preko Buchnerova lijevka s dvostrukim Miracloth filtracijskim materijalom u bocu za odsisavanje s Falcon epruvetom okruženom ledom. Filtrat se prenese u kivete i centrifugira na 21 000 g pri 4 °C kroz 30 minuta i prenese u nove kivete koje idu na centrifugiranje na 10 000 g pri 4 °C kroz 10 minuta. Bistri supernatant koristi se kao enzimski ekstrakt. Dio tog bistrog supernatanta prebaci se u Amicon® epruvete s veličinama pora 30 kDa i centrifugira na 5000 o/20 min na 4 °C (5 puta po 4 minute). Iznad pora zaostaje koncentrat s uzorcima proteina veličina većim od 30 kDa, a u permeatu zaostaju proteini molekulskih masa manjih od 30 kDa.

3.4.2.3. Postupak UV-VIS spektrofotometrijskog određivanja lipoksigenazne aktivnosti

Određivanje lipoksigenazne aktivnosti se izvodilo prema metodi iz rada Luaces i sur. (2005) uz određene dopune. Enzimski preparat, fosfatni pufer i supstrat podliježu temperiranju na 25 °C kroz 15 minuta na magnetskom miješalici nakon čega slijedi spektrofotometrijsko određivanje. 2,5 mL fosfatnog pufera pH 6 i 50 µL otopine supstrata linolne ili linolenske kiseline homogenizira se na Vortex miješalici kroz 10 sekundi. Mjerenje aktivnosti lipoksigenaze se vrši 1 minutu na 234 nm nakon dodatka 50 µL enzimskog ekstrakta ili pripremljene otopine liofiliziranog enzima u pufer i supstrat. Na isti način izmjere se i apsorbancije slijepih proba (50 µL enzimskog ekstrakta ili otopine liofiliziranog enzima u 2,55 mL fosfatnog pufera pH 6 te 50 µL otopine za izolaciju u 50 µL supstrata i 2,5 mL fosfatnog pufera pH 6,0)

3.4.3. Izračun aktivnosti enzima

Promjena apsorbancije (ΔA) izračunata po formuli [1] je vrijednost apsorbancije produkta enzimske reakcije i korištena je za izračunavanje koncentracije *p*-nitrofenola i hidroperoksida ($c(\text{produkta})$) (formula [2]) koja se računa prema Lambert Beerovom zakonu.

$$\Delta A = A_1 - A_2 - A_3 \quad [1]$$

$$c(\text{produkta}) = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot d} \quad [2]$$

gdje je

A_1 – izmjerena apsorbancija supstrata i enzima nakon reakcije

A_2 – izmjerena apsorbancija supstrata i otopine za ekstrakciju nakon reakcije

A_3 – izmjerena apsorbancija pufera i enzima nakon reakcije

d – duljina puta zrake (1 cm)

ϵ – molarni ekstincijski koeficijent koji za *p*-nitrofenol iznosi $552,8 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i hidroperoksida $25\,000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Aktivnosti enzima su izražene kao brzina reakcije (v), tj. kao koncentracija produkta izražena u $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ [3] koncentracije produkta izraženih na masu proteina u ekstraktu (cp) izražena kao $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ [4] i specifična aktivnost ($s.a.$) izražena kao $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ [5].

$$v = \frac{c(\text{produkt})}{t} \quad [3]$$

$$cp = \frac{c(\text{produkt})}{m(\text{proteini})} \quad [4]$$

$$s.a. = \frac{v}{m(\text{proteini})} \quad [5]$$

3.4.4. Određivanje proteina metodom po Bradfordu

3.4.4.1. Priprema otopina

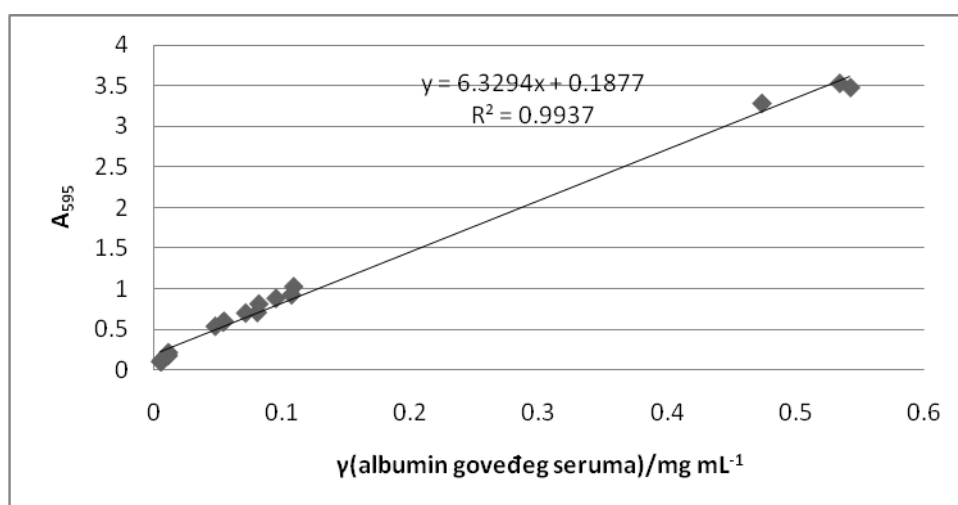
- Bradfordov reagens: na analitičkoj vagi se odvagne 50 mg Coomassie Brilliant Bluea i otopi u 25 mL 96 %-tnog etanola i 50 mL fosforne kiseline (85 % v/v). Sadržaj se prenese u odmjernu tikvicu od 500 mL i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.
- Standardna vodena otopina albumina goveđeg seruma (engleski Bovine Serum Albumin) ($\gamma=1$ mg/ml)

3.4.4.2. Postupak određivanja proteina

Metoda se temelji na pomaku apsorbancije u kiseloj otopini boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). Boja se veže na proteine što rezultira promjenom boje iz crvenosmeđe u plavu boju i pomakom apsorpcijskog maksimuma s 465 nm na 595 nm. Mehanizam vezanja boje za proteine je stvaranje elektrostatskih interakcija sulfonskih boja prvenstveno s pobočnim grupama Arg, a u manjoj mjeri i s pobočnim grupama His, Lys, Tyr, Trp i Phe. Mjerenje apsorbancije kompleksa protein-boja na 595 nm omogućuje olakšanu kvantitativno određivanje koncentracije proteina u uzorku (Bonjoch i Tamayo, 2001).

U polimernu mikrokivetu otpipetira se 0,3 mL otopine enzima i 1,2 mL Bradfordovog reagensa te se smjesa poklopi i promiješa. Nakon 5 minuta reakcije pri sobnoj temperaturi izmjeri se apsorbancija na 595 nm uz slijepu probu (pufer u kojem je otopljen enzimski ekstrakt + Bradfordov reagens). Očitane apsorbancije trebaju biti u rasponu od 0,2 do 0,8. Ukoliko je očitavanje veće potrebno je razrijediti otopinu enzima i ponoviti mjerenje.

Standardne otopine albumina goveđeg seruma korištene su za izradu baždarnog dijagrama (Slika 7) koji je korišten za izračun koncentracija proteina u enzimskim ekstraktima i otopinama liofiliziranih enzima.



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A_{595}) o koncentraciji proteina (γ).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu se provodilo mjerenje aktivnosti β -glukozidaze i lipoksigenaze u enzimskim ekstraktima iz pulpe i tijesta masline. Uspoređivanjem ponovljivosti i reproducibilnosti rezultata dobivenih mjerenja aktivnosti β -glukozidaze, između dvije metode izabrana je ona koja će biti korištena u daljnjem dijelu diplomskog rada. Nakon odabira metode određivanja aktivnosti β -glukozidaze i modifikacije metode za određivanje aktivnosti lipoksigenaze, izvele su se izolacije β -glukozidaze i lipoksigenaze iz pulpe i maslinovog tijesta smrznutih na dva različita temperaturna režima. Zbog neuspjele detekcije β -glukozidazne aktivnosti u uzorcima kao i zabilježenih niskih aktivnosti lipoksigenaze, pribjeglo se korištenju komercijalnih izvora enzima u liofiliziranom obliku u svrhu utvrđivanje enzimske kinetike u ovisnosti o koncentraciji enzima i odgovarajućeg supstrata (*p*-nitrofenil glukopiranozid za β -glukozidazu te linolna i linolenska masna kiselina za lipoksigenazu).

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja su prikazani u tablicama kao srednja vrijednosti provedenih mjerenja i statistički su obrađeni u svrhu utvrđivanja ponovljivosti metoda i međusobne usporedbe.

4.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI β -GLUKOZIDAZE METODOM PO ROMERO-SEGURA

Tablica 2. prikazuje apsorbancije dobivene spektrofotometrijskim mjerenjem aktivnosti β -glukozidaze.

Promjene apsorbancija (ΔA) su negativnih vrijednosti za oba testirana volumena enzimskog ekstrakta za što se može reći da se nije uspjelo detektirati spektrofotometrijski produkt koji je nastao ili da ga uopće nije nastalo pri čemu se ostale veličine kojima se opisuje enzimska aktivnost nisu mogle izračunati (Tablica 2).

