

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Niko Jakoliš

**UTJECAJ PULSIRAJUĆEG  
ELEKTRIČNOG POLJA NA  
AKTIVNOST ENZIMA PLODA  
MASLINE U MODELNIM  
SUSTAVIMA**

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, te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Klare Kraljić i Mije Ivanov mag.ing.



Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom “Utjecaj inovativnih tehnologija na nutritivnu vrijednost, senzorska svojstva i oksidacijsku stabilnost djevičanskih maslinovih ulja iz hrvatskih autohtonih sorti maslina“ (HRZZ CROInEVOO, IP-2020-02-7553) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Dubravke Škevin.

## ZAHVALA

*Najprije se od srca zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Dubravki Škevin koja je tijekom cijelog studija bila potpora i vjetar u leđa studentima. Hvala Vam što ste me prihvatili za izradu diplomskog rada i hvala na svim savjetima i pomoći prilikom pisanja istog. Također, veliko hvala izv. prof. dr. sc. Klari Kraljić na uloženom vremenu i pomoći, posebno tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada te Miji Ivanov mag.ing. na ugodnoj radnoj atmosferi u labosu. Hvala prof. dr. sc. Sandri Balbino na pomoći tijekom obrade podataka te svim ostalim djelatnicima laboratorija na izuzetno prijateljskom okruženju.*

*Najveće zahvale upućujem obitelji i prijateljima koji su mi omogućili bezbrižno školovanje, ispunjeno bezuvjetnom podrškom i razumijevanjem.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju masti i ulja

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

### UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA AKTIVNOST ENZIMA PLODA MASLINE U MODELNIM SUSTAVIMA

*Niko Jakoliš, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210936*

**Sažetak:** Pulsirajuće električno polje kao netermalna tehnologija ima veliki potencijal za primjenu u procesiranju hrane, što uključuje i djevičansko maslinovo ulje. Primjena pulsirajućeg električnog polja pri proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja dovodi do povećanja iskorištenja prinosa, povišenja udjela fenolnih, lako hlapljivih spojeva te ostalih bioaktivnih komponenti u ulju čime dovodi do nutritivnih, kemijskih i senzorskih poboljšanja djevičanskog maslinovog ulja. U ovom radu modelni sustavi enzima ploda masline ( $\beta$ -glukozidaza i lipoksigenaza) sa supstratima su podvrgnuti simulaciji miješenja pri 27 °C, gdje je utvrđeno optimalno vrijeme za svaki enzim. Modelni sustavi su tretirani pulsirajućim električnim poljem te im je nakon tretmana spektrofotometrijski određena aktivnost, a potom provedeno optimiranje s ciljem dobivanja optimalnih parametara tretmana. Optimiranim tretmanima je pomoću HPLC metode analizirana enzimska aktivnost.

**Ključne riječi:** *pulsirajuće električno polje, djevičansko maslinovo ulje, miješenje,  $\beta$ -glukozidaza, lipoksigenaza*

**Rad sadrži:** 77 stranice, 37 slika, 6 tablica, 126 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:** izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić; Mia Ivanov, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Sandra Balbino (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Dubravka Škevin (mentor)
3. prof. dr. sc. Zoran Herceg (član)
4. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 20. srpnja 2022.

## 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

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### EFFECT OF THE PULSED ELECTRIC FIELD ON OLIVE ENZYME ACTIVITY- A MODEL SYSTEM EXPERIMENT

*Niko Jakoliš, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210936*

**Abstract:** The pulsed electric field as a non-thermal technology has great potential for application in food processing, which includes virgin olive oil. The application of a pulsed electric field in the production of virgin olive oil leads to an increase in the utilization of yield, an increase in the proportion of phenolic, easily volatile compounds and other bioactive components in the oil, which leads to nutritional, chemical and sensory improvements of virgin olive oil. In this work, model systems of olive fruit enzymes ( $\beta$ -glucosidase and lipoxygenase) with substrates were subjected to mixing simulation at 27 °C, where the optimal time for each enzyme was determined. The model systems were treated with a pulsed electric field, and after the treatment, their activity was determined spectrophotometrically, and then optimization was carried out with the aim of obtaining optimal treatment parameters. Enzyme activity was analyzed with the optimized treatments using the HPLC method.

**Keywords:** *pulsed electric field, virgin olive oil, malaxation time,  $\beta$ -glucosidase, lipoxygenase*

**Thesis contains:** 77 pages, 37 figures, 6 tables, 126 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Dubravka Škevin, PhD Full professor

**Technical support and assistance:** Klara Kraljić, PhD Associate professor; Mia Ivanov, mag. ing.

**Reviewers:**

1. Sandra, Balbino, PhD, Full professor (president)
2. Dubravka, Škevin, PhD, Full professor (mentor)
3. Zoran, Herceg, PhD, Full professor (member)
4. Klara, Kraljić, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** July 20, 2022

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. MASLINOVO ULJE .....	2
2.2. PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA .....	3
2.3. KEMIJSKI SASTAV DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA .....	6
2.4. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE .....	11
2.5. NUTRITIVNA VRIJEDNOST DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA .....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
3.1. MATERIJAL .....	18
3.2. REAGENSI .....	18
3.3. METODE .....	19
3.3.1. Priprema modelnih otopina enzima $\beta$ -glukozidaze .....	19
3.3.2. Priprema modelnih otopina enzima lipoksigenaze .....	19
3.3.3. Simulacija miješenja na 27 °C u vremenskom periodu od 40 minuta .....	20
3.3.4. Tretman pulsirajućim električnim poljem (PEF) .....	20
3.3.5. Određivanje aktivnosti $\beta$ -glukozidaze spektrofotometrijskom metodom .....	21
3.3.6. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze spektrofotometrijskom metodom .....	22
3.3.7. Određivanje proteina po Bradford-u .....	23
3.3.8. Optimiranje tretmana inovativnih tehnologija .....	24
3.3.9. Određivanje aktivnosti $\beta$ -glukozidaze HPLC metodom u optimalnim uvjetima tretmana PEF-om, UTT-om i UZV-om .....	24
3.3.10. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze HPLC metodom u optimalnim uvjetima tretmana PEF-om, UTT-om i UZV-om .....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	28
4.1. Utjecaj uvjeta miješenja na enzimsku aktivnost pri 27 °C .....	29
4.2. Utjecaj PEF tretmana na aktivnost enzima .....	31
4.3. Optimizacija PEF tretmana .....	34
4.3.1. $\beta$ -glukozidaza .....	35
4.3.2. Lipoksigenaza .....	41
4.4. Optimizacija UTT tretmana .....	45
4.5. Optimizacija UZV tretmana .....	47
4.6. Određivanje aktivnosti enzima i njihovih produkata HPLC metodama .....	49



5. ZAKLJUČAK.....	63
6. LITERATURA .....	64

# 1. UVOD

Djevičansko maslinovo ulje (eng. *Virgin olive oil, VOO*) je iznimno cijenjeno biljno ulje koje radi svog kemijskog, nutritivnog i senzorskog sastava je oduvijek bilo privlačno čovječanstvu. Bogat je izvor raznih fitokemikalija koje znanstveno dokazano imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje, a kombinacija fenolnih i lako hlapivih spojeva stvara okus nadaleko specifičan i cijenjen od strane potrošača. Zbog načina proizvodnje koji je isključivo mehanički, ovo ulje spada u viši cjenovni rang te ga ne mogu priuštiti široke mase ljudi. Mehanički način proizvodnje se koristi radi očuvanja silnih bioaktivnih komponenti djevičanskog maslinovog ulja, ali primjenjeni proces je poprilično staromodan te se koristi od antike uz određene modifikacije. Inovativne netermalne tehnologije obuhvaćaju primjenu ultrazvuka, mikrovalova, superkritičnog CO<sub>2</sub>, pulsirajućeg električnog polja i slično s ciljem očuvanja kemijskih, nutritivnih i senzorskih svojstava djevičanskog maslinovog ulja, mogućeg i povećanja biološke vrijednosti samog ulja, povećanja prinosa proizvodnje te produljenja roka trajanja samog proizvoda. Pulsirajuće električno polje kao inovativna tehnologija pospješuje izdvajanje zaostalog djevičanskog maslinovog ulja iz maslinovog tijesta tijekom procesa miješenja, uzrokuje povećani transfer fenolnih spojeva u maslinovo ulje, povoljno djeluje na razvitak lako hlapivih komponenti samog djevičanskog maslinovog ulja kao i na porast koncentracije ostalih biološki važnih spojeva u ulju (fitosteroli, tokoferoli, pigmenti). Enzimi od značajne važnosti za kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja, a na kojima je provedeno ispitivanje u ovom radu su  $\beta$ -glukozidaza čija je funkcija cijepanje fenolnih spojeve i prevođenje u ulju topljivije oblike te lipoksigenaza koja potiče tvorbu lako hlapivih spojeva iz masnih kiselina.

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj pulsirajućeg električnog polja na aktivnost modelnih sustava enzima  $\beta$ -glukozidaze i lipoksigenaze te njihovih supstrata koji služe kao replika nativnim enzimima i supstratima ploda masline i ujedno odrediti optimalne parametre tretmana čiji je učinak na aktivnost enzima najbolji. Za analizu i statističku obradu dobivenih rezultata aktivnosti enzima tretiranih pulsirajućim električnim poljem te rezultata aktivnosti tih istih enzima tretiranih ubrzanim toplinskim tretmanom (UTT) i ultrazvukom (UZV) dobivenih u diplomskom radu Pavlič (2021) korišten je statistički paket Design-Expert v. 10 (Stat-Ease, Minneapolis, SAD).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MASLINOVO ULJE

Maslina (*Olea europea L.*) je među najstarijim poznatim kultiviranim vrstama stabala na svijetu (Liphschitz i sur., 1991) gdje je danas poznato više od 30 vrsta koje se uzgajaju širom svijeta. Podrijetlo masline je predmet raznih diskusija, ali se smatra da je prije 5000 godina iz područja Perzije i Mezopotamije prenesena na područje današnje Sirije i Palestine (Kapellakis i sur., 2008).

Plod masline se sastoji od dva glavna dijela, perikarpa (kojeg čine pokožica i pulpa) i endokarpa (kojeg čini sjemenka). Pulpa sadrži 96-98 % ukupne količine ulja, dok ostatak 2-4 % se nalazi u sjemenki. Svježi plod masline se sastoji od vode, ulja, šećera, proteina, organskih kiselina, fenolnih i koloidnih sastojaka (Kiritsakis, 1998). U plodu masline, ulje se nalazi u stanicama pulpe odnosno u mezokarpu ploda (Ranalli i sur., 2001). Ulje unutar stanice se nalazi u vakuoli (oko 76 %) gdje je u slobodnoj formi, a ostatak ulja se nalazi u citoplazmi (oko 24 %) gdje je dispergirano u male kapljice povezane s koloidima (Abenoza i sur., 2013). Tijekom razvitka ploda masline dolazi do promjene veličine, sastava, boje, teksture, okusa i osjetljivosti na razne bolesti. Rast i sazrijevanje su kombinacija fizioloških i biokemijskih procesa koji izravno utječu na sastav, kvalitetu i karakteristike djevičanskog maslinovog ulja, definiranog sortom, ali također ovisi i o okolišnim uvjetima (Connor i Fereres, 2005).

Tradicionalna prehrana na području Mediterana uključuje djevičansko maslinovo ulje kao glavni izvor masti, a istovremeno pokazuje pozitivan utjecaj na zdravlje snižavajući rizik od tumora, neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, metaboličkih sindroma te kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (Sofi i sur., 2014; Estruch i sur., 2013; Willett, 2006; Turner i sur., 2005; Trichopoulou i sur., 2003). Djevičansko maslinovo ulje ima važnu ulogu u lipidnom metabolizmu, imuno-upalnom sustavu, krvožilnoj zaštiti i kontroli krvnog tlaka, metaboličkim regulacijama i detoksikacijama. Zbog svih ovih dobrobiti na ljudsko zdravlje, djevičansko maslinovo ulje se smatra funkcionalnom hranom (Piroddi i sur., 2016). Djevičansko maslinovo ulje (VOO), naročito ekstra djevičansko maslinovo ulje (EVOO), smatra se jednim od najcjenjenijih i često korištenih biljnih ulja širom svijeta zbog svojih posebnih senzorskih svojstava. S ciljem očuvanja najviše kvalitete, VOO i EVOO se proizvode isključivo mehaničkim postupcima. Proizvodnja visoko kvalitetnog djevičanskog maslinovog ulja uvijek zahtjeva zdrav

plod masline, dobru proizvođačku praksu te efikasno osiguranje kvalitete kroz cijeli proizvodni proces, uključujući i ispravno skladištenje proizvedenog djevičanskog maslinovog ulja (Inarejos-García i sur., 2009).

## **2.2. PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA**

Pri proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja potrebno je cijeli proces obaviti što prije, odnosno nakon branja, masline se trebaju odmah transportirati u uljaru gdje započinje prerada u maslinovo ulje. Nakon zaprimanja maslina vrši se pranje; pranje je važno radi uklanjanja vanjskih primjesa, nečistoća, lišća, kamenčića i prašine. Pranje ne utječe u velikoj mjeri na kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja, već se koristi uglavnom zbog osiguranja opreme. Koraci koji slijede nakon pranja i uklanjanja lišća i grančica su drobljenje i mljevenje; drobljenje i mljevenje maslina su fizikalni procesi kojima se trga biljno tkivo ploda masline radi izdvajanja kapljica ulja sadržanih u staničnim vakuolama (Kalogianni i sur., 2019a). Na tržištu je prisutno mnoštvo opreme koja se koristi za procese drobljenja i mljevenja kao što su: mlinovi čekićari, konusni, mlinovi s diskom, s valjkom, s noževima (Di Giovacchino i sur., 2002a). Drobljenje i mljevenje utječu na stupanj razaranja stanice što je i vidljivo skenirajućim elektronskim mikroskopom (Veillet i sur., 2009) te na temperaturu maslinovog tijesta (Caponio i sur., 2003). Posljedično, temperatura maslinovog tijesta utječe na stupanj izdvajanja fenolnih spojeva i na enzimsku aktivnost (Clodoveo i sur., 2014). Operacija koja slijedi nakon mljevenja i drobljenja je miješenje.

Miješenje je jedan od najvažnijih koraka pri proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja jer utječe na prinos izdvajanja ulja iz maslinovog tijesta, kvalitetu i nutritivni sastav maslinovog ulja. Tijekom procesa miješenja, maslinovo tijesto se polagano miješa na prosječnoj temperaturi (20-35 °C) u određenom vremenskom intervalu (30-45 minuta). Navedeni uvjeti pružaju priliku kapljicama, koje su oslobođene iz oštećenih stanica, da dođu u kontakt te se grupiraju (Kalogianni i sur., 2019b). Povezivanje kapljica ulja se smatra ključnim za izdvajanje i proizvodnju ulja. Kemijske i enzimske reakcije, kao što su oksidacija i hidroliza, imaju važnu ulogu pri formiranju kemijskih, nutritivnih i senzorskih karakteristika djevičanskog maslinovog ulja te također utječu i na prinos izdvajanja maslinovog ulja iz tijesta (Servili i sur., 2015; Clodoveo i sur., 2014; Clodoveo, 2012; Stefanoudaki i sur., 2011; Inarejos-García i sur., 2009; Angerosa i sur., 2001;

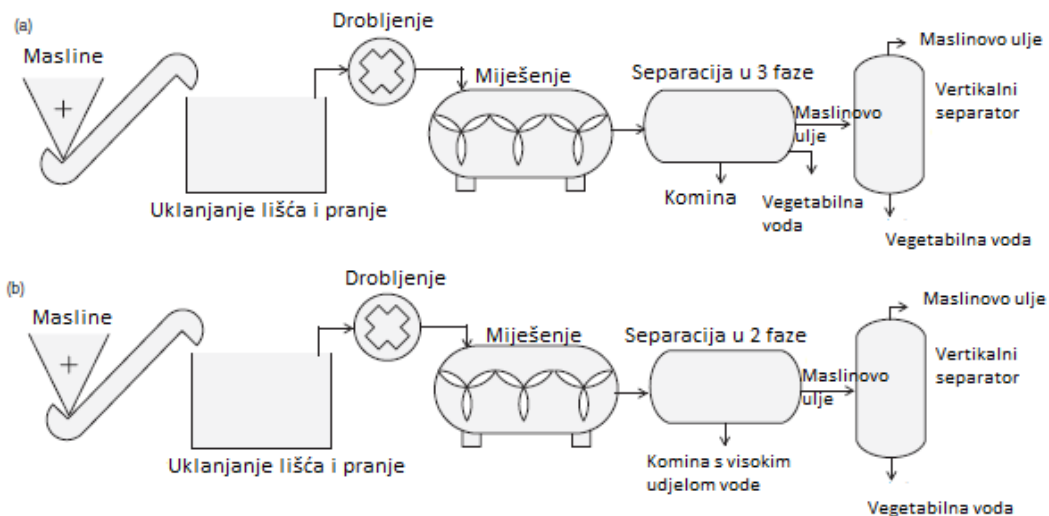
Ranalli i sur., 2001). Povišenje temperature i vremena miješenja do određene granice uzrokuje povećanje prinosa izdvojenog ulja. Vremenski period miješenja ne utječe na slobodne masne kiseline, peroksidni broj te na sastav masnih kiselina (Leone i sur., 2016; Stefanoudaki i sur., 2011; Gomez-Rico i sur., 2009; Inarejos-García i sur., 2009; Kalua i sur., 2006; Di Giovacchino i sur., 2002a; Lercker i sur., 1999). Jedna grupa autora navodi kako su fenolni spojevi osjetljiviji na temperaturu miješenja nego vrijeme trajanja istog (Aguilera i sur., 2015; Gomez-Rico i sur., 2009; Angerosa i sur., 2001), dok su drugi znanstvenici zapazili da su se ukupni fenoli povećali porastom vremena miješenja do određene granice, a daljnjim miješenjem (više od 60 minuta) dolazi do pada koncentracija (Leone i sur., 2016; Gomez-Rico i sur., 2009; Ranalli i sur., 2003; Di Giovacchino i sur., 2002a). Zaključeno je da produljenje vremena miješenja uzrokuje pad koncentracije sekoiridoida (Angerosa i sur., 2001), ali i porast koncentracije hlapivih komponenti (Gomez-Rico i sur., 2009; Ranalli i sur., 2003; Amirante i sur., 2001; Lercker i sur., 1999) te pigmenata kao što su klorofil i feofitin (Stefanoudaki i sur., 2011; Ranalli i sur., 2003; Giovacchino i sur., 2002a ; Amirante i sur., 2001). Koncentracija i sastav fenolnih spojeva u maslinovom ulju ovise o kompleksnim odnosima između enzimske aktivnosti, enzimske termostabilnosti, otpuštanju i topljivosti fenola u lipidnoj i vodenoj fazi te o primjenjenoj temperaturi (Taticchi i sur., 2013; Parenti i sur., 2008).

Sastav zraka, a posebice udio kisika i vrijeme kontakta s kisikom za vrijeme miješenja utječu na enzimske i kemijske reakcije. Značajan je utjecaj koncentracije kisika u miješenju na gubitke fenolnih spojeva zbog oksidacija uzrokovanih kemijskim i enzimskim reakcijama (Catania i sur., 2016; Leone i sur., 2014; Tamborrino i sur., 2014; Catania i sur., 2013; Taticchi i sur., 2013; Aiello i sur., 2012; Masella i sur., 2011; Servili i sur., 2008; Migliorini i sur., 2006; Servili i sur., 2003). S druge pak strane, više koncentracije kisika tijekom miješenja pozitivno djeluju na koncentraciju hlapivih spojeva koji su nosioci karakterističnih aroma maslinovog ulja, a nastaju oksidacijom (Catania i sur., 2016; Raffo i sur., 2015; Catania i sur., 2013; Masella i sur., 2011; Sánchez-Ortiz i sur., 2008; Servili i sur., 2008; Migliorini i sur., 2006; Servili i sur., 2003). Na ostale parametre kvalitete maslinovog ulja kao što su udjel slobodnih masnih kiselina i  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  ne utječe ili vrlo malo utječe koncentracija kisika (Leone i sur., 2014; Tamborrino i sur., 2014; Masella i sur., 2011; Migliorini i sur., 2006).

Dodatak pomoćnih tvari tijekom miješenja se preporuča za razbijanja emulzija ulje/voda što dovodi do lakšeg i uspješnijeg izdvajanja ulja iz maslinovog tijesta, a najčešće tvari koje se dodaju kao pomoć pri izdvajanju ulja su talk, kalcijev karbonat, natrijev klorid te enzimi (Kalogianni i sur. 2019a).

Nakon provedenog miješenja, maslinovo tijesto je spremno za kontinuiranu centrifugalnu separaciju. U centrifugalnom sustavu, separacija se temelji na primjeni centrifugalne sile koja razdvaja sadržaj maslinovog tijesta prema različitoj gustoći (kominu, vegetabilnu vodu te ulje). Centrifugalna separacija dovodi do nastanka tri koncentrična kruga različitih faza u dekanteru koji na različitoj udaljenosti od radijusa rotacije izlaze iz sustava, odnosno dolazi do odvajanja i odvođenja faza (Uceda i sur., 2006). Primjena centrifugiranja dovodi do bolje kvalitete djevičanskog maslinovog ulja u smislu hidrolize, oksidacije, oksidacijske stabilnosti te ukupne količine fenolnih spojeva (Caponio i sur., 2014; Volpe i sur., 2014; Klen i Vodopivec, 2012; Di Giovacchino i sur., 2001; De Stefano i sur., 1999; Piacquadio i sur., 1998; Angerosa i Di Giovacchino, 1996; Ranalli i Angerosa, 1996). Komercijalno su dostupne dvije izvedbe centrifuge i to sa dvije i tri faze, a razlika među njima je broj izlaza faza te količina dodane vode tijekom procesa. Kod centrifuge s tri faze prisutna su tri izlaza i to izlaz za ulje, vegetabilnu vodu te kominu, dok su kod centrifuge s dvije faze prisutni izlazi za ulje i kominu s vodom.

Nakon centrifugiranja, potrebno je izvršiti odvajanje ulja i zaostale vegetabilne vode (koja može iznositi i do 3 % u ulju) pomoću vertikalnog separatora (Di Giovacchino i sur., 2002b). Poslije separacije i pročišćavanja maslinovog ulja, čest je slučaj pojava замуćenosti ulja radi prisutnih čestica biljnog tkiva i pigmenta te je takvo ulje potrebno još i dekantirati u konusnim dekanterima kako bi se spriječio negativan utjecaj na kvalitetu ulja (oksidacija, hidroliza) (Kalogianni i sur., 2019a).

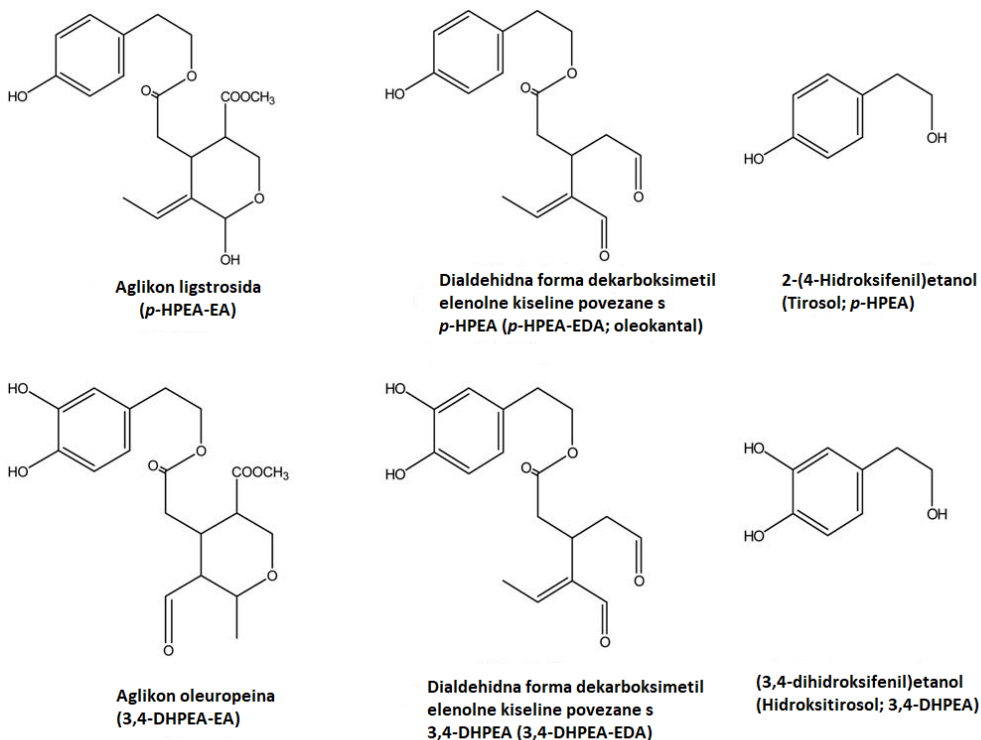


**Slika 1.** Proizvodnja maslinovog ulja; a) centrifugatorom s 3 faze, b) centrifugatorom s 2 faze (prema Kalogianni i sur., 2019a)

### 2.3. KEMIJSKI SASTAV DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Mezokarp ploda masline akumulira široki raspon sekundarnih metabolita. Glavni predstavnici sekundarnih metabolita su sekoiridoidi, skupina monoterpena s otvorenim prstenom metilciklopentana, a koji su tipični za biljke iz porodice *Oleaceae* (Alagna i sur., 2012). Sekoiridoidi su fenolni spojevi koji se nalaze u velikoj količini u plodu maslina, a u svojoj strukturi mogu sadržavati i glikozidni dio. Sekoiridoidi nisu topivi u ulju te nakon mehaničke obrade maslina samo mali udio prijeđe u ulje. Najvažniji sekoiridoidi maslina su oleuropein, dimetiloleuropein, oleurosid, ligstrosid, nuzenid te njihovi aglikonski oblici kao što su dialdehid dekarboksimetil elenolne kiseline povezan sa 3,4-DHPEA ili *p*-HPEA (odnosno 3,4-DHPEA-EDA i *p*-HPEA-EDA), izomeri aglikona oleuropeina (3,4-DHPEA-EA) i aglikona ligstosida (*p*-HPEA-EA) (Obied i sur., 2008). Sekoiridoidni spoj, *p*-HPEA-EDA koji se još naziva i oleokantal, je identificiran u ekstra djevičanskom maslinovom ulju, ali nikad i u samom plodu masline, iz čega se može zaključiti da nastaje pod enzimskim djelovanjem nakon berbe (Beauchamp i sur., 2005). Ostali fenolni spojevi masline su fenolne kiseline, fenolni alkoholi (kao što su hidroksitirosol- 3,4-DHPEA i tirosol- *p*-HPEA), flavonoidi i lignani (Oliveras López i sur., 2008). Plodovi masline

različitih sorti mogu sadržavati i visoki udio verbaskoida (Servili i sur., 2004) te ostalih fenolnih spojeva koji upućuju na zrelost ploda kao što su homovanilinska kiselina, 3,4-dihidroksifenilacetatna kiselina (DHPAC), kavaska kiselina, p-kumarinska kiselina, floretinska kiselina, vanilinska kiselina te niski udio i komselogosida (Jerman i sur., 2010).



**Slika 2.** Prikaz glavnih sekoiridoida djevičanskog maslinovog ulja (prema Piroddi i sur., 2017)

Fenolni sastav biljke i ploda masline (mezokarp, egzokarp, sjemenka, stabljika i list) se međusobno razlikuju. Primjerice, nuzenid i salidrosid se isključivo nalaze u sjemenki masline (Ryan i sur., 2002), dok se flavonoidi luteolin-7-glukozid, rutin i kvercetin nalazi u pokožici ploda masline (Servili i sur., 1999). Ostali spojevi koji se mogu pronaći u plodu masline su triterpenske kiseline (maslinična i oleanolična kiselina) (Goulas i Manganaris, 2012) te tokoferoli (Dabbou i sur., 2009).

Aktivacija endogenog enzima  $\beta$ -glukozidaze tijekom mljevenja i miješenja može odvojiti aglikonski dio oleuropeina od cijelog glikozida. Predložen mehanizam nastanka 3,4-DHPEA-EDA u maslinovom tijestu je da dimetiloleuropein služi kao prekursor za sintezu 3,4-DHPEA-EDA (Obied i sur., 2008).



Endogene oksidoreduktaze igraju važnu ulogu tijekom mljevenja i miješenja u izdvajanju ulja tako što potiču oksidaciju fenola (Servili i sur., 2008). Garcia i sur. (2001) su otkrili da sporo miješenje maslinovog tijesta uz prisutstvo kisika može sniziti koncentraciju ortofenola za 50 % u maslinovom ulju. Uz slobodne radikale, glavni oksidansi fenola u biljni proizvodima su oksidoreduktaze, i to polifenol oksidaza (PPO) te peroksidaza (POX).

Polifenol oksidaza je ključan enzim uključen u oksidaciju fenola, kako u fiziološkom procesu sazrijevanja ploda masline tako i u bilo kojem obliku manipulacije plodom koji uključuje mehaničko oštećenje tkiva (Pourcel i sur., 2006). Oksidacija fenola preko polifenol oksidaze se sastoji od dvije reakcije; hidroksilacije monofenola do ortodifenola te oksidacije ortodifenola do kvinona (García-Rodríguez i sur., 2011).

Peroksidaza oksidira fenole kao poželjne supstrate za tvorbu peroksida, najčešće vodikovog peroksida, tvoreći tako izuzetno reaktivne intermedijare slobodnih radikala koji, nakon što su oslobođeni sa enzima, lako kondenziraju stvarajući polimerne produkte. Iako je utjecaj peroksidaze na oksidaciju fenola ograničen sa dostupnošću vodikovog peroksida, autooksidacija fenola uzrokovana oštećenjem tkiva ploda masline povećava udio vodikovog peroksida što može doprinijeti aktivnosti enzima peroksidaze te poboljšati oksidaciju fenolnih spojeva (Takahama i Oniki, 2000). Enzimi polifenol oksidaza i peroksidaza djeluju sinergistički, polifenol oksidaza generira vodikov peroksid tijekom oksidacija fenolnih spojeva, čime nastaju kvinoni, a zatim peroksidaza koristi kvinon i vodikov peroksid kao supstrate za daljnje reakcije (García-Rodríguez i sur., 2011).