Tablica 2. Veličine kojima se opisuje aktivnost β -glukozidaze pri različitim vremenima i volumenu enzimskog ekstrakta iz pulpe maslina zaleđene na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Količina enzimskog ekstrakta / vrijeme	$\gamma(\text{proteini})$	ΔA	$c(\text{produkt})$	v	cp	$s.a.$
20 $\mu\text{L}/1\text{ min}$	0,305 \pm 0,014	-0,036 \pm 0,005	0	0	0	0
20 $\mu\text{L}/30\text{ min}$		-0,031 \pm 0,014	0	0	0	0
100 $\mu\text{L}/1\text{ min}$		-0,041 \pm 0,002	0	0	0	0
100 $\mu\text{L}/30\text{ min}$		-0,055 \pm 0,035	0	0	0	0

ΔA -promjena apsorbancije; $\gamma(\text{proteini})$ -masena koncentracija proteina u ekstraktu (mg mL^{-1}); $c(\text{produkt})$ -množinska koncentracija produkta ($\mu\text{mol mL}^{-1}$); v -brzina enzimske reakcije ($\mu\text{mol mL}^{-1}\text{ min}^{-1}$); cp -koncentracija produkta na masu proteina ($\mu\text{mol mL}^{-1}\text{ mg}^{-1}$); $s.a.$ -specifična aktivnost ($\mu\text{mol mL}^{-1}\text{ min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$)

4.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI β -GLUKOZIDAZE PREMA RAMÍREZU

Tablica 3. Promjene apsorbancija dobivene spektrofotometrijskim određivanjem prema metodi Ramírez i sur., 2014

	t/1 min	t/30 min
Uzorak	ΔA	ΔA
P (-20 °C)	-0,625± 0,106	-0,021± 0,024
GF	-0,039± 0,056	-0,1035 ±0,033
DF	-0,104± 0,011	-0,037± 0,106

P (-20 °C) ekstrakti pulpe masline zaleđenih na -20 °C; GF-gornja frakcija (koncentrat) ekstrakta iz pulpe zaleđene na -20 °C zaostao iznad pora Amicon® epruvete; DF-donja frakcija (permeat) ekstrakta iz pulpe zaleđene na -20 °C zaostale ispod pora Amicon® epruvete; ΔA -delta apsorbancije

Uspoređujući vrijednosti promjene apsorbancija (ΔA) za volumen ekstrakta od 100 μL i vrijeme odvijanja reakcije (1 i 30 minuta) između metode Romero Segura 2009. (Tablica 2) i Ramírez i sur., 2014 (Tablica 3) mogu se primijetiti značajne varijacije između vrijednosti. Određivanjem metodom Romero-Segura su se postigle vrijednosti -0,041 za 1 minutu i -0,055 za 30 minuta, a metodom po Ramírezu -0,625 za 1 minutu i -0,021 za 30 minuta. Uzimajući u obzir rezultate dobivene Romero Segura s 20 μL , postignute su više vrijednosti delta apsorbancija kod kraćeg i dužeg vremena u odnosu na metodu Ramírez gdje se koristilo 100 μL enzimskog ekstrakta.

4.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI β -GLUKOZIDAZE U PULPI I TIJESTU SMRZNUTIM PRI RAZLIČITIM REŽIMIMA SMRZAVANJA PREMA ROMERO-SEGURA

Tablica 4. Apsorbancije spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti β -glukozidaze kod dvije vrste različitih uzoraka tretiranih pri -20 i 80 °C

Uzorak	ΔA	$\gamma(\text{proteini})$	$c(\text{produkt})$	ν	cp	S.A.
P(-20 °C)	-0,081 ±0,024	0,490 ±0,008	0	0	0	0
T(-20°C)	-0,072 ±0,026	0,460 ±0,008	0	0	0	0
P(-80 °C)	-0,048 ±0,017	0,395 ±0,015	0	0	0	0
T(-80°C)	-0,083 ±0,031	0,278 ±0,001	0	0	0	0
GF	-0,089 ±0,000	0,831 ±0,000	0	0	0	0
DF	-0,150 ±0,000	0,184 ±0,000	0	0	0	0

P (-20 °C) i P(-80°C)- ekstrakti pulpe masline zaleđenih na različitim temperaturama; T(-20 °C) i T(-80 °C)-ekstrakti iz tijesta masline zaleđenih na različitim temperaturama; GF-gornja frakcija (koncentrat) ekstrakta iz pulpe zaleđene na -80 °C zaostao iznad pora Amicon® epruvete; DF-donja frakcija (permeat) ekstrakta iz pulpe zaleđene na -80 °C zaostale ispod pora Amicon® epruvete; ΔA -delta apsorbancije; $\gamma(\text{proteini})$ -masena koncentracija proteina u ekstraktu/permeatu/koncentratu (mg mL^{-1}); $c(\text{produkt})$ -množinska koncentracija produkta ($\mu\text{mol mL}^{-1}$); ν -brzina enzimske reakcije ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$); cp -koncentracija produkta na masu proteina ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$); s.a.-specifična aktivnost ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

S obzirom na spektrofotometrijska očitavanja aktivnosti β -glukozidaze (Tablica 2), izabrana je metoda Romero-Segura i sur., (2009) s volumenom ekstrakta 20 μ L. Ponovno se provela ekstrakcija β -glukozidaze iz pulpe i tijesta zaleđenih na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ te se na tim enzimskim ekstraktima određivala aktivnost enzima (Tablica 4).

Uspoređujući rezultate ΔA za obje vrste uzorka smrznutih na istoj temperaturi, primijećeno je da su vrijednosti zabilježene kod pulpe što se može povezati s činjenicom da je lokacija β -glukozidaze primarno u pulpi masline (Tablica 1). Za ekstrakciju enzima uzeta je jednaka masa pulpe i tijesta, no kako koštica zauzima određeni udjel mase tijesta, pretpostavlja se da je isto izazvalo manji prinos ekstrakcije β -glukozidaze u odnosu na prinos kod uzorka pulpe. Uzimajući u obzir apsorbancije za uzorke GF i DF primijećeno je da su zabilježene više vrijednosti u koncentratu (GF) u odnosu na permeat (DF) i izvorne enzimske ekstrakte iz pulpe masline (P) U Amicon® epruvetama veličine pora do 30 kDa dolazi do koncentriranja spojeva većih od 30 kDa, dok u permeatu zaostaju spojevi manjih molekulskih masa od navedene. Molekulska masa β -glukozidaze je 65 kDa (Kara i sur., 2011) i zaostajanje enzima se događa u koncentratu s proteinima molekulskih masa većim od 30 kDa (GF) što se može povezati s povišenom apsorbancijom u odnosu na permeat (DF). Uspoređujući promjene apsorbancije kod ekstrakata dobivenim iz uzoraka zaleđenih na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, može se vidjeti da uzorci smrznuti na višoj temperaturi ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pokazuju višu vrijednost promjene apsorbancije u odnosu na one smrznute na nižoj temperaturi ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Razlog smanjene vrijednosti promjene apsorbancija se može naći u efektu temperaturnog režima na enzime zbog čega se enzim inhibirao ili čak denaturirao. Međutim, bez obzira na smrzavanje, a time i konzerviranje uzoraka, promjena apsorbancije (ΔA) je negativne vrijednosti kod uzoraka smrznutih pri obje temperature (Tablica 4). Uzrok smanjene aktivnosti β -glukozidaze u enzimskim ekstraktima, osim temperature na kojoj se nalaze uzorci, može biti smanjeni prinos modificirane metode ekstrakcije enzima opisane u potpoglavlju 3.4.1.2. Metoda provedena u ovom diplomskom radu uključuje homogenizaciju uzorka u puferskoj otopini čime se izaziva oslobađanje sadržaja iz pulpe ili tijesta u pufersku otopinu, vakuum filtriranje nakon čega se filtrat podliježe centrifugiranju i supernatant koncentriranju preko Amicon® epruvete. Ekstrakcija enzima opisana u Romero-Segura i sur. (2009) obuhvaća pripremu enzimskog ekstrakta od acetonskog praha pripremljenog od svježeg ploda i puferske otopine koja podliježe homogenizaciji i centrifugiranju pri istim uvjetima. Supernatantu, za razliku od metode provedene u ovom diplomskom radu, slijedi pročišćavanje u svrhu koncentriranja enzima. Smanjena aktivnost enzima u enzimskim ekstraktima u ovom diplomskom radu se

može povezati također sa sortom masline. Kultivari maslina s visokim udjelom ukupnih fenola u sastavu pokazuju visoku aktivnost β -glukozidaze u odnosu na one s niskim udjelom (Abou Kanani i Shengei, 2021). Zabilježene aktivnosti β -glukozidaze sa supstratom *p*-nitrofenilglukopiranozidom u sorti Picual prije pročišćavanja su $3003,5 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, Menya do $100 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ i Dokkar do $50 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Abou Kanani i Shengei, 2021). Kod Oblice, koja služi kao izvorni materijal u ovom diplomskom radu, je zabilježen šest puta manji udjel ukupnih fenola u odnosu na Picual i četiri puta u odnosu na Dokkar i Menya te s obzirom na niski udjel ukupnih fenola može se povući korelacija da će aktivnost β -glukozidaze biti značajno manja u odnosu na navedene sorte (García i sur., 2003).

Uzorci smrznuti na različitim temperaturnim režimima (-20 i 80 °C) nisu pogodni za izolaciju enzima zbog mogućeg degradirajućeg efekta niskih temperatura na enzime i iz tog razloga su svježi plodovi primjenjiviji za ekstrakciju enzima što su pokazali rezultati različitih istraživanja (Romero-Segura i sur., 2009; Aboun Kanani i Shengei, 2021). Hrvatske autohtone sorte su nižih udjela ukupnih fenola u odnosu na introducirane sorte što može utjecati na smanjenu aktivnost β -glukozidaze. Ekstrakcijom u puferskoj otopini dolazi do neselektivne difuzije ostalih spojeva uz enzime. Upravo iz tog razloga enzimske ekstrakte je potrebno podvrgnuti različitim metodama pročišćavanja ili koncentriranja što se pokazalo uspješnim u znanstvenim radovima (Romero-Segura i sur., 2009.; García-Vico i sur., 2021.). Tijekom pročišćavanja i koncentriranja će se povećati koncentracija enzima i time do povećanje koncentracije produkta *p*-nitrofenola koji se uočava spektrofotometrijskim određivanjem pri 405 nm .

4.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPOKSIKSENAZE U PULPI I TIJESTU SMRZNUTIM PRI RAZLIČITIM REŽIMIMA SMRZAVANJA

Tablica 5 prikazuje ovisnost veličina kojima se opisuje enzimsku aktivnost u ekstraktima pulpe i tijesta o režimu smrzavanja i supstratu.

Tablica 5. Veličine kojima se opisuje aktivnost lipoksigenaze u tijestu i pulpi ovisnosti o različitom supstratu, vrsti uzorka i temperaturi smrzavanja

Uzorak	$\gamma(\text{proteini})$	Linolna masna kiselina					Linolenska masna kiselina				
		ΔA	$c(\text{produkt})$	v	cp	$s.a.$	ΔA	$c(\text{produkt})$	v	cp	$S.A.$
P(-20 °C)	0,454± 0,007	0,070± 0,006	0,302	0,302	13,309	13,309	0,144± 0,007	0,576	0,576	25,374	25,374
T(-20 °C)	0,167± 0,006	0,087± 0,006	0,350	0,350	41,791	41,791	0,197± 0,107	0,788	0,788	94,089	94,089
P(-80 °C)	0,653± 0,091	0,019± 0,030	0,078	0,078	2,389	2,389	0,076± 0,052	0,304	0,304	9,311	9,311
T(-80 °C)	0,743± 0,007	0,043± 0,010	0,174	0,174	4,680	4,680	0,089± 0,052	0,358	0,358	9,630	9,630
GF	0,287± 0,406	0,009± 0,089	0,036	0,036	0,972	0,972	0,046± 0,169	0,184	0,184	12,800	12,800
DF	0,575± 0,106	0,207± 0,134	0,828	0,828	0,564	0,564	0,141± 0,225	0,564	0,564	19,623	19,623

P (-20 °C) i P(-80°C)- ekstrakti pulpe masline zaleđenih na različitim temperaturama; T(-20 °C) i T(-80 °C)-ekstrakti iz tijesta masline zaleđenih na različitim temperaturama; GF-gornja frakcija (koncentrat) ekstrakta iz pulpe zaleđene na -80 °C zaostao iznad pora Amicon® epruvete; DF-donja frakcija (permeat) ekstrakta iz pulpe zaleđene na -80 °C zaostale ispod pora Amicon® epruvete; ΔA -delta apsorbancije; $\gamma(\text{proteini})$ -masena koncentracija proteina u ekstraktu/permeatu/koncentratu (mg mL^{-1}); $c(\text{produkt})$ -množinska koncentracija produkta ($\mu\text{mol mL}^{-1}$); v -brzina enzimske reakcije ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$); cp -koncentracija produkta na masu proteina ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$); $s.a.$ -specifična aktivnost ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

Uspoređujući veličine iz Tablice 5 kod tijesta i pulpe bez obzira na temperaturu smrzavanja, vidi se da je zabilježena veća aktivnost kod uzoraka tijesta. Veća koncentracija nastalih peroksida u tijestu u odnosu na pulpe se može objasniti raspodjelom lipoksigenaze u pulpi i koštici ploda masline (Tablica 1) čime se mogu objasniti rezultati dobiveni u Tablici 6. U koncentratu (GF) su zabilježene manje vrijednosti c (*produkt*), cp , v i $S.A.$ u odnosu na permeat (DF) što je neočekivana pojava s obzirom na molekularnu masu lipoksigenaze od 98 kDa (Lorenzi i sur., 2006). Izolacijom opisanom u potpoglavlju se s lipoksigenazom ekstrahira hidroperoksid liaza (Luaces i sur., 2005) molekularne mase do 52,4 kDa (Padilla i sur., 2010), te je mogući razlog dobivanja nižih vrijednosti u koncentratu je koncentriranje oba enzima što može rezultirati bržom pretvorbom hidroperoksida u aldehide koji se ne očitavaju spektrofotometrijski na 234 nm.

Soldo (2016) je u svojoj disertaciji pokazala da specifična aktivnost lipoksigenaze s korištenom linolnom kiselinom u plodovima sorte Oblica doseže do $21 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ za 13-hidroperoksid i $10 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ za 9-hidroperoksid. Vrijednost specifične aktivnosti za pulpe smrznute na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ zabilježena u ovom istraživanju bila je $25,374 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, a kod uzorka smrznutog na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ dosegla je vrijednost do $94,089 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Tablica 6). Kod Salas i sur. (1999) specifična aktivnost lipoksigenaze sa supstratom linolnom kiselinom se nalaze u rasponu vrijednosti od 0,53 do 0,80 nkat mg^{-1}

Promatrajući utjecaj različitog supstrata na odvijanje reakcije, može se primijetiti da su vrijednosti veće pri korištenju linolenske kiseline u odnosu na linolnu uz iznimke tijesta smrznutog na -80°C . Vrijednosti specifične aktivnosti za pulpe smrznute na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ su u rasponu od $25,374 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, a kod uzorka smrznutog na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ od 4,345 do $15,442 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Tablica 10). Kod istraživanja Salas i sur. (1999) je specifična aktivnost dosegla vrijednosti od 0,98 do 1,5 nkat mg^{-1} i do 1,85 puta su više vrijednosti u odnosu na rezultate s linolnom kiselinom. Rezultati iz Tablice 7 i istraživanje Salas i sur. (1999) su potvrdili veći afinitet lipoksigenaze prema linolenskoj kiselini, za razliku od istraživanja Lorenzi i sur. (2006) gdje je zabilježena veći afinitet prema linolnoj kiselini.

4.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI OTOPINE LIOFILIZIRANE β -GLUKOZIDAZE

Zbog neuspjele detekcije β -glukozidaze u pulpi i maslinovom tijestu bez obzira na njihovu temperaturu smrzavanja (Tablica 5), pripravljene su otopine komercijalnog izvora β -glukozidaze koje su poslužile za određivanje ovisnosti aktivnosti o koncentraciji enzima i koncentraciji supstrata.

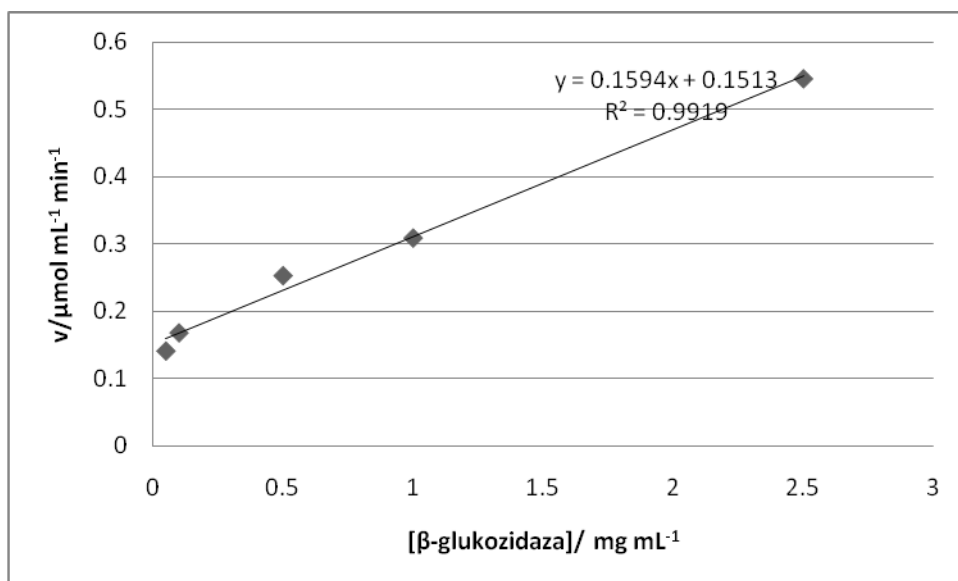
Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti otopine liofilizirane β -glukozidaze ($\gamma=5 \text{ mg mL}^{-1}$) kroz 1 minutu

Uzorak	ΔA	$\gamma(\text{proteini})/$ mg mL^{-1}	$c(\text{produkt})/$ $\mu\text{mol mL}^{-1}$	$v/$ $\mu\text{mol mL}^{-1}$ min^{-1}	$cp/$ $\mu\text{mol mL}^{-1}$ mg^{-1}	$S.A./$ $\mu\text{mol mL}^{-1}$ $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
E_i	0,671	2,033	1,214	1,214	29,852	29,852