Hlapivi spojevi djevičanskog maslinovog ulja najčešće nastaju oksidacijom masnih kiselina. Općenito se smatra da su biljni endogeni enzimi, preko lipoksigenaznog puta, odgovorni za pozitivnu percepciju arome djevičanskog maslinovog ulja, dok su kemijske oksidacije i oksidacije nastale pomoću egzogenih enzima (uglavnom mikrobiološkom aktivnošću) povezani sa senzorskim defektima maslinovog ulja. Procesiranje i skladištenje maslina i maslinovog ulja značajno doprinosi razvoju aroma te na kraju i same kvalitete maslinovog ulja (Venkateshwarlu i sur., 2004; Angerosa, 2002). Razumijevanje stadija u kojem nastaju hlapivi spojevi može se upotrijebiti za kontrolu sastava hlapivih spojeva maslinovog ulja, vodeći prema proizvodnji i konzumaciji ulja bolje kvalitete (Kalua i sur., 2007).

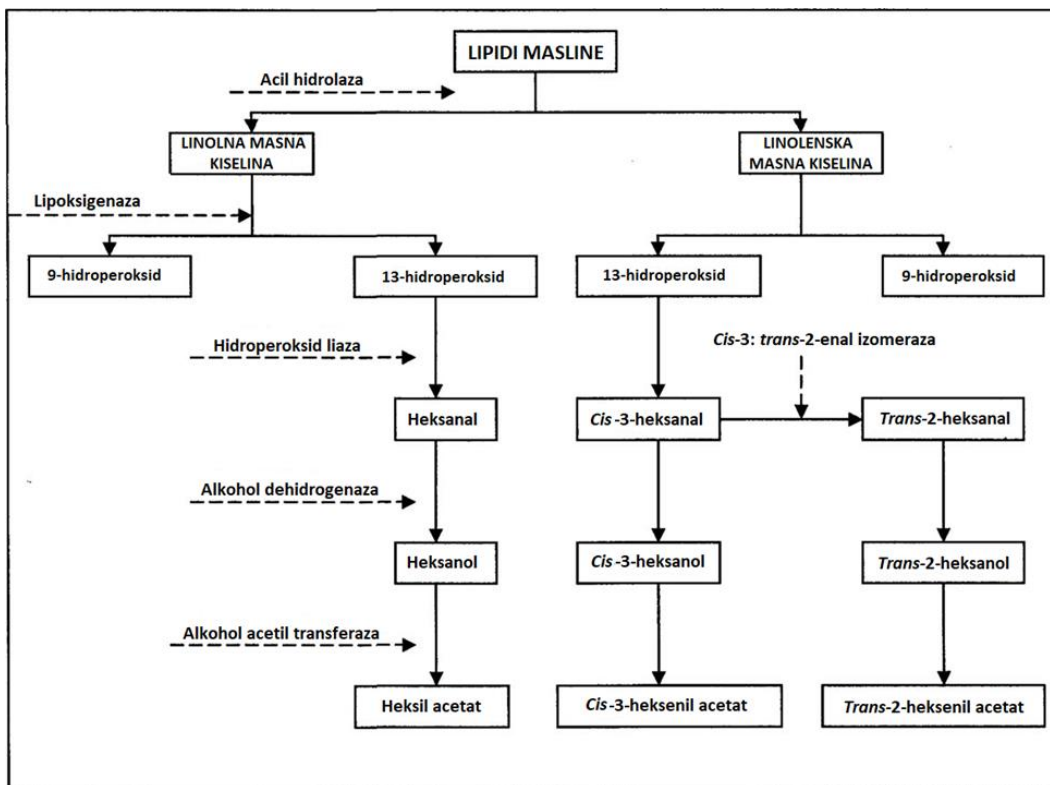
Hlapivi spojevi su komponente male molekulske mase (manje od 300 Daltona) koje isparavaju na sobnoj temperaturi. Neki hlapivi spojevi mogu doseći epitel olfaktornog tkiva te se otapaju u mukozu, nadražuju olfaktorne receptore te dolazi do osjećaja mirisa (Angerosa, 2002). Aroma djevičanskog maslinovog ulja se pripisuje aldehidima, ketonima, alkoholima, esterima, furanima, ugljikovodicima te ostalim još neotkrivenim hlapivim spojevima. Glavnina hlapivih komponenti u maslinovom ulju su C6 i C5 hlapivi spojevi. Heksanal, trans-2-heksenal, heksan-1-ol i 3-metilbutan-1-ol su nađeni u većini europskih djevičanskih maslinovih ulja (Angerosa, 2002; Kiritsakis, 1998; Aparicio i sur., 1997).

Hlapivi su spojevi od izuzetne važnosti za kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja. Hlapivi spojevi koji se u djevičanskom maslinovom ulju nalaze ispod granice detekcije olfaktornog sustava, mogli bi odigrati važnu ulogu u razumijevanju nastajanja i degradacije hlapivih spojeva koji su važni za aromu ulja te bi mogli poslužiti kao korisni markeri kvalitete (Buttery i Takeoka, 2004). U ove frakcije su uključeni C5 karbonilni spojevi, pentenoli, ugljikovodici i mali spojevi koji nisu nastali razgradnjom masnih kiselina (Buttery i Takeoka, 2004; Angerosa i sur., 1998).

Odsutnost C6 aldehida, alkohola i estera iz lipoksigenaznog puta i prisutstvo mnogih aldehida nastalih kemijskom oksidacijom, uključujući heksanal nastao kemijskim i enzimatskim putem, dovodi do negativnog okusa maslinovog ulja. Spojevi koji uzrokuju neugodan okus maslinovog ulja su potencijalno toksični i imaju nizak prag detekcije pomoću mirisa (Ha i sur., 2004).

Proizvodnja hlapivih spojeva, tijekom klimakterijske faze ili tijekom procesiranja, uključuje nekoliko puteva nastanka (Buttery i Takeoka, 2004) iako su uglavnom hlapive komponente u djevičanskom maslinovom ulju nastale kemijskom i enzimskom oksidacijom. Kao što je već rečeno, hlapivi spojevi nastali kemijskom oksidacijom su odgovorni za negativan okus te su povezani sa užglosti ulja. S druge pak strane, enzimске oksidacije maslinovog ulja, pogotovo lipoksigenazni put, se smatraju zaslužnim za pozitivnu aromu ulja (Angerosa, 2002; Kiritsakis, 1998). Jedan od puteva je enzimska razgradnja linolne i linolenske masne kiseline na C6 i C9 aldehide te C9 i C12 okso kiseline. Hlapivi spojevi, kao što su hlapive kiseline, aldehidi, esteri i ketoni, također nastaju tijekom metabolizma masnih kiselina. Lipoksigenazni put je biokemijska reakcijska shema koja je odgovorna za nastanak većine poželjnih aroma maslinovog ulja, uključujući C6 aldehide, alkohole i estere (Angerosa, 2002; Kiritsakis, 1998).

Lipoksigenazni put je iniciran otpuštanjem enzima tijekom procesa mljevenja i drobljenja tkiva ploda masline. Reakcijski put uključuje niz enzima koji će oksidirati (lipoksigenaza) i rascijepiti (hidroperoksid liaza) polinezasićene masne kiseline do aldehida. Zatim se ti aldehidi reduciraju do alkohola (alkohol dehidrogenaza) te esterificiraju do estera (alkohol acil transferaza) (Kalua i sur., 2007). U prvom koraku nastanka hlapivih spojeva, acil hidrolaza hidrolizira trigliceride i fosfolipide te oni otpuštaju slobodne masne kiseline. Zatim lipoksigenaza oksidira slobodne masne kiseline do hidroperoksida. Hidroperoksid liaza katalizira cijepanje hidroperoksida masnih kiselina na hlapive aldehide i okso kiseline. Nakon toga, enzim alkohol dehidrogenaza katalizira reverzibilnu redukciju alifatskih aldehida na alkohole. Nastali alkoholi zatim mogu tvoriti estere preko alkohol acil transferaze (katalizira tvorbu acetatnih estera pomoću acetil-CoA derivata) (Kalua i sur., 2007).



**Slika 3.** Lipoksigenazni put razgradnje masnih kiselina (prema Kalua i sur., 2007)

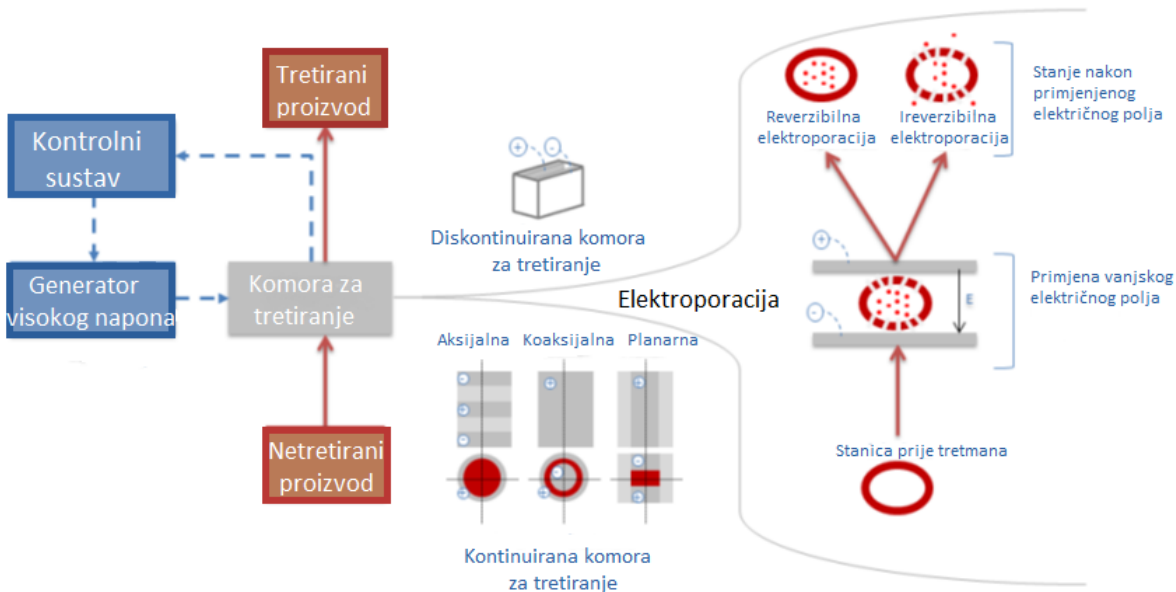
Skvalen, intermedijer puta sinteze sterola, je prekursor za  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirine i triterpenske diole, eritodiol i uvaol. Skvalen je važan spoj koji ima pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje, a prisutan

je isključivo u maslinovom i nekim biljnim uljima (Alagna i sur., 2012). Steroli, kao što su  $\beta$ -sitosterol, cikloartenol i 24-metilencikloartanol postupno se nakupljaju.

## 2.4. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE

Pulsirajuće električno polje (eng. *pulsed electric field, PEF*) je netoplinski proces kojim se djeluje vanjskim električnim poljem na biljno i/ili životinjsko tkivo kroz kratko vrijeme trajanja (od nekoliko nanosekundi do nekoliko milisekundi). Točni mehanizam elektroporacije, odnosno elektropermeabilizacije membrane nije još u potpunosti razjašnjen, ali je prihvaćeno da se permeabilizacija sastoji od 4 različita koraka koja uključuju (Saulis, 2010): (i) porast transmembranskog potencijala citoplazmatske membrane zbog naboja stanične membrane uslijed primjene vanjskog električnog polja, (ii) nastanak malih metastabilnih hidrofilnih pora ako se dosegne kritični prag transmembranskog potencijala (0,2-1,0 V), (iii) rast broja i/ili veličina pora tijekom PEF tretmana i (iv) stadij poslije PEF tretmana gdje dolazi do izlaska intracelularnog sadržaja i ulaska ekstracelularnih tvari tj. kao ireverzibilna elektroporacija ili zatvaranje pora i obnova membranske funkcije tj. reverzibilna elektroporacija (Chemat i sur., 2017).

Efikasnost permeabilizacije stanične membrane, kao što je prikazano na slici 4, ovisi o nekoliko procesnih parametara (jakosti električnog polja, vremenu tretmana, specifičnoj energiji, obliku i širini pulsa, frekvenciji i temperaturi), načinu tretmana (u serijama ili kontinuirano) konfiguraciji komore u kojoj se vrši tretman (kolinearna, koaksijalna ili paralelna), fizikalno-kemijskim karakteristikama tretiranog matriksa (pH i provodljivost), svojstvima tretiranih stanica (veličina, oblik, membrane, stanična stjenka) i obliku stanja (suspenzija, čvrsto stanje, polučvrsto) (Chemat i sur., 2017).



**Slika 4.** Shema djelovanja tretmana pulsirajućim električnim poljem (prema Chemat i sur., 2017)

Glavna prednost primjene PEF tehnologije se očituje u manjoj degradaciji nutritivnih i senzorskih svojstava hrane u usporedbi s toplinskim tehnikama. Primjerice, PEF tretirana pića imaju viši udio polifenola, karotenoida i vitamina u usporedbi sa pićima koja su podvrgnuta toplinskoj obradi (Chemat i sur., 2017).

Kombinacija PEF tehnologije i ekstrakcije pomoću difuzije je dokazano poboljšala ekstrakciju različitih komponenti smještenih u biljnoj stanici, kao što su pigmenti (klorofili, karotenoidi, betalaini), sukuroza, polifenoli te ostali sekundarni metaboliti (Puértolas i sur., 2012). PEF predtretman može se koristiti u vinarstvu prilikom maceracije (za vrijeme fermentacije), ekstrakcija polifenola je poboljšana te je na kraju vino bilo drugačijih organoleptičkih (boja) karakteristika (El Darra i sur., 2016). Primjena PEF tehnologije ima široki potencijal za zamjenu ili modifikaciju konvencionalnih toplinskih procesa za ekstrakciju šećera iz šećerne repe. PEF predtretman pripomogao je netoplinskoj ekstrakciji, doprinijevši višoj koncentraciji sukuroze, nižoj koncentraciji koloidnih nečistoća (naročito pektina), nižoj obojenosti i boljoj mogućnosti filtracije soka (Loginova i sur., 2011). Voćni sokovi (jabuka, grožđe) i biljna ulja (maslinovo) imaju značajno povećanje prinosa kad se PEF tretman koristi prije mehaničkog djelovanja (Chemat i

sur., 2017). PEF pretretman ne uzrokuje loše arome i okuse u ulju (Abenzoza i sur., 2013) i može doprinijeti manjoj zamućenosti, poboljšanju mirisa i višem udjelu polifenola u produktu (Turk i sur., 2012).