$\gamma(\text{proteini})$ -masena koncentracija proteina u ekstraktu/permeatu/koncentratu (mg mL^{-1}); $c(\text{produkt})$ -množinska koncentracija produkta ($\mu\text{mol mL}^{-1}$); v -brzina enzimske reakcije ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$); cp -koncentracija produkta na masu proteina ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$); $s.a.$ -specifična aktivnost ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

4.5.1. Ovisnost aktivnosti β -glukozidaze o koncentraciji enzima

Na Slici 8. prikazan je dijagram ovisnosti brzine reakcije (v) o koncentraciji β -glukozidaze ($[\beta\text{-glukozidaza}]$) u rasponu od $0,05$ do $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

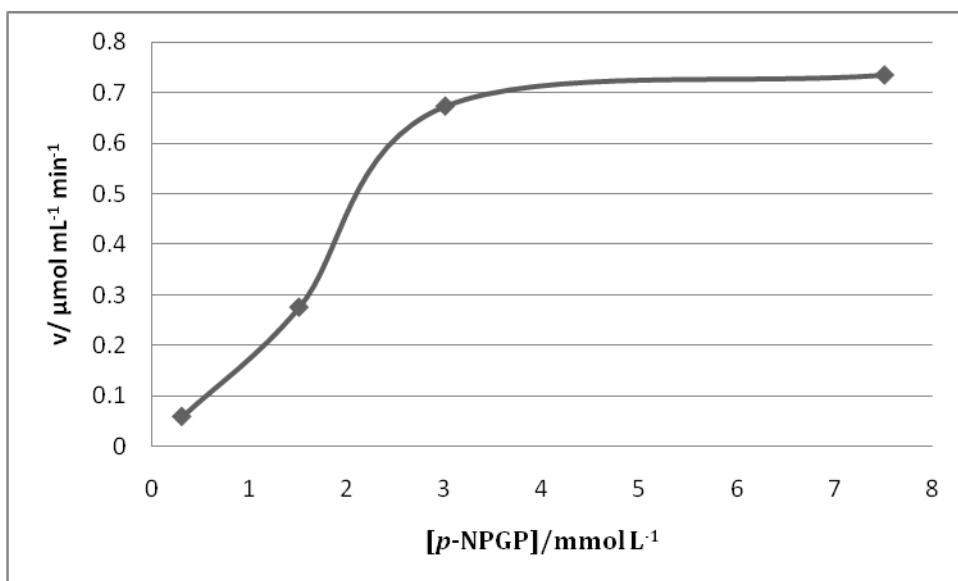


Slika 8. Baždarni dijagram ovisnosti brzine β-glukozidaze (v) o koncentraciji enzima ([β-glukozidaza])

Promatrajući odnos aktivnosti enzima i koncentracije enzima (Slika (8)) može se vidjeti da povećanjem koncentracije enzima u odnosu na konstantnu vrijednost koncentracije supstrata dolazi do linearnog rasta pretvorbe *p*-nitrofenilglukopiranozida u glukozu i *p*-nitrofenol. Promatrajući odnos aktivnosti enzima o koncentraciji enzima, može se vidjeti da dolazi do značajnije razlike brzine reakcije pri većim koncentracijama. Aktivnost enzima u uzorku koji je nerazrijeđen (Tablica 6) u odnosu na otopinu enzima koncentracije 2,5 mg mL (Slika 8) je do 2,2 viša i obje vrijednosti aktivnosti su značajno više u odnosu na više koncentracije te kod manjih razrjeđenja (0,05; 0,1; 0,5 i 1 mg mL⁻¹) ne dolazi do značajnih promjena aktivnosti.

4.5.2. Ovisnost aktivnosti β- glukozidaze o koncentraciji supstrata

Slika 9 prikazuje dijagram ovisnosti brzine reakcije (v) o koncentraciji supstrata *p*-nitrofenil glukopiranozida ([*p*-NPGP]) u rasponu od 0,15 do 7,5 mmol L⁻¹, a na Slici 10 Lineweaver-Burkov dijagram koji prikazuje ovisnost recipročne vrijednosti aktivnosti enzima (μmol mL⁻¹ min⁻¹) o recipročnoj vrijednosti koncentracije *p*-nitrofenil glukopiranozida (1/[*p*-NPGP]).



Slika 9. Dijagram ovisnosti brzine reakcije (v) o koncentraciji supstrata ([p-NPGP])

Slika 9. prikazuje kinetiku enzima iz *Prunus dulcis* koja se može opisati Michaelis-Menten modelom što je u korelaciji sa znanstvenim spoznajama iz Caramia i sur., 2017 i Li i sur. 1997. Michaelis Menten model enzimske kinetike se matematički može opisati [6]:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad [6]$$

gdje je:

V_{\max} - maksimalna vrijednost brzine reakcije koju enzim može postići

[S]- koncentracija supstrata

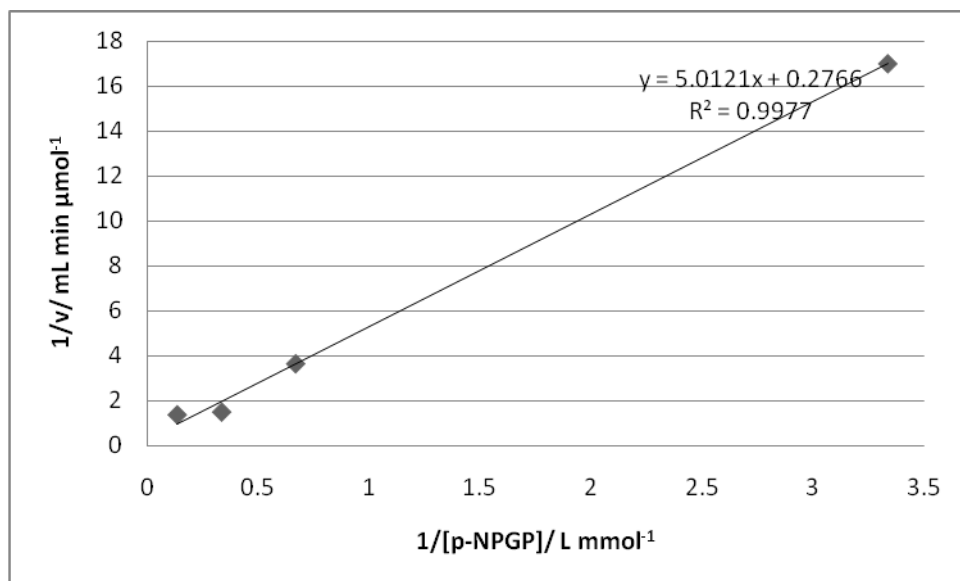
K_m -Michaelis-Menten konstanta K_m i izražava se kao količina vezanog supstrata na enzim pri kojoj je brzina reakcija jednaka polovici V_{\max} .

U svrhu preciznog određivanja vrijednosti K_m i V_{\max} , krivulja koja opisuje ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji supstrata podliježe linearizaciji. Grafički model ovisnost recipročne vrijednosti aktivnosti enzima o recipročnoj vrijednosti koncentracije supstrata se

naziva Lineweaver-Burkovim dijagramom (Slika 10) koji se opisuje matematički modelom [7]:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad [7]$$

gdje je značenje oznaka identično onima u jednadžbi [6].



Slika 10. Recipročni dijagram ovisnosti brzine ($1/v$) o koncentraciji supstrata ($1/[p\text{-NPGP}]$)

Odsječak na osi y vrijednosti 0,2766 predstavlja recipročnu vrijednost maksimalne brzine reakcije ($1/V_{\max}$) a 5,0121 vrijednost predstavlja nagib pravca (K_m/V_{\max}) iz čega proizlazi da je K_m 18,1204 mmol L⁻¹ i V_{\max} 3,6152 μmol mL⁻¹ min⁻¹ (Slika 10). Uspoređujući s kinetičkim parametrima enzima za istovrsni supstrat iz drugih znanstvenih radova, u enzimskom izolatu iz *Olea europea* su vrijednosti 61,50 mmol L⁻¹ i 172,4 U mg⁻¹ (Romero-Segura i sur., 2009), 1,10 mmol L⁻¹ i 4,5 μkat mg⁻¹ iz *Vanilla planifolia Andrews* (Odox i sur., 2003), 0,1146 mmol L⁻¹ i 5,2792 nkatal mg⁻¹ iz *Citrus sinensis* (Cameron i sur., 2001) i 0,92 mmol L⁻¹ i 353 nkat s⁻¹ (Caramia i sur., 2017) i 3,9 mmol L⁻¹ i omjer V_{\max}/K_m 1 (Yi i sur., 1997) kod *Prunus dulcis L.* Navedeni rezultati nalažu da vrijednost kinetičkih parametara β-glukozidaze je različita ovisno o podrijetlu izoliranog enzima. Vrijednosti kinetičkih parametara su više u izolatu iz *Olea europea* odnosu na izolate iz preostalih biljnih vrsta što upućuje na to da β-glukozidaza iz masline na p-nitrofenil glukopiranozid ima

najmanji afinitet i stoga više vrijednosti K_m za postizanje polovice i potpune vrijednosti maksimalne brzine (V_{max}). Uspoređujući vrijednosti K_m i V_{max} za enzim iz *Prunus dulcis*, vrijednosti su najniže kod Caramie i sur., 2017 gdje se provodilo naknadno odvajanje funkcionalnih jedinica enzima i određivanje aktivnosti na pH 6, slijedi ga istraživanje koje se provodilo na pH 6,7 Yi i sur., 1997 i na posljednjem mjestu vrijednosti dobivene iz Linewear-Burkovim dijagramom (Slika 10) čije se mjerenje aktivnosti provodilo na pH 5,5.

4.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI OTOPINE LIOFILIZIRANE LIPOKSIGENAZE

4.6.1. Određivanje aktivnosti otopine liofilizirane lipoksigenaze pri različitim vremenima enzimske reakcije

Aktivnost lipoksigenaze u uzorcima pulpe i tijesta smrznutih pri različitim temperaturnim režimima je zabilježena (Tablica 5), no u niskim vrijednostima i iz tog razloga se podlijeglo korištenju komercijalnog izvora lipoksigenaze koji se pripremio u obliku otopine i iskoristio za definiranje ovisnosti aktivnosti enzima o koncentraciji enzima i supstrata.

Tablica 9 prikazuje spektrofotometrijska određivanja aktivnosti lipoksigenaze ovisno o različitom supstratu i vremenu enzimske reakcije i parametre enzimske kinetike.

Vrijednosti aktivnosti (v) i specifične aktivnosti ($S.A.$) otopine liofilizirane lipoksigenaze bez obzira na supstrat su obrnuto proporcionalne s vremenom enzimske reakcije, dok to nije slučaj s koncentracijom produkta na masu proteina (Tablica 7). Uspoređujući aktivnosti, koncentracije produkta na masu proteina i specifične aktivnosti, vidi se da su zabilježene više vrijednosti prilikom korištenja linolenske kiseline nego linolne. Omjer istovrsnih parametara za linolensku i linolnu kiselinu je najviši kod 1 minute, dok se s porastom vremena trajanja enzimske reakcije prisutan znatni pad. Uzimajući u obzir vrijednosti iz Tablice 7, može se izvesti zaključak da je veličine najviših vrijednosti kod 1 minute i da je primjenjena metoda adekvatna za mjerenje aktivnosti.

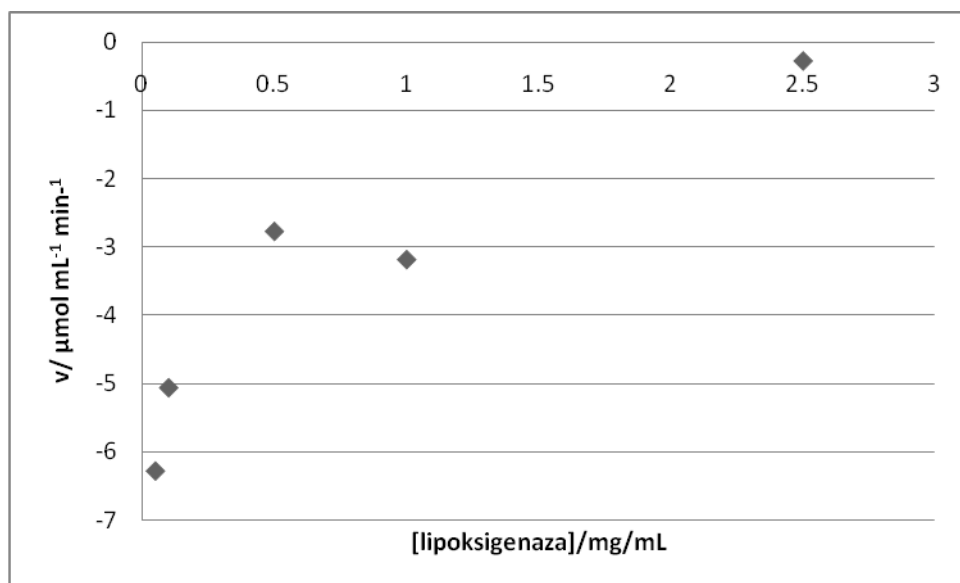
Tablica 7. Spektrofotometrijska određivanja aktivnosti lipoksigenaze i kinetičke veličine definirane za otopinu liofilizirane lipoksigenaze ovisno o različitim parametrima enzimske reakcije

t/ min	Supstrat	$\gamma(\text{proteini})$	c (<i>produkt</i>)	v	cp	<i>S.A.</i>
1	Linolna kiselina	2,134	0,424	0,424	3,974	3,974
	Linolenska kiselina		2,948	2,948	27,629	27,629
15	Linolna kiselina		3,496	0,233	32,764	2,184
	Linolenska kiselina		7,672	0,511	71,902	4,793
30	Linolna kiselina		3,568	0,119	33,440	1,115
	Linolenska kiselina		7,260	0,242	69,041	2,268

$\gamma(\text{proteini})$ -masena koncentracija proteina u ekstraktu/permeatu/koncentratu (mg mL^{-1}); $c(\text{produkt})$ -množinska koncentracija produkta ($\mu\text{mol mL}^{-1}$); v -brzina enzimske reakcije ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$); cp -koncentracija produkta na masu proteina ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$); *s.a.*-specifična aktivnost ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

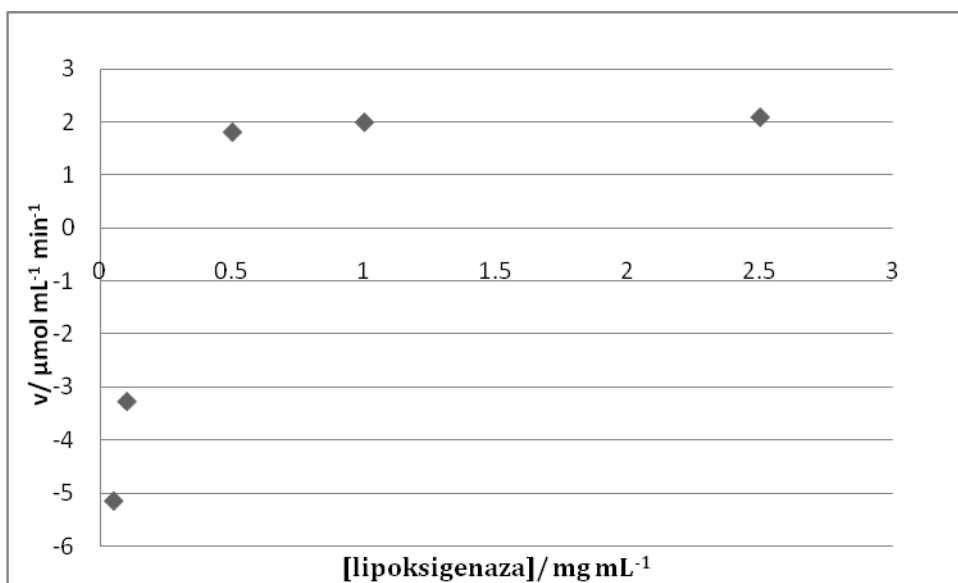
4.6.2. Ovisnost aktivnosti lipoksigenaze o koncentraciji enzima

Na Slici 11 prikazan je dijagram ovisnosti aktivnosti enzima (v) u ovisnosti o koncentraciji enzima u otopini ([lipoksigenaza]) uz korištenje linolne kiseline u rasponu od 0,05 do 2,5 mg mL^{-1} , a na Slici 12 s korištenjem linolenske kiseline.



Slika 11. Baždarni dijagram ovisnosti brzine reakcije lipoksigenaze (v) o koncentraciji enzima ([lipoksigenaza]) za linolnu kiselinu

Promatrajući ovisnosti enzimske reakcije o koncentraciji enzima s korištenjem linolne kiseline (Slika 11) zamijećeno je da je koncentracija enzima značajan parametar koji diktira aktivnost enzima. S korištenim koncentracijama nije bilo moguće odrediti promjenu apsorbancije što se može objasniti s mogućom visokom apsorbancijom supstrata, spojeva u izolatu i puferu na 234 nm. Uspoređujući vrijednosti aktivnosti različitih koncentracija lipoksigenaze za linolensku kiselinu (Slika 12) s onim kod korištene linolne kiseline (Slika 11), primjećeno je da je kod viših koncentracija enzima zabilježena aktivnost što nije slučaj kod viših koncentracija razrijeđenja kod korištenja linolne kiseline. Navedeni rezultati se slažu s rezultatima iz Tablice 7. s istovrsnim enzimom veće koncentracije kao i kod Tablice 6. s enzimskim izolatom iz masline čime se dodatno može potvrditi veći afinitet lipoksigenaze prema linolenskoj kiselini.