Jedno od najvećih industrijski problema pri proizvodnji ekstra djevičanskog i djevičanskog maslinovog ulja je nizak udio izdvojenog ulja s postojećim tehnologijama. Općenito se uspije lako izdvojiti samo 80 % ulja iz ploda masline (Puértolas i de Marañón, 2015). Ostatak ulja ostaje zarobljen u stanicama ili u emulziji s vodom, a što je povezano s različitim čimbenicima kao što su sorta masline ili uvjeti izdvajanja ulja (Aguilera i sur., 2010; Moya i sur., 2010; Espínola i sur., 2009). Također, značajni udio bioaktivnih spojeva kao što su polifenoli, fitosteroli i tokoferoli, i dalje ostaju u maslinovom tijestu (Dermeche i sur., 2013; Aliakbarian i sur., 2011). U posljednje vrijeme, najčešći način za povećanje iskorištenja prinosa je povećanje vremena i/ili temperature miješenja. No, ovaj način povećanja iskorištenja ima i svoju negativnu stranu, a to je da narušava senzorska svojstva maslinovog ulja, tako da je upotreba ovih načina ograničena za ulja lošije kvalitete (Anegrosa i sur., 2001). Zbog tog razloga, posvećuje se izrazito mnogo istraživačkog rada s ciljem pronalaska inovativnih i neagresivnih tehnika za poboljšanje proizvodnje djevičanskih i ekstra djevičanskih maslinovih ulja (Puértolas i de Marañón, 2015).

Zaostalo ulje predstavlja veliki ekonomski gubitak za uljarsku industriju, dosežući vrijednosti i do 4 kg maslinovog ulja/100 kg prerađenih maslina (Chiachierini i sur., 2007). Uzimajući u obzir dobivene podatke, PEF tretman bi mogao potencijalno izvući oko 50 % zaostalog ulja u komini masline što bi dovelo do povećanja prinosa djevičanskog odnosno ekstra djevičanskog maslinovog ulja sa 80 na 90 %, smanjujući posljedično nusprodukte kao što su komina i vegetabilna voda i imajući pozitivan učinak na okoliš. U srednje velikoj uljari kapaciteta 3000 kg/h (16 radnih sati na dan) PEF tretman bi mogao potencijalno povećati proizvodnju djevičanskog odnosno ekstra djevičanskog maslinovog ulja za 1277 kg (sa 9600 na 10 877 kg) te bi došlo do porasta zarade (zbog povećanja od 13 % za iskorištenje procesa) čime bi se financijski pokrila ulaganja u PEF opremu (Puértolas i de Marañón, 2015).

U kontroliranim uvjetima proizvodnje maslinovog ulja (24 °C; 60 minuta miješenja) iskorištenje je iznosilo 20 kg/100 kg (kontrolni uzorak). Primjenom PEF tretmana (2 kV/cm, 11.25 kJ/kg) na maslinovo tijesto nakon miješenja (24 °C; 60 minuta) značajno se povećao ( $p < 0.05$ ) prinos iskorištenja ulja i to na 22,66 kg/100 kg. Na temelju ovog podatka, vidi se da je PEF tehnologija

dopriniijela povećanju iskorištenja za 2,66 kg maslinovog ulja/100 kg prerađenih maslina, što je 13,3 % bolji prinos u odnosu na kontrolni uzorak. Utjecaj PEF tretmana na povećano izdvajanje ulja može se objasniti pomoću elektroporacije stanične membrane te je posljedica toga veći prijenos masa (Puértolas i sur., 2012). PEF djeluje tako što pomaže u oslobađanju zaostalog ulja u vakuolama stanica mezokarpa, koje nisu oštećene u procesima drobljenja i mljevenja (Chiacchierini i sur., 2007; Clodoveo i sur., 2013). Također uz zaostalo ulje u mezokarpu stanica, u konvencionalnoj proizvodnji maslinovog ulja, dio zaostaje i u emulziji ulje/voda koje na kraju biva uklonjeno s kominom nakon centrifugiranja (Aguilera i sur., 2010; Espínola i sur., 2009). Poteškoće u oslobađanju ulja iz emulzija leži u tome što su kapljice obavijene membrana lipoproteina (Espínola i sur., 2009). Tretiranjem maslinovog tijesta PEF-om može doći do razaranja membrane lipoproteina, čime se pospješuje oslobađanje ulja. Nadalje, primjena električnog polja se smatra jednom od uspješnijih deemulzirajućih tehnika, jer električno polje dovodi do koalescencije masnih kapljica i odvajanja uljne faze od vodene (Kwon i sur., 2010; Rayat i Feyzi, 2011).

Primjena PEF tretmana na maslinovo tijesto (2 kV/cm, 11.25 kJ/kg) dovodi do rasta slobodnih masnih kiselina u ulju (sa 0,19 % na 0,22 %), no kontrolni i tretirani uzorak su i dalje ispod najviše dopuštene granice za ekstra djevičansko maslinovo ulje (Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91). Blago povećanje slobodnih masnih kiselina nije utjecalo negativno na senzorska svojstva maslinovog ulja. Značajnih razlika između kontrolnog i tretiranog ulja nije bilo ni kod ostalih kemijskih parametara ( $K_{270}$ ,  $K_{232}$ , peroksidni broj). Nadalje, korištenje PEF tretmana (11,25 kJ/kg; 2 kV/cm) dovodi do značajnog porasta fenolnih spojeva (i to sa 404 na 451 mg/kg, što iznosi 11,5 % povećanja), fitosterola (i to sa 404 na 451 mg/kg, što iznosi 11,5 % povećanja), tokoferola (za 15 % ,sa 19,2 mg/100 g u kontrolnom uzroku na 22 mg/100 g u tretiranom uzorku) (Puértolas i de Marañón, 2015).

U istraživanju Abenoza i sur. (2013) PEF tretman također nije djelovao na senzorska svojstva maslinovog ulja kao ni na sastav masnih kiselina, analize su pokazale da nema značajnih razlika u sadržaju zasićenih, nezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. Slični rezultati su dobiveni i za oleinsku masnu kiselinu, što je važno je jer oleinska masna kiselina najviše zastupljena u maslinovom ulju s nutritivnog gledišta.

## 2.5. NUTRITIVNA VRIJEDNOST DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO), na temelju prethodnih priopćenja EFSA (European Food Safety Authority) i FDA (Food and Drug Administration) za zdravu prehranu je uključila djevičansko maslinovo ulje kao izvor nezasićenih masti, koje bi trebale biti zastupljenije od zasićenih (WHO, 2015).

Djevičansko maslinovo ulje ima blagotvoran utjecaj na zdravlje zbog visokog sadržaja mononezasićenih masnih kiselina (MUFA). Među njima, oleinska masna kiselina (C18:1,  $\omega$ -9) je zastupljena sa 49-83 % od ukupnog iznosa masnih kiselina djevičanskog maslinovog ulja te je ujedno najvažnija masna kiselina koja ima pozitivan utjecaj na gastrointestinalni i endokrini sustav te ublažava nastanak kardiovaskularnih bolesti (Servili i sur., 2013). Oleinska masna kiselina utječe na bolju sekrecijsku aktivnost gušterače i jetre (lučenje žuči) te poboljšava zaštitu želučane mukoze tako što snižava lučenje klorovodične kiseline, čime se snižava rizik nastanka želučanog ulkusa (Bermudez i sur., 2011). Najuvjerljiviji medicinski dokaz o povoljnom utjecaju na zdravlje MUFA je prevencija nastanka kardiovaskularnih bolesti. Modifikacija lipida plazme i lipoproteina, utjecaj na sastav membrana i poboljšanje fluidnosti krvnih stanica, sprječavanje koagulacije, poboljšanje u regulaciji glukoze i krvnog tlaka, ublažavanje upala i oksidativnog stresa u uvjetima posta su samo neke od bioloških osobina kardioprotektivne oleinske kiseline (Piroddi i sur., 2017).

S druge strane, polinezasićene masne kiseline (PUFA) linolna (C18:2,  $\omega$ -6) i linolenska (C18:3,  $\omega$ -3) su esencijalne masne kiseline, neizostavne komponente stanične strukture, potrebne su za razvoj mozga i očne retine (Viola i Viola, 2009). Arahidonska masna kiselina (C20:4, n-6) i eikosapentaenska masna kiselina (C20:5, n-3) su prekursori nezasićenih masnih kiselina u ljudskom organizmu, sudjeluju u eikosanoidnom metabolizmu gdje se reguliraju važne funkcije inflamatornih leukocita, trombocita te krvnih stanica (Piroddi i sur., 2017).

Skvalen ima važnu ulogu u metabolizmu kolesterola, a istraživanja *in vivo* i *in vitro* povezuju skvalen s apsorpcijom, sintezom, esterifikacijom i eliminacijom kolesterola pomoću acetil koenzima A (Naziri i sur., 2014). U isto vrijeme snižava koncentraciju kolesterola, a povećava učinak statina. Skvalen također smanjuje negativan učinak UV zračenja na kožu jer sprječava oštećenje DNK stanica kože (Lopez i sur., 2014).



$\beta$ -sitosterol koji čini 93 % ukupnih fitosterola je u *in vivo* istraživanjima pokazao odlično snižavanje koncentracije ukupnih i LDL kolesterola te potpomaže u apoptotskoj signalizaciji stanica raka prostate, a  $\beta$ -sitosterol se i koristi u liječenju benigne hiperplazije prostate (Woyengo i sur., 2009; Awad i Fink, 2000). Djevičansko maslinovo ulje sadrži značajne količine pigmenata (klorofila i karotenoida). Klinička istraživanja su dokazala antioksidacijsko djelovanje karotenoida, kao i inhibicijsko djelovanje u tvorbi tumora i kardiovaskularnih bolesti te kožnih i očnih oboljenja. Karotenoidi imaju važnu ulogu u povećanju gustoće žute pjege te sprječavanju nastanka očne mrežice.  $\beta$ -karoten (prekursor vitamina A) ima ulogu hvatanja singlet kisika i sprječavanja daljnje oksidacije, dok lutein štiti stanične membrane od lipidne peroksidacije te također ima zaštitnu ulogu retine od oksidacijskih oštećenja (Lopez i sur., 2014).

Tokoferoli (vitamin E) u djevičanskom maslinovom ulju su dominantno zastupljeni kao  $\alpha$ -tokoferol (preko 90 % ukupnih tokoferola u ulju) (Galli i sur., 2017).  $\alpha$ -tokoferol je jedan od najvažnijih lipofilnih antioksidansa (Ghanbari i sur., 2012) te ima zaštitnu ulogu od lipidne peroksidacije staničnih membrana i lipoproteina (Traber i Atkinson, 2007), štiti tkiva od oksidacija i upalnih procesa povezanih sa starenjem, degenerativnim bolestima i karcinomom (Galli i sur., 2017).

Oleuropein je pokazao antihipertenzijsko djelovanje, endokrinalno, enzim modulatивно djelovanje te citostatičnu aktivnost, dok je elenolna kiselina pokazala antimikrobno i antiviralno djelovanje (Obied i sur., 2005). Oleuropein je pokazao *ex vivo* antioksidacijsku aktivnost u srčanom mišiću štakora (Manna i sur., 2004) te anti-ishemijsko, hipolipidno te antioksidativno djelovanje *in vivo* u pokusnih kunića (Andreadou i sur., 2006). Upalni odgovor se smatra važnim dijelom nastanka kardiovaskularnih bolesti, a protuupalno djelovanje oleuropeina je dokazano u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima (Puel i sur., 2006; Miles i sur., 2005). Aglikon oleuropeina, koji je zastupljeniji u maslinovom ulju, pokazao je zaštitnu ulogu i preventivno djelovanje u nastajanju krvožilnih bolesti tako što sprječava nakupljanje plaka i nastanka ateroskleroze (Dell'Agli i sur., 2006). Oleuropein uzrokuje inhibiciju rasta patogene bakterije *Staphylococcus aureus* (Zanichelli i sur., 2005) te antiviralno djelovanje protiv virusa AIDS-a koji uzrokuje HIV (Lee-Huang I sur., 2007) te rhabdovirusa koji uzrokuje virusnu hemoragijsku septokemiju (Micol i sur., 2005). Također postoje naznake da oleuropein djeluje i protiv razvitka Alzheimerove bolesti (Bazoti sur., 2006). Oleuropein je pokazao u *in vivo* istraživanjima hipoglikemijsku aktivnost na pokusnim zečevima

(Al-Azzawie i Alhamdani, 2006). Oleokantal je u *in vitro* istraživanjima pokazao bioaktivno djelovanje; antiproliferacijsku aktivnost (Fabiani i sur., 2006) i antibakterijsku aktivnost prema patogenoj bakteriji *Helicobacter pylori* (Romero i sur., 2007).

Sekoiridoidi imaju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje, preveniraju aterosklerozu te inhibiraju peroksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL) (Alagna i sur., 2012). Brojna istraživanja su dokazala da također imaju i antikancerogeno djelovanje (Omar, 2010) te mogu sudjelovati u prevenciji osteoporoze (Puel i sur., 2006). Uz to, sekoiridoidi utječu na kvalitetu maslinovog ulja, povoljno djeluju na okus, zaslužni su za gorki i opori okus te kao primarni antioksidansi, sekoiridoidi su uključeni u oksidacijsku stabilnost ulja (Servili i sur., 2004).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJAL

U ovom diplomskom radu kao materijali su korišteni komercijalno dostupni izolati enzima  $\beta$ -glukozidaze iz *Prunus dulcis* (Sigma-Aldrich) i lipoksigenaze iz *Glycine max* (Sigma-Aldrich).

### 3.2. REAGENSI

- Acetonitril (Kemika)
- Albumin goveđeg seruma (Santa Cruz Biotechnology)
- $\beta$ -glukozidaza (Sigma-Aldrich)
- Coomasie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich)
- Deionizirana voda
- Etanol (96 % v/v) (Gram-mol)
- Fosforna kiselina (85 % v/v) (Carlo Erba Reagens)
- Heksan (Gram-mol)
- Klorovodična kiselina (37 % v/v) (Fischer Scientific)
- Linolna kiselina (Sigma-Aldrich)
- Lipoksigenaza (Sigma-Aldrich)
- Metanol (J.T.Baker®)
- 4-nitrofenilglukopiranozid (Sigma-Aldrich)
- Natrijev acetat (Kemika)
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika)

- Natrijev hidrogenfosfat (bezvodni) (Kemika)
- Natrijev karbonat (Gram-mol)
- Octena kiselina (99 % v/v) (Lachner)
- Oleuropein (Sigma-Aldrich)
- 2-propanol (Kemika)
- Tween 40 (Fluka)

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Priprema modelnih otopina enzima $\beta$ -glukozidaze

Modelna otopina za određivanje aktivnosti enzima  $\beta$ -glukozidaze spektrofotometrijskom metodom sastojala se od 15 mL otopine *p*-nitrofenilglukopiranozida (*p*-NPG,  $c=15$  mmol/L) u acetatnom puferu ( $c=0,5$  mol) pH 5,5 i otopine enzima ( $\gamma=5$  mg/mL) otopljenog u istom acetatnom puferu. Za određivanje aktivnosti enzima HPLC metodom modelna otopina se sastojala od 1,5 mL otopine oleuropeina ( $c=6,5$  mmol/L) u acetatnom puferu ( $c=0,5$  mol) pH 5,5 i 10  $\mu$ L enzima.