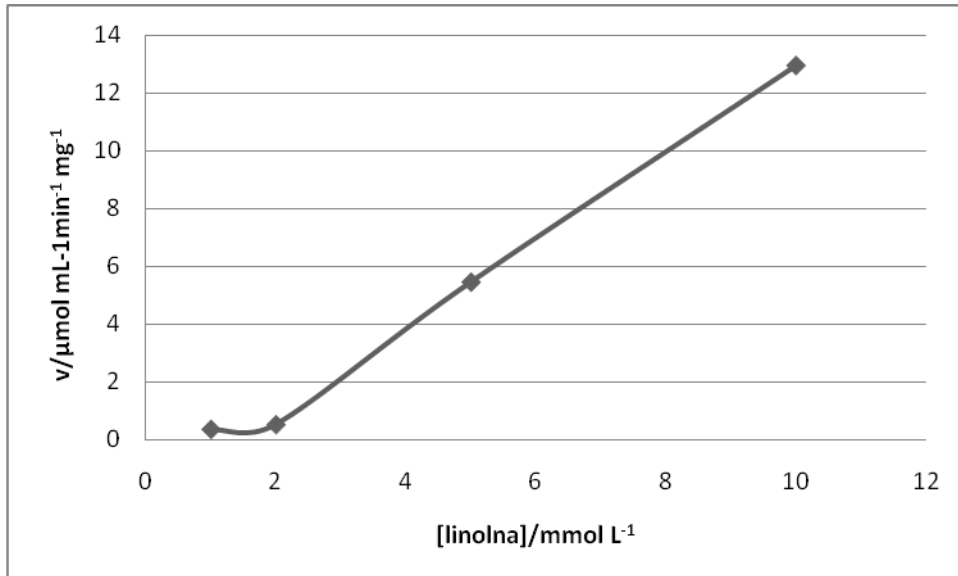
Slika 12. Baždarni dijagram ovisnosti brzine lipoksigenaze (v) o koncentraciji enzima ([lipoksigenaza]) za linolensku kiselinu

4.6.3. Ovisnost aktivnosti lipoksigenaze o koncentraciji supstrata

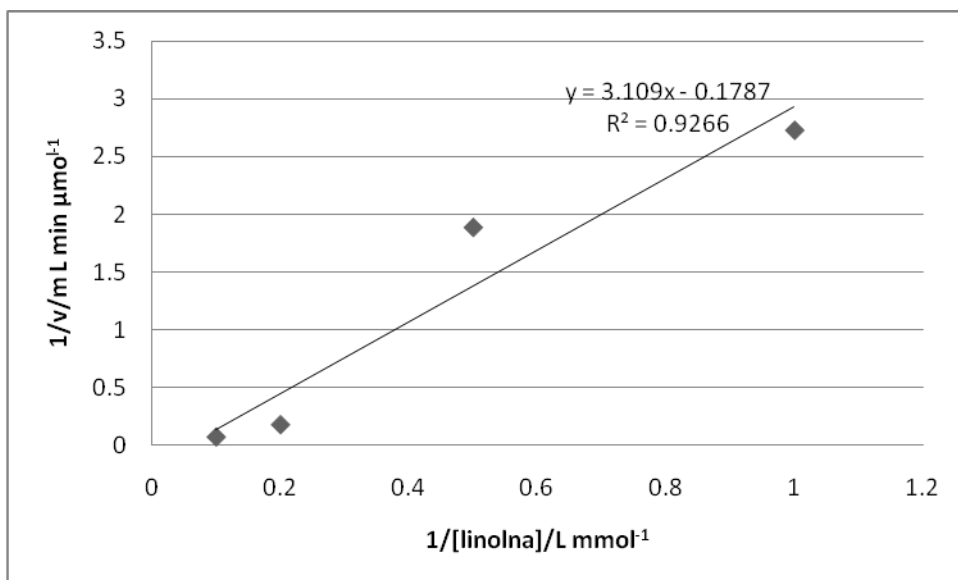
Dijagrami ovisnosti aktivnosti (v) o koncentraciji linolne masne kiseline i linolenske masne kiseline u rasponima od 0,05 do 10 mmol L⁻¹ prikazani su na Slici 13 i Slici 15, a Lineweaver-Burkov dijagram koji prikazuje ovisnost recipročne vrijednosti aktivnosti ($1/v$) o recipročnoj vrijednosti koncentracije linolne i linolenske masne kiseline na Slici 14 i Slici 16 ($1/[linolna \text{ ili } linolenska]$).

Promatrajući ovisnost aktivnosti lipoksigenaze o koncentraciji linolne kiseline, primjećeno je da ne postoji sigmoidalna krivulja koja je karakteristična za Michaelis Menten kinetiku (Slika 13) i iz toga razloga nije bilo moguće dobiti pozitivne vrijednosti V_{max} i K_m vrijednosti Lineweaver-Burkovim dijagramom (Slika 14). Dobiveni rezultati se ne podudaraju s dosadašnjim znanstvenim spoznajama na istovrsnom enzimu (Maccarone i sur., 2001) i lipoksigenazi iz rajčice (*Lycopersicon esculentum*) (Suurmeijer i sur., 1998). Razlika kod korištenja istovrsnog enzima može proizlaziti iz toga što se enzim u Maccarone i sur. dodatno pročišćava, dok se enzimski ekstrakt, koji se koristio za određivanje aktivnosti na Slici 13 i Slici 14, nije naknadno pročišćavao. Osim naknadnih procesa pročišćavanja i uvjeta pri kojima se odvija enzimska reakcija, na vrijednost kinetičkih parametara (K_m i V_{max}) utječe i podrijetlo enzima čemu svjedoče vrijednosti K_m i V_{max} od 4,1 mmol L⁻¹ i 7,4 mmol L⁻¹min⁻¹

mg^{-1} za lipoksigenazu iz rajčice te raspon od 2,6 do 10,5 mmol L^{-1} i od 22 do 23 $\mu\text{mol L}^{-1}\text{mg}^{-1}$ za sojinu lipoksigenazu gdje se u svim slučajevima koristila linolna kiselina kao supstrat.

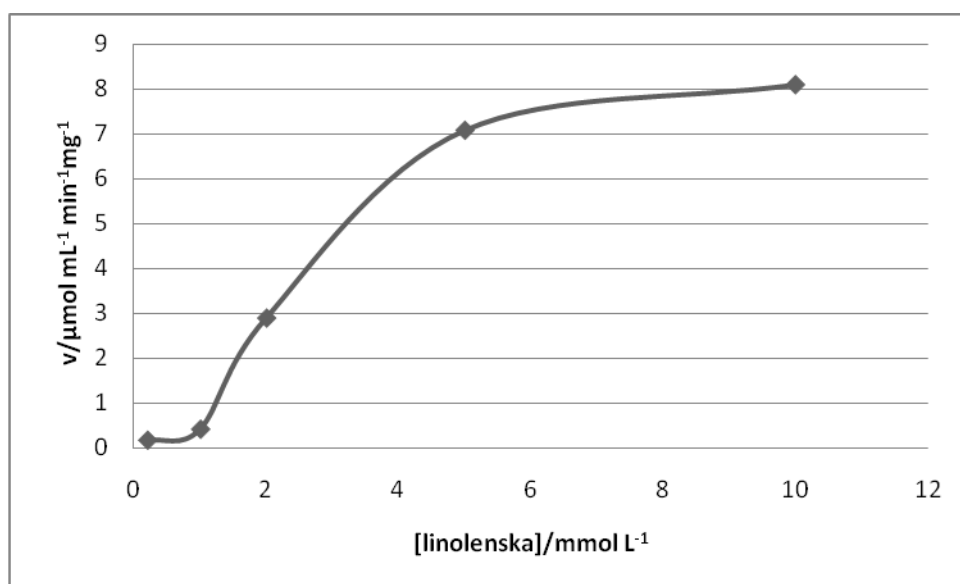


Slika 13. Ovisnost brzine lipoksigenaze (v) o koncentraciji linolne kiseline ($[\text{linolna}]$)

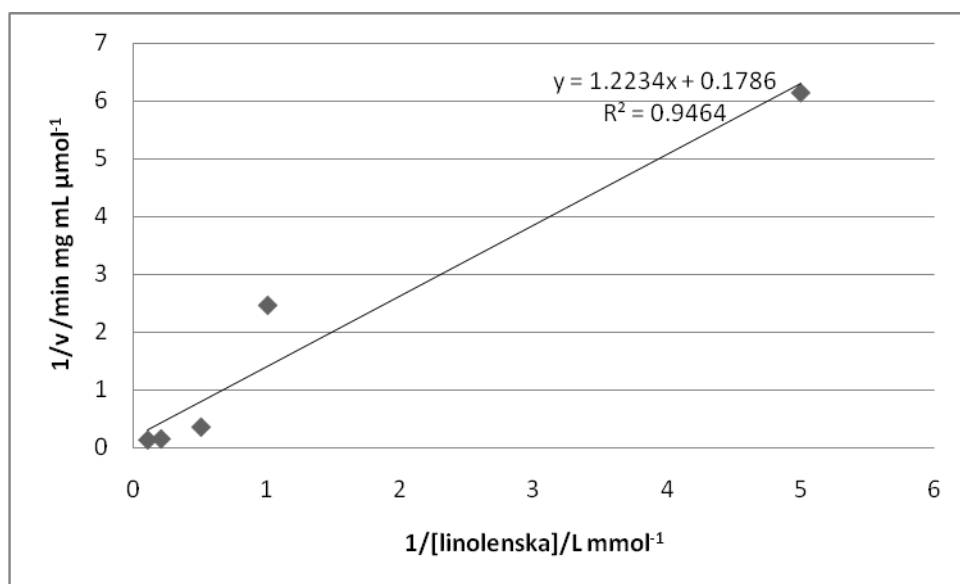


Slika 14. Recipročni dijagram ovisnosti brzine ($1/v$) o koncentraciji linolne kiseline ($1/[\text{linolna}]$)

Kinetika sojine lipoksigenaze s linolenskom kiselinom se može prikazati Michaelis Menten modelom (Slika 15) što je u pozitivnom skladu sa znanstvenim istraživanjem na lipoksigenazi iz plijesni *Agrocybe aegerita* (Karrer i Rühl, 2019). Vrijednosti K_m od $6,2800 \text{ mmol L}^{-1}$ i V_{max} od $5,599 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ su dobivene iz Linewear Burkovog dijagrama (Slika 16). Uspoređujući s kinetičkim parametrima dobivenim iz drugih istraživanja, značajno su nižih vrijednosti u odnosu na od $634,4 \text{ mmol L}^{-1}$ i $19,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ iz *Agrocybe aegerita* (Karrer i Rühl, 2019) i $306,26 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (Lorenzi i sur., 2006) u lipoksigenazi iz masline.