#### 3.3.2. Priprema modelnih otopina enzima lipoksigenaze

Za određivanje aktivnosti enzima lipoksigenaze spektrofotometrijskom metodom modelna otopina je sadržavala 15 mL 0,1 mol-a fosfatnog pufera pH 6,0; 50  $\mu$ L otopine enzima ( $\gamma=5$  mg/mL) u istom puferu i 300  $\mu$ L supstrata (10 mmol otopine linolenske masne kiseline). Modelna otopina za određivanje aktivnosti lipoksigenaze HPLC metodom sadržavala je 200  $\mu$ L enzima otopljenog u 4,3 mL 0,1 mol-a fosfatnog pufera pH 6,0 te 500  $\mu$ L linolenske kiseline.

Otopina linolenske masne kiseline pripremljena je prema metodi Axelrod i suradnika (1981). U 5 mL deionizirane vode u koju se prethodno upuhivao dušik dodano je 190  $\mu$ L linolenske masne kiseline zajedno s 256  $\mu$ L Tween-40. Sadržaj se pažljivo miješao pazeći da se ne zapjeni, a otapanje

emulzije se pospješilo dodatkom 600  $\mu\text{L}$  1 mol-a NaOH te se tikvica od 25 mL nadopunila vodom, u koju se prethodno upuhivao dušik, do oznake. Nakon pripreme, otopina je podjeljena u alikvote i čuvana na  $-80^{\circ}\text{C}$  i korištena za izradu 10 mmol otopine linolenske masne kiseline.

### 3.3.3. Simulacija miješenja na $27^{\circ}\text{C}$ u vremenskom periodu od 40 minuta

Modelne otopine enzima i supstrata su temperirane na temperaturu od  $27^{\circ}\text{C}$  te nakon uspostave enzimske reakcije, spektrofotometrijski su (nakon 1, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 minuta) mjerene aktivnosti enzima  $\beta$ -glukozidaze i lipoksigenaze prema opisanim metodama u potpoglavljima 3.3.5. Određivanje aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze spektrofotometrijskom metodom i 3.3.6. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze spektrofotometrijskom metodom.

### 3.3.4. Tretman pulsirajućim električnim poljem (PEF)

Modelne otopine enzima i supstrata ( $\beta$ -glukozidaza i *p*-NPG te lipoksigenaza i linolenska masna kiselina) tretirane su pulsirajućim električnim poljem kroz 1, 2 i 5 minuta pri frekvenciji od 25 i 125 Hz i napona od 2 kV/cm i 10 kV/cm kako bi se utvrdio utjecaj PEF-a na aktivnost enzima ploda masline. Prije početka tretmana, enzimi i supstrati su temperirani na temperaturu od  $25^{\circ}\text{C}$ . Nakon tretmana PEF-om, 5 mL reakcijske smjese je slijedećih 20 sekundi prebačeno u spektrofotometrijsku kivetu te je određena aktivnost prema opisanim metodama (3.3.5. Određivanje aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze spektrofotometrijskom metodom i 3.3.6. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze spektrofotometrijskom metodom). Od ostatka modelne otopine, 5 mL je nakon tretmana inkubirano dodatnih 30 minuta na  $25^{\circ}\text{C}$  kako bi se simulirao postupak miješenja maslinovog tijesta te je ponovno određena aktivnost enzima (metodama opisanim u potpoglavljima 3.3.5. i 3.3.6.).

### 3.3.5. Određivanje aktivnosti $\beta$ -glukozidaze spektrofotometrijskom metodom

Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze određivana je prema metodi opisanoj u radu Romero-Segura i sur. (2009). Princip određivanja aktivnosti enzima zasniva se na mjerenju povećanja apsorbancije na 405 nm uzrokovane odcjepljivanjem molekule glukoze s *p*-nitrofenilglukopiranozida (*p*-NPG) pod djelovanjem  $\beta$ -glukozidaze i formiranjem *p*-nitrofenola (*p*-NP).

Nakon provedenog tretmana, modelne otopine prebace se u semimikro kivete volumena 1,5 mL te se mjeri apsorbancija na 405 nm. Koncentracije nastalog *p*-nitrofenola izračunata je iz izrađene baždarne krivulje [1] ovisnosti apsorbancije o koncentraciji *p*-nitrofenola (0,15 do 15 mmol/mL).

$$c(p\text{-nitrofenol}) = \frac{A-0,0812}{0,6092} \quad [1]$$

gdje je:

- $c(p\text{-nitrofenol})$  - koncentracija formiranog *p*-nitrofenola (mmol/L)
- $A$  - apsorbancija *p*-nitrofenola pri 405 nm

Koeficijent korelacije za baždarnu krivulju ( $r$ ) iznosi 0,9956.

Aktivnost enzima izražena je kao koncentracija *p*-nitrofenola koju proizvede 1 mg  $\beta$ -glukozidaze i izračuna se prema formuli [2]. Točna koncentracija proteina u otopini enzima metodom po Bradford-u (opisanoj u podpoglavlju 3.3.7.).

$$AE = \frac{c(\text{produkta})}{\gamma(\text{proteina}) * \text{Volumen}(\text{enzima})} * \text{Volumen}(\text{reakcijske smjese}) \quad [2]$$

gdje je

- $AE$  – aktivnost enzima (mmol/mL\*mg)
- $c(\text{produkta})$  – koncentracija formiranog *p*-nitrofenola (mmol/L)
- $\gamma(\text{proteina})$  – koncentracija proteina u otopini enzima (mg/mL)
- $V(\text{enzima})$ - volumen otopine enzima (mL)
- $V(\text{reakcijske smjese})$ - volumen reakcijske smjese (mL)

### 3.3.6. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze spektrofotometrijskom metodom

Aktivnost lipoksigenaze se određivala prema metodi objavljenoj u radu Luaces i sur. (2007). Metoda se temelji na mjerenju količine nastalih hidroperoksida u modelnoj otopini koji pokazuju maksimum apsorbancije na 234 nm.

Uzorak se prebace u kvarcnu kivetu te se mjeri apsorbancija na 234 nm. Razlika apsorbancija ( $\Delta A$ ) izračunata je prema formuli [3] a koncentracija hidroperoksida linolne masne kiseline prema formuli [4] uzimajući u obzir molarni ekstincijski koeficijent od  $2,5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

$$\Delta A = A_1 - A_2 - A_3 \quad [3]$$

gdje je

- $A_1$  – apsorbancija modelne otopine
- $A_2$  – apsorbancija enzima u modelnoj otopini
- $A_3$  – apsorbancija masne kiseline u modelnoj otopini

$$c(\text{hidroperoksida}) = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l} * 1000 \quad [4]$$

gdje je

- $c(\text{hidroperoksida})$  – koncentracija hidroperoksida (mmol/mL)
- $\Delta A$  – apsorbancija hidroperoksida pri 405 nm
- $\epsilon$  – molarni ekstincijski koeficijent ( $2,5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
- $l$  – širina kivete (1 cm)

Aktivnost enzima izražena je kao količina produkta koju proizvede 1 mg enzima i izračuna se prema formuli [5]. Točna koncentracija proteina u otopini lipoksigenaze određena je metodom po Bradford-u (opisanoj u podpoglavlju 3.3.7.).

$$AE = \frac{c(\text{hidroperoksid})}{\gamma(\text{proteina}) * V(\text{enzima})} * V(\text{reakcijske smjese}) \quad [5]$$

gdje je:

- $AE$  – aktivnost enzima (mmol/mL\*mg)

- $c(\text{hidroperoksida})$  – koncentracija nastalih hidroperoksida (mmol/L)
- $\gamma(\text{proteina})$  – koncentracija proteina u otopini enzima (mg/mL)
- $V(\text{enzima})$ - volumen otopine enzima (mL)
- $V(\text{reakcijske smjese})$ - volumen reakcijske smjese (mL)

### 3.3.7. Određivanje proteina po Bradford-u

Metoda određivanja proteina temelji se na pomaku apsorpcije u kiselj otopini boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250). Boja se veže na proteine što rezultira promjenom boje iz crvenosmeđe u plavu boju i pomakom apsorpcijskog maksimuma s 465 nm na 595 nm (Bonjoch i Tamayo, 2001).

U polimernu semimikro kivetu otpipetirano je 0,3 mL otopine enzima i dodano 1,2 mL Bradfordovog reagensa (1% otopina CBB G-250 u vodi uz dodatak 5 % (V/V) 96 % etanola i 10 % (V/V) fosfatne kiseline). Kiveta se poklopi, a sadržaj kivete dobro promiješa i nakon 5 minuta mjeri apsorpcija pri 595 nm uz slijepu probu. Bitno je da očitana apsorpcija bude u rasponu od 0,2 do 1,0.

Za izračun koncentracije proteina izrađena je baždarna krivulja [6] pomoću standardnih otopina albumina goveđeg seruma u koncentracijama od 0,005 do 0,5 mg/mL.

$$\gamma(\text{proteina}) = \frac{A+0,0436}{13,7292} \quad [6]$$

gdje je

- $\gamma(\text{proteina})$  – masena koncentracija proteina (mg/mL)
- $A$  – apsorpcija otopine proteina pri 595 nm

Koeficijent korelacije za baždarnu krivulju ( $r$ ) iznosi 0,9954.



### 3.3.8. Optimiranje tretmana inovativnih tehnologija

Prilikom obrade podataka tretmana inovativnih tehnologija PEF-a, UTT-A i UZV-a primijenjena je metodologija odzivnih površina – RSM (eng. Response Surface Methodology), a valjanost empirijskih modela za predviđanje aktivnosti enzima nakon tretmana te nakon tretmana i 30 minuta miješenja pri temperaturi 25 °C ispitana je metodom analize varijance (ANOVA) na 95%-tnoj razini vjerojatnosti. Prema pripadajućim koeficijentima determinacije ( $R^2$ ) i vrijednostima nedostataka modela odabrani su najbolji regresijski modeli za svaku promatranu zavisnu varijablu.

Nakon provedenog procesa optimiranja PEF, UTT i UZV tretmana, modelne otopine supstrata i enzima tretirane su primjenom dobivenih optimalnih parametara, a aktivnost enzima određena je HPLC metodama opisanim u potpoglavljima 3.3.9 i 3.3.10. (Određivanje aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze HPLC metodom i Određivanje aktivnosti lipoksigenaze HPLC metodom).

### 3.3.9. Određivanje aktivnosti $\beta$ -glukozidaze HPLC metodom u optimalnim uvjetima tretmana PEF-om, UTT-om i UZV-om

Određivanje aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze HPLC metodom provedeno je prema metodi opisanoj u radu Romero-Segura i sur. (2009) uz oleuropein kao supstrat. Nakon provedenog tretmana izdvojeno je 1,5 mL modelne otopine u koju je dodano 1,5 mL metanola kako bi se zaustavila reakcija. Drugih 1,5 mL modelne otopine je inkubirano 30 min na 25 °C kako bi se simulirao proces miješenja i reakcija razgradnje oleuropeina prekinuta je također dodatkom 1,5 mL metanola.

Tako pripremljeni uzorci injektirani su u HPLC sustav (Agilent Technologies LC 1200, Santa Clara, SAD). Razdvajanje fenolnih spojeva provedeno je na C18 nepolarnoj koloni (Luna 250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) prema metodi opisanoj u diplomskom radu Velagić (2016). Kao mobilna faza korištene su 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B):

- Volumen injektiranog uzorka: 20  $\mu$ L
- Protok otapala: 1 mL/min
- Eluacija: Gradijentna (tablica 1)
- Temperatura kolone: 30 °C

**Tablica 1.** Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine B (%)
0	10
3	10
30	50
40	60
45	100
50	100
50,1	10
60	10

Za detekciju oleuropeina i nastalih derivata korišten je DAD detektor (Agilent Technologies 1200 Series). Snimljeni su kromatogrami pri 280 nm. Tijekom cijelog vremena trajanja analize snimani su i UV spektri od 190 do 400 nm. Fenolni spojevi identificirani su usporedbom retencijskih vremena s retencijskim vremenima standarada, a kao dodatna potvrda korišteni su spektri komercijalnih standarada.

Aktivnost enzima je dobivena prema navedenim formulama:

$$x(\text{oleuropein}) = \frac{y+3,3019}{2272,7} \quad [7]$$

gdje je:

- $x$  (oleuropeina)- koncentracija oleuropeina ( $\mu\text{mol/mL}$ )
- $y$ - površina ispod pika oleuropeina ( $\text{mAU*s}$ )

$$x(\text{derivat oleuropeina}) = \frac{y-13,86}{160,95} \quad [8]$$

gdje je:

- x (derivata oleuropeina)- koncentracija oleuropeina ( $\mu\text{mol/mL}$ )
- y- površina ispod pika derivata oleuropeina ( $\text{mAU*s}$ )

$$AE = \frac{x(\text{spoja})}{\gamma(\text{proteina}) * V(\text{enzima})} * V(\text{reakcijske smjese}) \quad [9]$$

gdje je:

- AE- enzimska aktivnost ( $\mu\text{mol/mg}$ )
- x(spoja)- koncentracija spoja ( $\mu\text{mol/mL}$ )
- $\gamma$ (proteina) – koncentracija proteina u otopini enzima ( $\text{mg/mL}$ )
- V(enzima)- volumen otopine enzima ( $\mu\text{L}$ )
- V(reakcijske smjese)- volumen reakcijske smjese ( $\text{mL}$ )

### 3.3.10. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze HPLC metodom u optimalnim uvjetima tretmana PEF-om, UTT-om i UZV-om

Za određivanje aktivnosti lipoksigenaze pomoću HPLC metode korištena je modificirana metoda Soldo (2016). Nakon provedenog tretmana na modelnoj otopini enzima i supstrata u fosfatnom puferu. 5 mL istretirane modelne otopine se izdvoji se u epruvetu te zakiseli klorovodičnom kiselinom (1 mol/L) do pH 2,0 s ciljem inaktivacije lipoksigenaze. Iz reakcijske smjese se nizom od 3 ekstrakcije izoliraju produkti enzimske reakcije lipoksigenaze i linolenske masne kiseline (hidroperoksidi). U 5 mL reakcijske smjese doda se 10 mL smjese otapala za ekstrakciju heksan:2-propanol (95:5), a ekstrakcija se provodi snažnim miješanjem na Vortex miješalici u trajanju od 1 minute. Epruveta se ostavi da se razdvoje faze (gornji sloj organskog otapala i donji vodeni sloj). Organski slojevi od sve tri ekstrakcije se spoje, otapalo se otpari na rotavaporu do volumena 2 mL, prebaci u vijalicu te otpari do suha u struju dušika. Upareni ostatak može se čuvati na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize. Prije injektiranja u HPLC, suhi ostatak se resorbira u 1 mL mobilne faze (acetonitril:voda = 67:33) i sonificira u ultrazvučnoj kupelji 10 sekundi. Isti postupak inaktivacije enzima i izolacije

hidroperoksida proveden je i iz reakcijske smjese (5 mL) koja je nakon provedenog tretmana inkubirana 30 minuta na 25 °C.

Za određivanje hidroperoksida korišten je Agilent Technologies LC 1200 HPLC sustav (Santa Clara, SAD) na koji je instalirana C18 nepolarna kolona (Luna 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) temperirana na 35 °C. Kao mobilna faza korištene su 0,25 % otopina octene kiseline u vodi (mobilna faza A) i acetonitril (mobilna faza B) ukupnog protoka 1 mL/min kroz čitavo vrijeme trajanja analize, a korišteni gradijent prikazan je u tablici 2. U sustav je injektirano 10 µL pripremljenog uzorka. Kromatogrami su snimljeni pomoću DAD detektora (Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, SAD) na 234 nm, a čitavo vrijeme analize snimani su UV spektri od 190 do 400 nm.