Slika 15. Ovisnost brzine lipoksigenaze (v) o koncentraciji linolenske kiseline ($[\text{linolenska}]$)



Slika 16. Recipročni dijagram ovisnosti brzine ($1/v$) o koncentraciji linolenske kiseline ($1/[\text{linolenska}]$)

5. ZAKLJUČAK

1. Prinos ekstrakcije β -glukozidaze iz pulpe i tijesta smrznutih na različitim režimima smrzavanja se nije mogao definirati zbog neuspješne kvantifikacije aktivnosti enzima pri čemu se može zaključiti da je temperatura smrzavanja uzoraka značajan parametar koji utječe na aktivnost enzima.
2. Određivanje aktivnosti β -glukozidaze prema Romero-Segura je zbog reproducibilnosti i usporedivosti rezultata, bolja od metode prema Ramírezu.
3. Ekstrakcija lipoksigenaze iz pulpe i tijesta smrznutih na različitim temperaturnim režimima je bila uspješna zbog mogućeg kvantifikacijskog određivanja aktivnosti enzima koja je bila viša u uzorcima smrznutim na temperaturi od -20°C u odnosu na one na od -80°C . U konačnici se može navesti da je temperatura na kojoj se nalazi uzorak parametar koji utječe na aktivnost enzima.
4. Apsorbancije pri 234 nm na kojima se mjeri koncentracija produkta djelovanja lipoksigenaze, hidroperoksida, su viših vrijednosti kod pulpe u odnosu na tijesto zbog lokacije lipoksigenaze u pulpi i sjemenki, a afinitet lipoksigenaze viši je prema linolenskoj masnoj kiselini nego linolnoj.
5. Kinetika β -glukozidaze iz badema (*Prunus Dulcis*) pri konstantnim uvjetima $\{[E]=5 \text{ mgmL}^{-1}, \text{pH}=5,5, T=45^{\circ}\text{C}\}$ sa supstratom *p*-nitrofenil glukopiranozidom prati Michaelis-Menten model te da je linearna ovisnost aktivnosti o koncentraciji prisutnog enzima uz konstantnu koncentraciju supstrata od 15 mmol L^{-1} .
6. Kinetika lipoksigenaze iz soje (*Glycine maxime L.*) pri konstantnim uvjetima $\{[E]=5 \text{ mgmL}^{-1}, \text{pH}=6,0, T=25^{\circ}\text{C}\}$ s linolenskom masnom kiselinom prati Michaelis Menten model, dok pri istovjetnim uvjetima reakcije uz korištenje linolne kiseline ne prati Michaelis Menten model.
7. Ovisnost brzine enzimske reakcije lipoksigenaze o koncentraciji enzima bez obzira na supstrat (linolna i linolenska masna kiselina) se nije uspjela definirati.

6. LITERATURA

Abdel-Shafy, H. I., Schories, G., Mohamed-Mansour, M. S., Bordei, V. (2014). Integrated membranes for the recovery and concentration of antioxidant from olive mill wastewater. *Des Water Treat.* [online] **56(2)**, 305–314, <https://www.researchgate.net/publication/271673396_Integrated_membranes_for_the_recovery_and_concentration_of_antioxidant_from_olive_mill_wastewater> Pristupljeno 16.prosinca 2020.

Angerosa, F. (2000) Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem.* **68(3)**, 283–287.

Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. (2001) Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chem.* **72(1)**, 19–28.

Anonymus 1 <<http://www.niranaliza.hr/oblica-kraljica/>> Pristupljeno 12. prosinca 2020.

Axelrod, B., Cheesbrough, T. M.; Laakso, S. (1981) Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol.* **71**, 441-451.

Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Daoud Ben Miled, D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem.* **109(4)**, 743–754.

Baldoni, L., Belaj, A. (2009) Olive. U: Oil Crops, 4.izd., [online] (Vollman, J., Rajcan I., ured.), Springer, New York, 397-421 https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-77594-4_13#citeas Pristupljeno 4.rujna 2021.

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. *J Agri Food Chem.* **52(11)**, 3434–3440.

Bengana, M., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Amir, Y., Youyou, A., Segura-Carretero,

A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013) Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. *Food Res Int.* **54(2)**, 1868–1875.

Bonjoch, N. P., Tamayo, P.R. (2001) Protein Content Quantification by Bradford Method. U: Handbook of Plant Ecophysiology Techniques [online] (Reigosa Roger, M. J., ured.), Springer, Dodrecht, 283-295 < https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F0-306-48057-3_19> Pristupljeno 4.rujna 2021.

Boskou, D., Vapounis, Z. (2006) Olive Oil in World Market. U: Olive oil:Chemistry and Technology:Characterics of Olive oil and olive fruit, 2.izd [online] (Boskou, D., ured.), Academic Press and AOCS Press, Champaign, 21-41 https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=Nc9VCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=olive&ots=owB02M-&sig=zJ0JNRW7BTkeVgbdRXnOGNi6zYQ&redir_esc=y#v=onepage&q=olive&f=false Pristupljeno 16.prosinca 2020.

Cameron, R. G., Mathey, J. A., Baker, R. A., Grohman, K. (2001) Purification and Characterization of a Beta-Glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia Fruit Tissue. *J. Agric. Food Chem* **49**, 4457-4462.

Cañabate-Díaz, B., Segura Carretero, A., Fernandez Gutierrez A., Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Marrinez Vidal., J., Duranmartos, J. (2007) Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chem.* **102(3)**, 593–598.

Caramia, S., Gatiús, A. G. M., dal Piaz, F., Gaja, D., Hochkoepler, A. (2017) Dual role of imidazole as activator/inhibitor of sweet almond (*Prunus dulcis*) β -glucosidase. *Biochem. Biophys. Rep.* **10**, 137–144.

Cirilli, M., Caruso, G., Gennai, C., Urbani, S., Frioni, E., Ruzzi, M., Muleo, R. (2017) The Role of Polyphenoloxidase, Peroxidase, and β -Glucosidase in Phenolics Accumulation in *Olea europaea* L. Fruits under Different Water Regimes. *Front Plant Sci.*, 1-13.

Di Giovacchino, L., Angerosa, F., Di Giacinto, L. (1996) Effect of mixing leaves with olives on organoleptic quality of oil obtained by centrifugation. *J Am. Oil Chem Soc.* **73(3)**, 371-374.

Di Giovacchino, L., Sestili, S., Di Vincenzo, D. (2002) Influence of olive processing on virgin oil quality. *Eur J Lip. Sci. Tech.* **104(9-10)**, 587–601.

García, A., Brenes, M., García, P., Garrido, A. (2003) Phenolic content of commercial olive oils. *Eur. Food. Res. Technol.* **216**, 520-525.

García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A. G. (2011) Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res Int.* **44(2)**, 629–635.

García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Pérez, A. G. (2015) Modulating oxidoreductase activity modifies the phenolic content of virgin olive oil. *Food Chem.* **171**, 364–369.

García-Vico, L., Sánchez, R., Fernández, G., Sanz, C., Pérez, A. G. (2021) Study of the olive β -glucosidase gene family putatively involved in the synthesis of phenolic compounds of virgin olive oils. *J. Sci. Food Agr.* (objavljeno online 1.ožujka 2021.).
<https://doi.org/10.1002/jsfa.11189>

Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., López-Sabater, M. C. (2002) The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chem.* **78(2)**, 207–211.

Giuliani, A., Cerretani, L., Cichelli, A. (2011) Chlorophylls in Olive and in Olive Oil: Chemistry and Occurrences. *Crit. Rev. Food Sci.* **51(7)**, 678–690.

Grigoriadou, D., Androulaki, A., Pyomiadou, E., Tsimidou, M. (2007) Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chem.* **105(2)**, 675–680.

Gugić, A., i Ordulj, I. (2006) Prerada plodova maslina i kvaliteta djevičanskog maslinovog ulja, *Glasnik Zaštite Bilja*. **29(6)**, 15-25.

Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z., Lu, X., Zheng, Y., Zheng, B., Xiao, J. (2017) Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochem Rev.***17**, 1091-1100.

Haris Omar, S. (2010) Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Sci Pharma*. **78(2)**, 133–154. İnanç, A.L. (2011) Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. *Akademik Gıda® / Academic Food Journal*. **9(2)**, 26-32.

Jakšić (2013) <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti> Pristupljeno 16.prosinca 2020.

Lanza, B, Ninfali, P. (2020). Antioxidants in Extra Virgin Olive Oil and Table Olives: Connections between Agriculture and Processing for Health Choices. *Antioxidants*. **9(1)**, 1-5.

Kantoci, D. (2006) Maslina. *Glasnik Zaštite Bilja* **29(6)**, 4-14. Kara, H. E., Sinan, S., Turan, Y. (2011) Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *J. Chromatog. B* **879(19)** , 1507–1512.

Karrer, D., Rühl, M. (2019) A new lipoxygenase from the agaric fungus *Agrocybe aegerita*: Biochemical characterization and kinetic properties. *PLOS ONE* **14(6)**, 1-11. Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E. (1999) Effect of extraction system, stage of ripeness, and kneading temperature on the sterol composition of virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76(12)**, 1477–1481.

Koprivnjak, O. (2006) Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, MIH, Poreč. Koprivnjak, O., Škevin, D., Valić, S., Majetić V., Petričević, S., Ljubenkov, I. (2008) The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin oil enriched with phospholipids. *Food Chem*, **111(1)**, 121-126.

- Lanza, B., Ninfali, P. (2020) Antioxidants in Extra Virgin Olive Oil and Table Olives: Connections between Agriculture and Processing for Health Choices. *Antioxidants* **9**, 41,1-17.
- Li, Y.-K., Chang, L.-F., Shu, H.-H., Chir, J. (1997) Characterization of an Isozyme of β -Glucosidase from Sweet Almond. *J. Chin. Chem Soc-TAIP* **44(1)**, 81–87.
- Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J., Berti, L. (2006) Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol. Biochem.* **44(7-9)**, 450–454.
- Luaces, P., Pérez, A. G., Sanz, C. (2003) Role of Olive Seed in the Biogenesis of Virgin Olive Oil Aroma. *J. Agric Food Chem.* **51(16)**, 4741–4745.
- Luaces, P., Pérez, A. G., Garcia, J. M., Sanz, C. (2005) Effects of heattreatments of olive fruit on pigment composition of virgin olive oil. *Food Chem.* **90 (1-2)**, 169-174.
- Luaces, P., Romero, C., Gutierrez, F., Sanz, C., & Pérez, A. G. (2007a) Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *J Sci Food Agr*, 2721-2727.
- Luaces, P., Sanz, C., Perez A. G. (2007b) Thermal stability of lipoxsgenase and hydroperoxide lyase from olive fruit and repercussion on olive oil biosynthesis. *J. Agric. Food Chem* **55**, 6309-6313.
- Lukić, M., Lukić, I., Krapac, M., Sladonja, B., Piližota, V. (2013) Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chem.* **136(1)**, 251–258.
- Maccarone, M., Bari, M., Battista, N., Finazzi-Agrò, A. (2001) The catalytic efficiency of soybean lipoxygenase-1 is enhanced at low gravity. *Biophys. Chem.* **90(1)**, 97–101.
- Martínez-Vidal, J. L., Garrido-Frenich, A., Escobar-García, M. A., Romero-González, R. (2007) LC–MS Determination of Sterols in Olive Oil. *Chromatographia* **65**, 295-299.

Muzzalupo, I., Macchione, B., Bucci, C., Stefanizzi, F., Perri, E., Chiappetta, A., Sindona, G. (2012) LOX Gene Transcript Accumulation in Olive (*Olea europaea* L.) Fruits at Different Stages of Maturation: Relationship between Volatile Compounds, Environmental Factors, and Technological Treatments for Oil Extraction. *Sci. World J.*, 1-10.

Muzzalupo, I., Vendramin, G. G., Chiappetta, A. (2014) Genetic Biodiversity of Italian Olives (*Olea europaea*) Germplasm Analyzed by SSR Markers. *Sci. World J.*, 1–12.

Nergiz, C., Engez, Y. (2000) Compositional variation of olive fruit during ripening. *Food Chem.* **69**(1), 55–59.

Odoux, E., Chauwin, A., Brillouet, J. M. (2003) Purification and Characterization of Vanilla Bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -D-glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3168-3173.

Ortega-Garcia, F., Blanco, S., Peinado, M. A., Peragon, J. (2008) Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. “Picual” trees during fruit ripening. *Tree Physiol.* **28**(1), 45–54.

Ortega-García, F., Blanco, S., Peinado, M. Á., Peragón, J. (2017) Polyphenol Oxidase and Oleuropein in Olives and their Changes During Olive Ripening. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention U: Olive and olive oil in health and disease prevention* [online] (Preedy, V.R., Watson, R.R., eds), Academic Press, Jaén 233–238. <http://www4.ujaen.es/~jperagon/ch25olives_resume.pdf> Pristupljeno 16.prosinca 2020.

Pérez, A. G., Sanz, C., Olías, R., Olías, J. M. (1999) Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase Activities in Ripening Strawberry Fruits. *J. Agri.Food Chem.* **47**(1), 249–253.

Romero-Segura, C., Sanz, C., Perez, A.G. (2009) Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 7983–7988.

Ramírez, E., Medina, E., Brenes, M., Romero, C. (2014) Endogenous Enzymes Involved in the Transformation of Oleuropein in Spanish Table Olive Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **62**,

9569-9575.

Ranalli, A., Contento, S., Schiavone, C., Simone, N. (2001) Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *Eur. J Lipid Sci. Tech.*, **103**(4), 228–238.

Rastrelli, L., Passi, S., Ippolito, F., Vacca, G., De Simone, F. (2002) Rate of Degradation of α -tocopherol, Squalene, Phenolics, and Polyunsaturated Fatty Acids in Olive Oil during Different Storage Conditions. *J. Am. Food Chem.* (**50**), 5566-5570.

Salas, J. J., & Sánchez, J. (1999) Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Sci.* **143**(1), 10-25.

Sánchez-Ortiz, A., Bejaoui, M. A., Quintero-Flores, A., Jiménez, A., Beltrán, G. (2018) Biosynthesis of volatile compounds by hydroperoxide lyase enzymatic activity during virgin olive oil extraction process. *Food Res. Int.* **111**, 220–228.

Salas, J. J., Williams, M., Harwood, J. L., Sánchez, J. (1999) Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *J. Am. Oil Chem' Soc.* **76**(10), 1163–1168.

Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A., Montedoro, G. (1999) Phenolic Compounds of Olive Fruit: One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Nüzhenide and Its Distribution in the Constitutive Parts of Fruit. *J. Agric and Food Chem.* **47**(1), 12–18.

Servilli, M., Montedoro, G. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104** (9-10), 602-613.

Soldo, B. (2016) Utjecaj lipoksigenaze na sastav hlapljivih tvari u maslinovom ulju autohtonih dalmatinskih sorti. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Soler-Rivas, C., Espin J.C., Wichers, H. J. (2000) Oleuropein and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **80**(7), 1013-1023.

Strikić, F., Čmelik, Z., Šatović, Z., Perica, S. (2007) Morfološka raznolikost masline (*Olea europaea* L.) sorte Oblica. *Pomol. Croat.* **13(2)**, 77-86.

Strikić, F., Bandelj Mavsar, D., Perica, S., Čmelik, Z., Šatović, Z., Javornik, B. (2009) The main Croatian olive cultivar, “Oblica”, shows high morphological but low molecular diversity. *J. Horti. Sci. Biotechnol.* **84(3)**, 345–349.

Suurmeijer, C. N. S. P., Pérez-Gilabert, M., van der Hijden, H. T. W. M., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G. (1998) Purification, product characterization and kinetic properties of soluble tomato lipoxygenase. *Plant Physiol. Biochem.* **36(9)**, 657–663.

Šarolić, M., Gugić, M., Friganović, E., Tuberoso, C., Jerković, I. (2015) Phytochemicals and Other Characteristics of Croatian Monovarietal Extra Virgin Olive Oils from Oblica, Lastovka and Levantinka Varieties. *Molecules* **20(3)**, 4395–4409.

Taticchi, A., Esposito, S., Veneziani, G., Urbani, S., Selvaggini, R., Servili, M. (2013). The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chem.* **136(2)**, 975–983.

Trombetta, D., Smeriglio, A., Marcoccia, D., Giofrè, S., Toscano, G., Mazzotti, F., Lorenzetti, S. (2017) Analytical Evaluation and Antioxidant Properties of Some Secondary Metabolites in Northern Italian Mono- and Multi-Varietal Extra Virgin Olive Oils (EVOOs) from Early and Late Harvested Olives. *Int. J. Mol. Sci.* **18(4):797**, 1-14.

Veneziani, G., Esposito, S., Taticchi, A., Selvaggini, R., Urbani, S., Di Maio, I., Sordini, B., Servili, M. (2015) Flash Thermal Conditioning of Olive Pastes during the Oil Mechanical Extraction Process: Cultivar Impact on the Phenolic and Volatile Composition of Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* **63(26)**, 6066–6074.

Vick, B. A. (1993) Oxygenated Fatty Acids of the Lipoxygenase Pathway. U: Lipid metabolism in Plants [online] (Moore, T. S., ed) , Boca Raton, 67–191 <<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781351074070-6/oxygenated-fatty-acids-lipoxygenase-pathway-brady-vick?context=ubx&refId=3ba9c31d-d6e2-4b82-b796-f76dbf2f6ecb>> Pristupljeno 5. Kolovoza 2021.

Vuletin Selak, G., Perica, S., Goreta Ban, S., Radunić, M., Poljak, M. (2011) Reproductive Success after Self- pollination and Cross-pollination of Olive Cultivars in Croatia. *HortScience* **46(2)**, 186-191.

Žanetić, M., Štrucelj, D., Perica, S., Škevin, D., Serraiocco, A., Simone, N. (2010) Chemical composition of Dalmatian virgin olive oils from autochthonous olive cultivars Oblica, Lastovka and Levantinka. *Riv. Ital. delle Sostanze Grasse* **86**, 24-33.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A. Vujnović

Angela Vujnović