**Tablica 2.** Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine B (%)
0	50
25	80
47	80
55	50
60	50

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

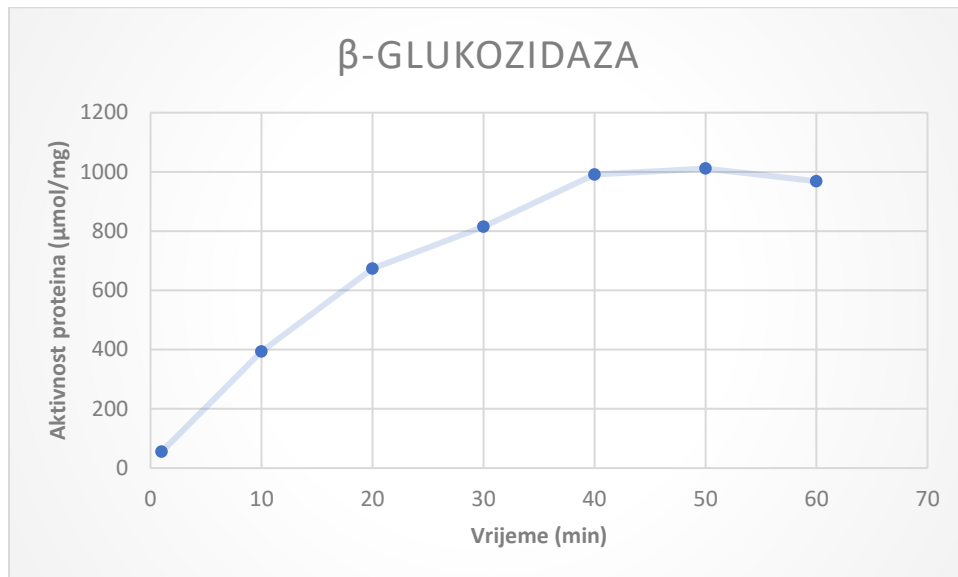
Tijekom provedbe istraživanja, modelni sustavi enzima maslina su tretirani miješenjem pri 27 °C (temperatura miješenja u laboratorijskoj uljari) s ciljem oponašanja stvarnog procesa miješenja kako bi se uvidjelo ponašanje modelnih enzima u takvim uvjetima. Dobiveni rezultati će poslužiti za daljnji tijek istraživanja kad će se primjenjivati maslinovo tijesto i nativni enzimi maslina.

Također, primjenom pulsirajućeg električnog polja (naponom od 2 i 10 kV/cm; frekvencijom 25 i 125 Hz te vremenskim intervalom od 1, 2 i 5 minuta) na modelne sustave enzima  $\beta$ -glukozidaze i lipoksigenaze i njihovih supstrata koji su temperirani na referentnoj temperaturi 25 °C se želi uvidjeti kakav je utjecaj te kako će se enzimi ponašati u takvim uvjetima. Hipoteza je da se aktivnost enzima povećava pri tretiranju PEF-om.

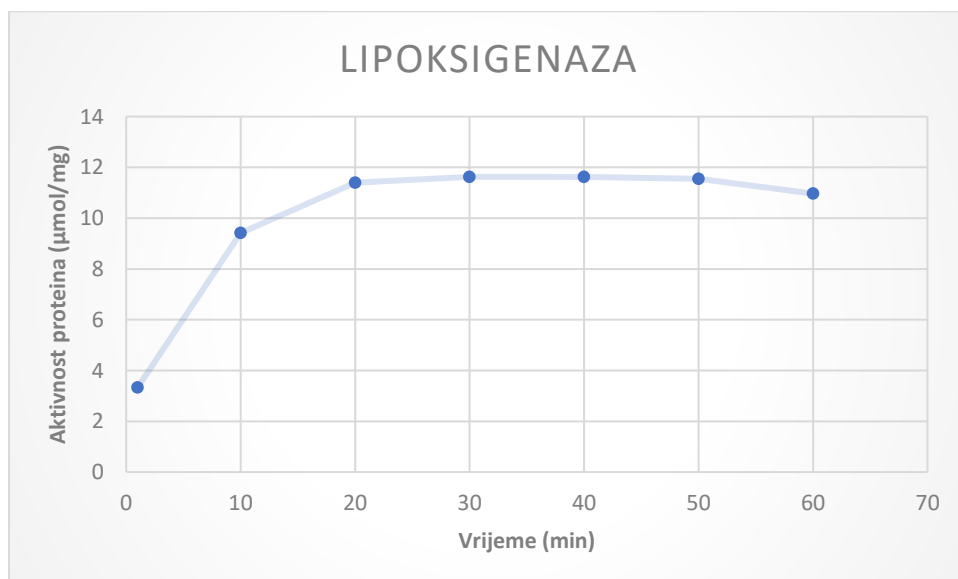
Optimiranje procesa PEF, UTT i UZV tretmana ima za cilj dobiti najbolje moguće modele koji bi poslužili prilikom daljnjeg istraživanja i tretiranja maslinovog tijesta dobivenog od autohtonih hrvatskih maslina.

HPLC analiza optimiranih PEF, UTT i UZV tretiranih uzoraka ima za cilj dokazati uspješno proveden postupak primjene inovativne tehnologije i to analizom koncentracije produkta enzimske aktivnosti u kromatogramima.

#### 4.1. Utjecaj uvjeta miješenja na enzimsku aktivnost pri 27 °C



**Slika 5.** Ovisnost aktivnosti proteina o vremenu miješenja pri konstantnoj temperaturi od 27 °C kao pokazatelj aktivnosti enzima β-glukozidaze



**Slika 6.** Ovisnost aktivnosti proteina o vremenu miješenja pri konstantnoj temperaturi od 27 °C kao pokazatelj aktivnosti enzima lipoksigenaze

Na slici 5 prikazana je ovisnost aktivnosti proteina o vremenu pri stalnoj temperaturi od 27 °C što predstavlja simulaciju miješenja maslinovog tijesta u stvarnim uvjetima, a s ciljem određivanja aktivnosti enzima  $\beta$ -glukozidaze. Iz slike je vidljiv nagli porast aktivnosti od 1. pa do 40. minute koji je linearan, nakon čega slijedi minimalni rast do 50. minute, a zatim blagi pad aktivnost enzima. Dobiveni rezultati ukazuju da su do 40. minute optimalni uvjeti za aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze, dok nakon 40. minute vjerojatno dolazi do samog zasićenja enzima sa supstratom što dovodi do stagnacije i pada aktivnosti. Rezultati objavljeni u literaturi (Elshafei i sur., 2011) se podudaraju sa rezultatima prikazani na slici 5.

Aktivnost enzima lipoksigenaze je opisana na slici 6 gdje je također prikazana aktivnost proteina o vremenu pri konstantnoj temperaturi od 27 °C. Sa slike je vidljiv značajan rast aktivnost od 1. do 10. minute, kao i od 10. do 20. minute, gotovo pa linearan, a nakon 20. minute do 30. minute uočen je minimalni rast aktivnosti. Nadalje, nakon 30. minute pa do 50. minute je vidljiva stagnacija u enzimskoj aktivnosti, dok je poslije 50. minute uočen je blagi pad aktivnosti enzima lipoksigenaze. Iz slike je vidljivo da enzimska aktivnost najveća na 30. minute, no također je i vidljivo da je tad enzim praktički potpuno zasićen supstratom. Do sličnih rezultata došlo se i u diplomskom radu Pavlić (2021).

## 4.2. Utjecaj PEF tretmana na aktivnost enzima

**Tablica 3.** Utjecaj PEF tretmana na aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze

Napon (kV/cm)	Frekvencija (Hz)	Vrijeme (minuta)	Temperatura (°C)	Koncentracija <i>p</i> -NP proteina nakon tretmana $\mu\text{mol/mg}$	Koncentracija <i>p</i> -NP proteina nakon inkubacije na 25 °C kroz 30 minuta $\mu\text{mol/mg}$
0	0	1	25,0	0,8	1027,1
0	0	2	25,0	158,4	1048,3
0	0	5	25,0	264,9	1248,6
2	25	1	24,3	21,9	594,8
2	25	2	23,4	32,9	544,7
2	25	5	22,7	90,4	574,0
2	125	1	24,2	18,6	652,4
2	125	2	23,5	35,2	546,8
2	125	5	22,8	105,1	599,0
10	25	1	21,7	15,5	998,0
10	25	2	21,5	46,4	1004,7
10	25	5	22,0	170,2	986,4
10	125	1	21,6	13,0	986,6
10	125	2	21,2	54,4	1047,2
10	125	5	21,9	193,9	1044,9



U tablici 3 prikazani su rezultati utjecaja PEF tretmana na aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze, odnosno nastanak produkta *p*-nitrofenola. Uzorci koji nisu tretirani PEF-om su pokazali veću aktivnost mjerenu odmah nakon tretmana i nakon inkubacije na 25 °C kroz 30 minuta u usporedbi s uzorcima tretiranim PEF-om izuzev uzorka na 1 minutu-odmah nakon tretmana. Iz tablice se vidi da su uzorci tretirani 1 minutu pokazali veću aktivnost odmah nakon tretmana pri 2 kV/cm nego na 10 kV/cm, dok su na 2 i 5 minuta uzorci tretirani na 10 kV/cm imali veću aktivnost odmah nakon tretmana nego uzorci tretirani na 2 kV/cm. Nakon inkubacije na 25 °C kroz 30 minuta veću enzimsku aktivnost su imali uzorci tretirani na 10 kV/cm.

Rast aktivnosti enzima bez PEF tretmana tijekom vremena je očekivan i u skladu sa literaturnim podacima (Elshafei i sur., 2011), no iznenađujuća je manja aktivnost enzima tretiranih PEF-om u svim kombinacijama u usporedbi s netretiranim enzimima (odnosno kontrolnim uzorcima) jer po literaturi (Puértolas i de Mara $\tilde{n}$ on, 2015) aktivnost bi trebala biti veća. Uočen je i pad temperature uzoraka tijekom tretmana što ukazuje da je PEF tehnologija netermalna i da ne dovodi do dodatnog zagrijavanja.

**Tablica 4.** Utjecaj PEF tretmana na aktivnost enzima lipoksigenaze

Napon (kV/cm)	Frekvencija (Hz)	Vrijeme (minuta)	Temperatura (°C)	Koncentracija hidroperoksida $\mu\text{mol/mg}$ proteina nakon tretmana	Koncentracija hidroperoksida $\mu\text{mol/mg}$ proteina nakon inkubacije na 25 °C kroz 30 minuta
0	0	1	25,0	1,9	8,4
0	0	2	25,0	3,8	9,4
0	0	5	25,0	5,7	9,4
2	25	1	23,0	3,7	10,5
2	25	2	22,3	4,8	9,7
2	25	5	22,4	6,1	9,8
2	125	1	23,1	3,9	10,6
2	125	2	23,0	4,6	10,7
2	125	5	22,4	6,3	9,8
10	25	1	23,0	3,3	10,3
10	25	2	21,9	4,7	9,6
10	25	5	22,0	6,0	9,9
10	125	1	22,7	3,8	10,0
10	125	2	22,9	4,7	10,0
10	125	5	22,0	5,8	9,8

U tablici 4 prikazan je utjecaj PEF tretmana na aktivnost enzima lipoksigenaze, odnosno nastanak hidroperoksida enzimskom razgradnjom linolenske masne kiseline. Općenito gledano, rezultati aktivnosti enzima u uzorcima koji su podvrgnuti PEF tretmanom i u netretiranim uzorcima su približne vrijednosti (izuzev netretiranog uzorka na 1 minutu, mjenog odmah nakon tretiranja). Prema literaturnim podacima (Tamborrino i sur., 2019) PEF tretman bi trebao povećati aktivnost enzima lipoksigenaze, no u ovom slučaju do toga nije došlo te se aktivnost tretiranog i netretiranog enzima minimalno razlikuje. Mogući uzrok ovakvim rezultatima je da vremenski period od 30 minuta inkubacije predug i da je enzim u potpunosti zasićen supstratom, već bi se možda trebala

očitatavati aktivnost enzima pri manjim vremenskim razmacima s ciljem ukazivanja na razliku između tretiranog i netretiranog uzorka.

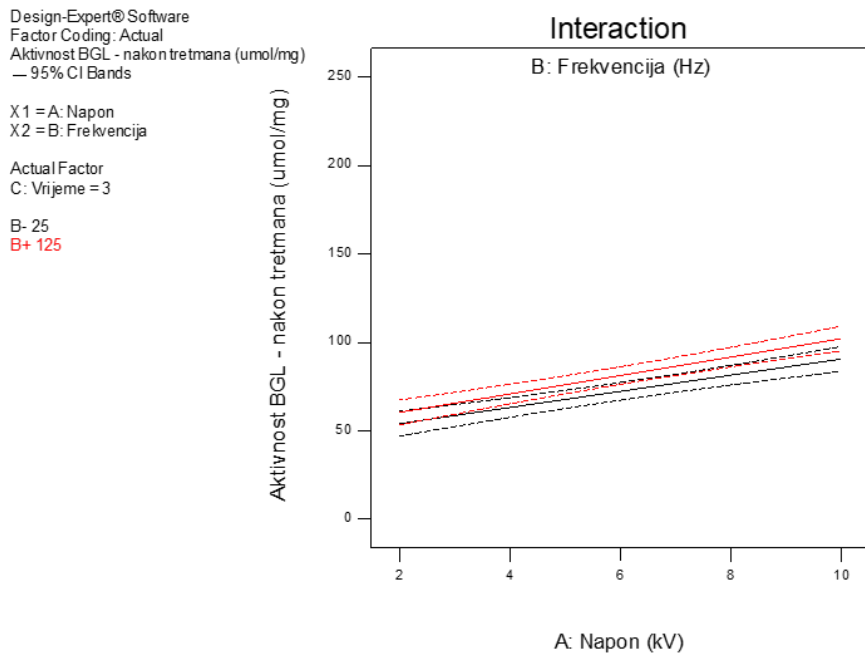
### 4.3. Optimizacija PEF tretmana

**Tablica 5.** Prikaz rezultata optimiranja PEF tretmana

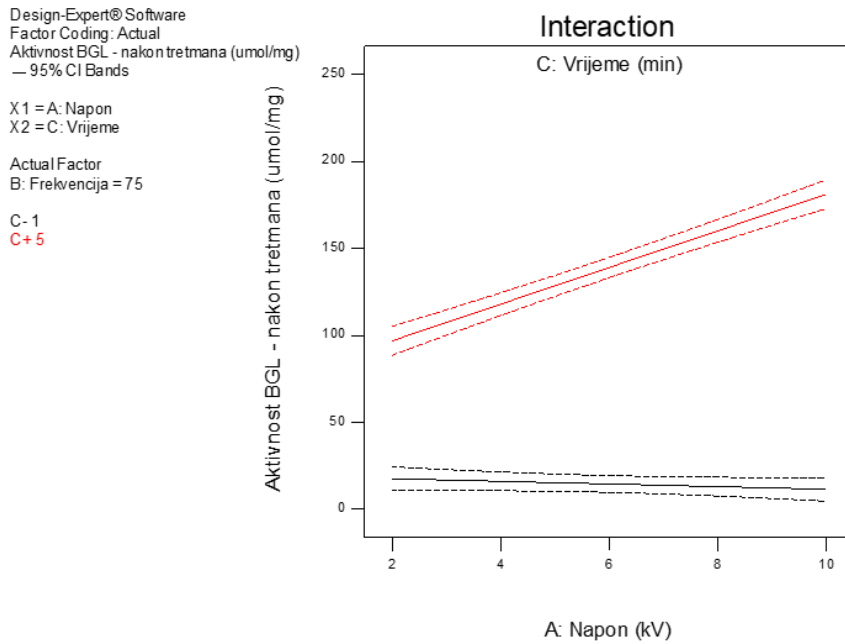
Enzimska aktivnost	Model	Koeficijent determinacije ( $R^2$ )	Vrijednost nedostatka modela (p-vrijednost)
$\beta$ -glukozidaza nakon tretmana	2FI model: Sekvencijalni zbroj kvadrata za članove dvofaktorske interakcije	0,9720	$1,49 \cdot 10^{-8}$
$\beta$ -glukozidaza nakon inkubacije na 25 °C kroz 30 minuta	Linearni model	0,9321	$2,48 \cdot 10^{-13}$
Lipoksigenaza nakon tretmana	Linearni model	0,9064	0,0011
Lipoksigenaza nakon inkubacije na 25 °C kroz 30 minuta	Linearni model	0,0559	0,1199

U tablici 5 su prikazani rezultati optimiranja PEF tretmana za enzime  $\beta$ -glukozidazu i lipoksigenazu te su iz iste vidljivi odabrani modeli, koeficijenti determinacije te vrijednosti nedostatka izabranog modela. Iz tablice je vidljivo da je  $R^2$  vrijednost niža za lipoksigenazu nakon inkubacije na 25 °C kroz 30 minuta u usporedbi sa ostalim tretmanima te je također za navedeni slučaj p-vrijednost viša od 0,1 (kod ostalih je manja od granične vrijednosti) što upućuje da taj slučaj nije značajan.

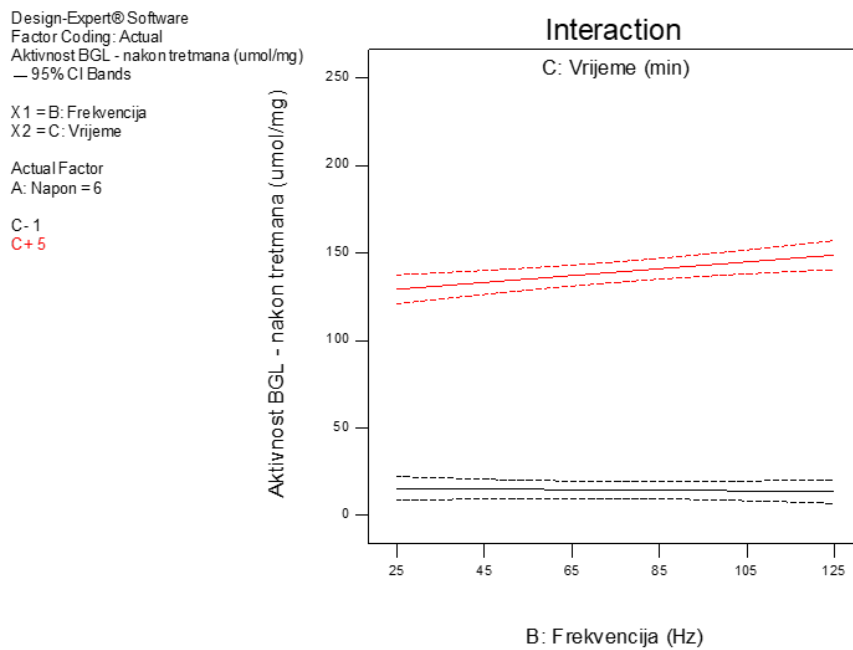
### 4.3.1. $\beta$ -glukozidaza



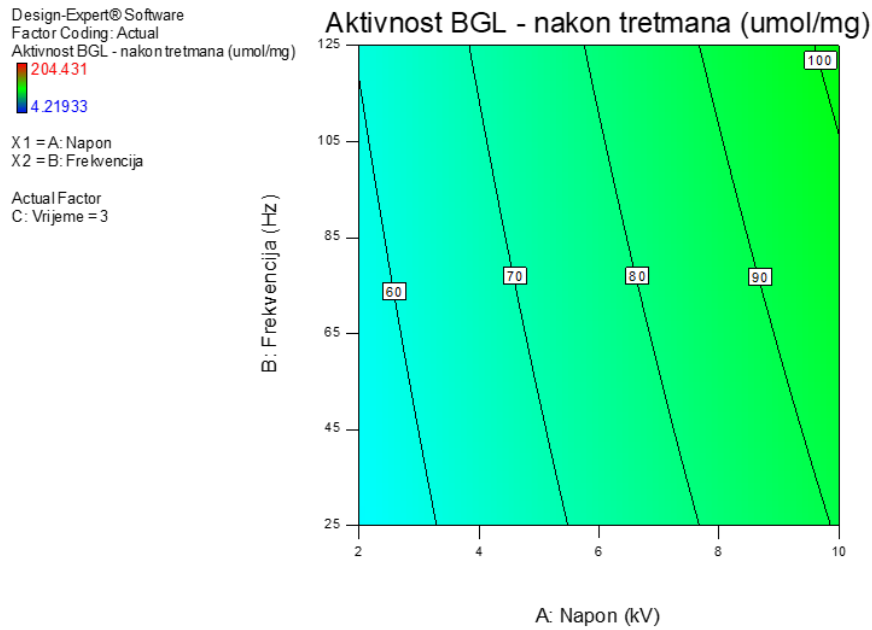
**Slika 7.** Utjecaj napona i frekvencije na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze (BGL) nakon tretmana



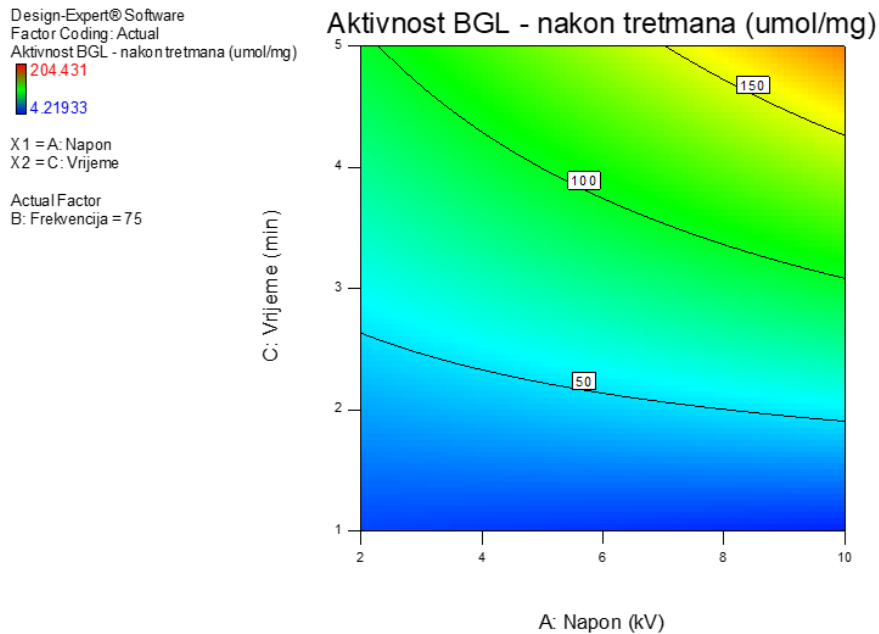
**Slika 8.** Utjecaj napona i vremena na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze (BGL) nakon tretmana



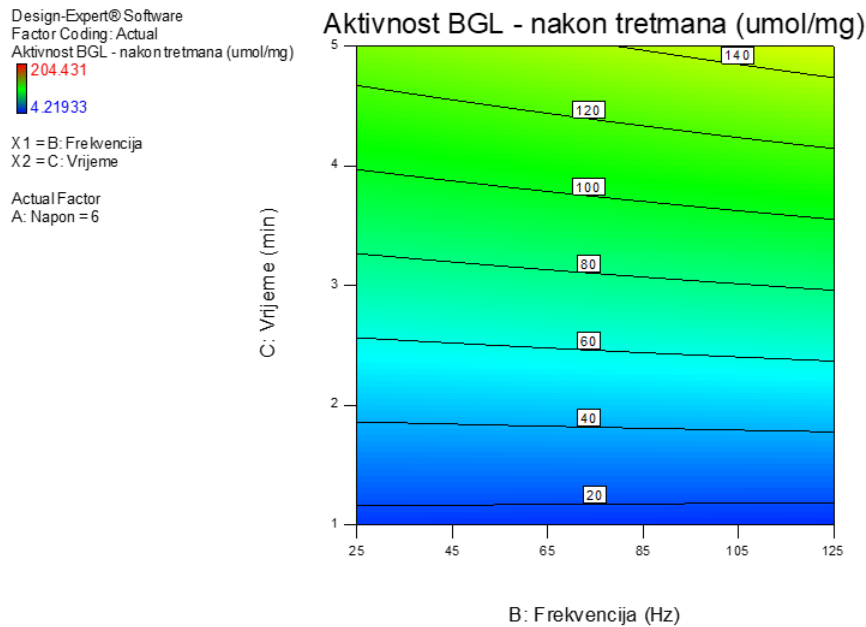
**Slika 9.** Utjecaj vremena i frekvencije na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze (BGL) nakon tretmana



**Slika 10.** Utjecaj napona i frekvencije na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze (BGL) nakon tretmana

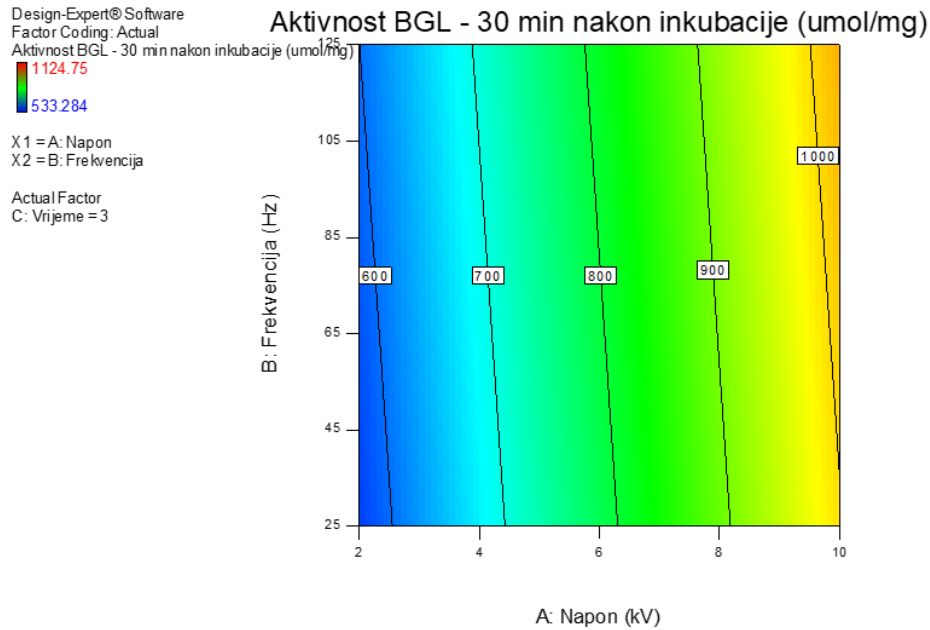


**Slika 11.** Utjecaj napona i vremena na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze nakon tretmana

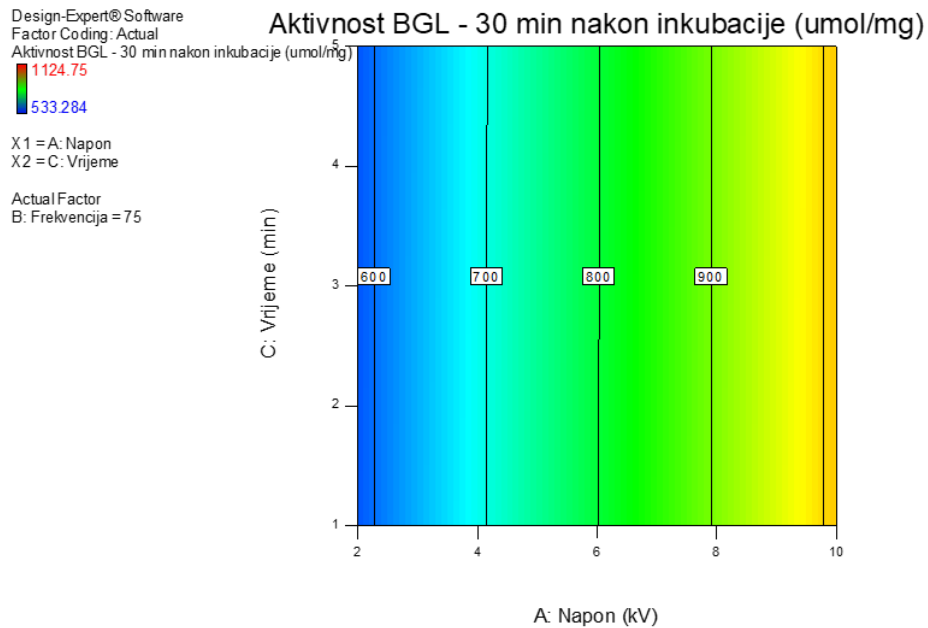


**Slika 12.** Utjecaj vremena i frekvencije na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze nakon tretmana

Na slikama 7-12 prikazani su utjecaji napona, vremena i frekvencije na enzimsku aktivnost  $\beta$ -glukozidaze odmah nakon PEF tretmana. Prema pripadajućem koeficijentu determinacije i vrijednosti nedostatka modela odabrani su najbolji regresijski modeli za svaku promatranu zavisnu varijablu. Iz provedene ANOVA analize se može zaključiti da najveći utjecaj na enzimsku aktivnost ima vrijeme ( $p$ -vrijednost= $1,06 \cdot 10^{-16}$ ), dok je također važan utjecaj primijenjenog napona ( $p$ -vrijednost= $1,43 \cdot 10^{-9}$ ) te interakcije vremena i napona ( $p$ -vrijednost= $1,43 \cdot 10^{-9}$ ). Frekvencija kao varijabla nema utjecaj na aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze ( $p$ -vrijednost je veća od 0,1). Iz dobivenih podataka je vidljivo da je vrijeme djelovanja napona ključan parametar za enzimsku aktivnost te bi se u daljnjim istraživanjima trebao staviti fokus upravo na vremenski period primijenjenog tretmana.

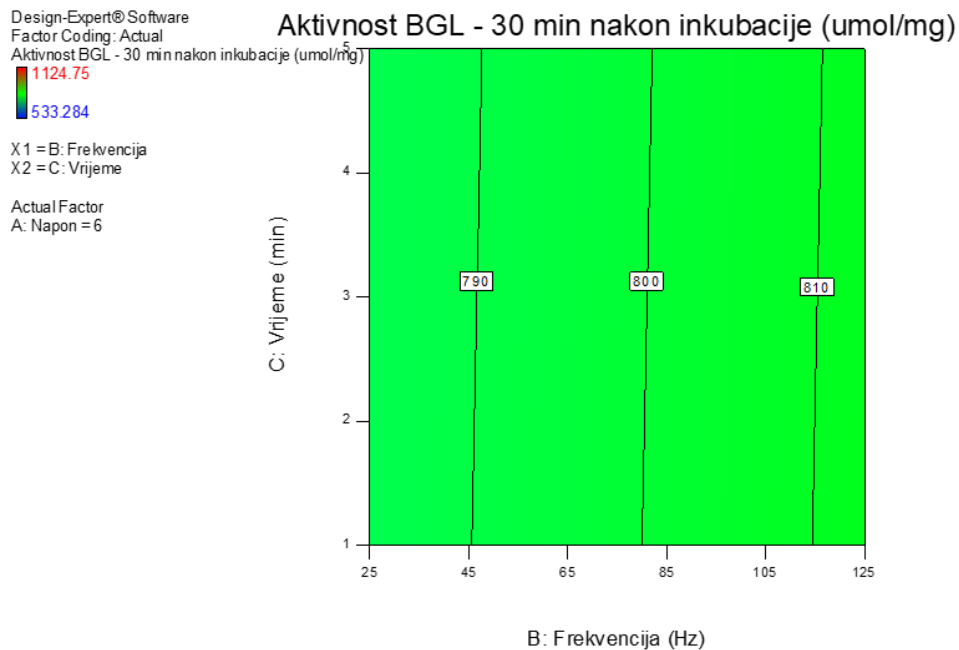


**Slika 13.** Utjecaj napona i frekvencije na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze (BGL) 30 minuta nakon inkubacije na 25 °C



**Slika 14.** Utjecaj napona i vremena na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze (BGL) 30 minuta nakon inkubacije na 25 °C

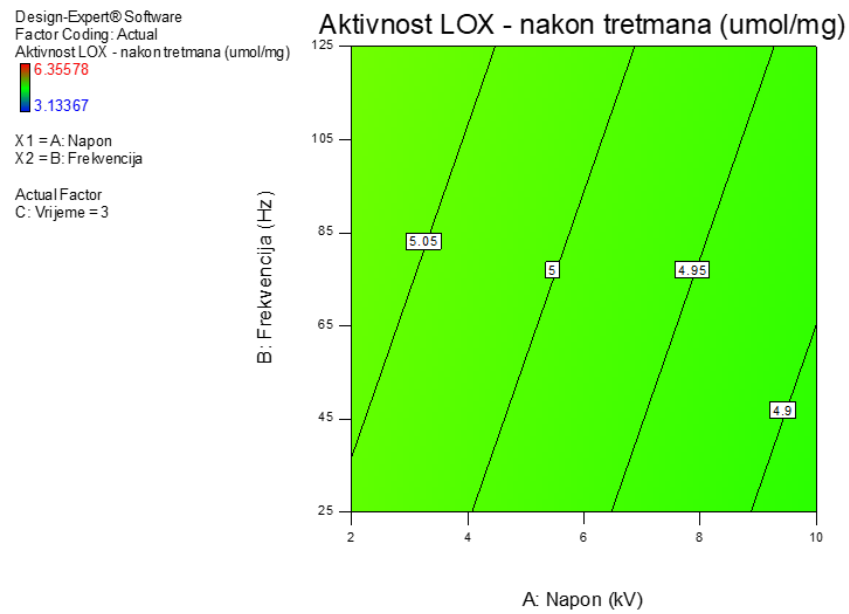




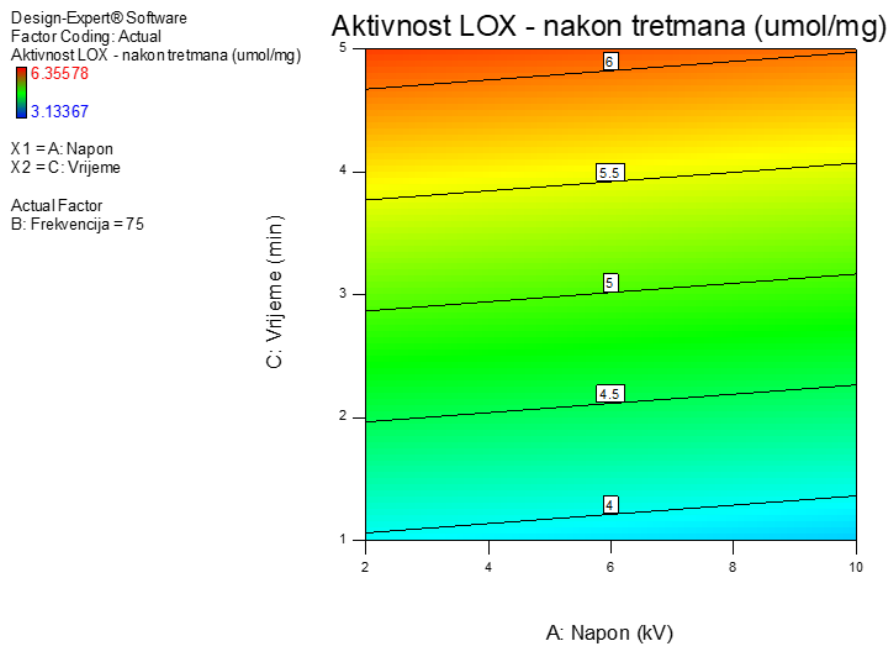
**Slika 15.** Utjecaj vremena i frekvencije na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze (BGL) 30 minuta nakon inkubacije na 25 °C

Na slikama 13-15 prikazani su linearni modeli utjecaja napona, vremena i frekvencije na aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze 30 minuta nakon inkubacije na 25 °C. Prema pripadajućem koeficijentu determinacije i vrijednosti nedostatka modela odabrani su najbolji regresijski modeli za svaku promatrano zavisnu varijablu. Iz provedene ANOVA analize se može zaključiti da najveći utjecaj na enzimsku aktivnost ima napon ( $p$ -vrijednost= $1,29 \cdot 10^{-14}$ ), dok vrijeme i frekvencija nemaju utjecaj na aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze ( $p$ -vrijednosti za obje varijable su veći od 0,1 te nisu značajni). Napon kao parametar je jedini ključan u ovom pokusu, no za daljnji tijek istraživanja valjalo bi modificirati plan pokusa i primjenjivati napone od 2 do 10 kV/cm, a ne samo 2 i samo 10 kV/cm kako bi se bolje ustvrdio utjecaj napona na enzimsku aktivnost.

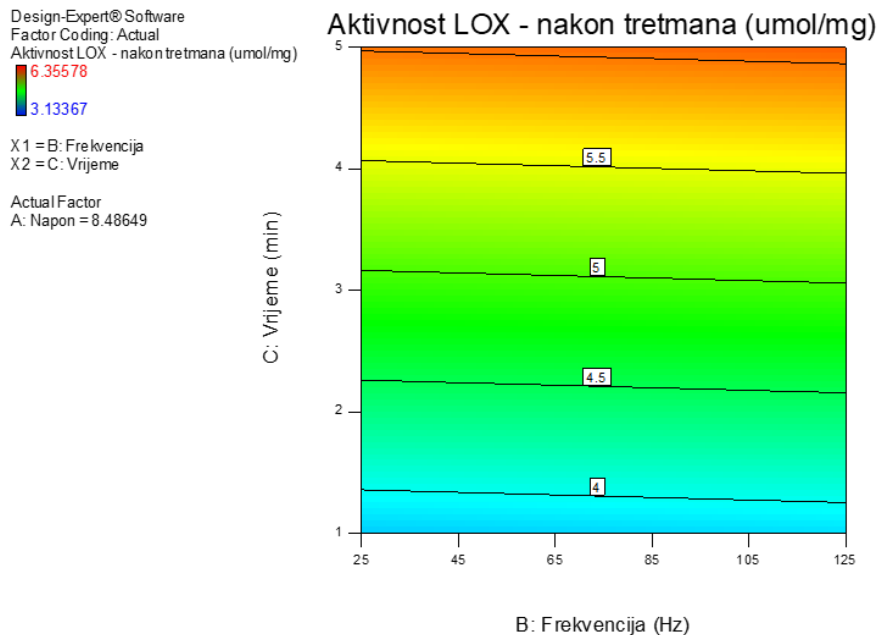
### 4.3.2. Lipoksigenaza



Slika 16. Utjecaj napona i frekvencija na aktivnost lipoksigenaze nakon tretmana

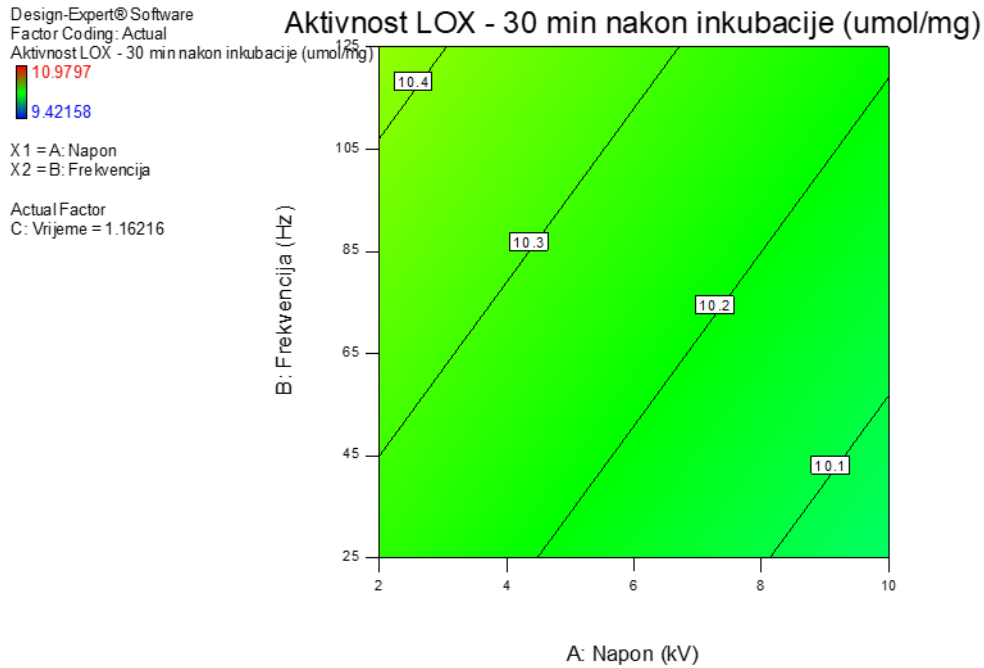


Slika 17. Utjecaj napona i vremena na aktivnost lipoksigenaze nakon tretmana

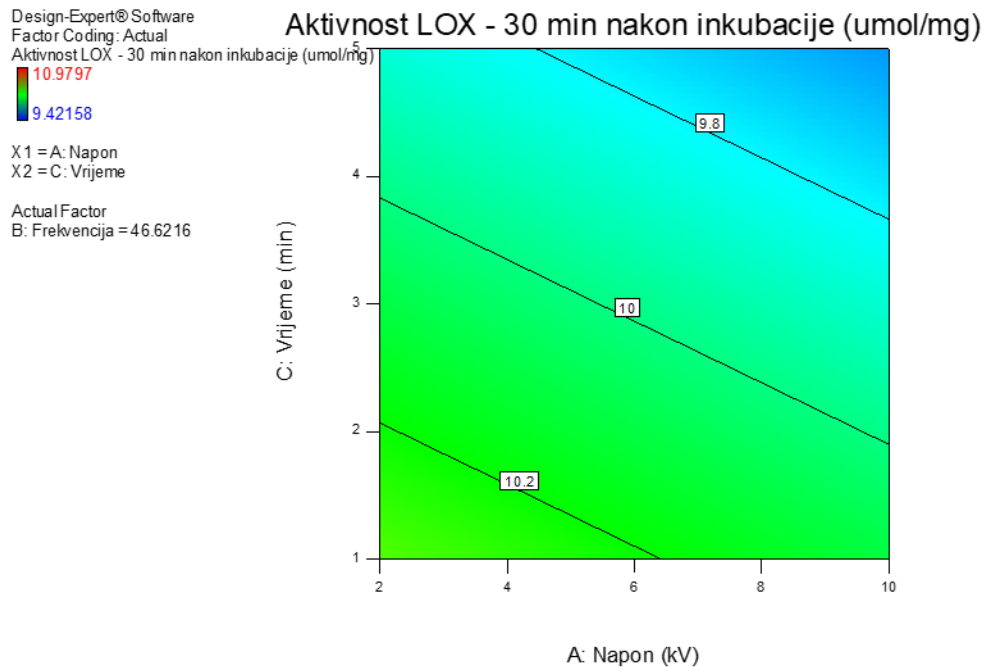


**Slika 18.** Utjecaj vremena i frekvencija na aktivnost lipoksigenaze nakon tretmana

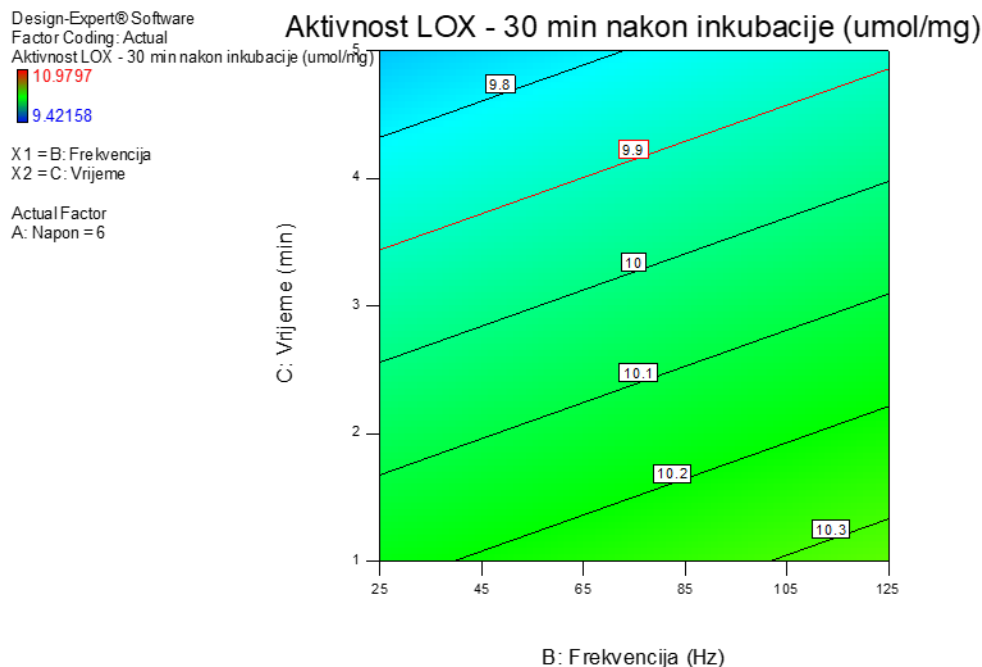
Na slikama 16-18 prikazani su linearni modeli utjecaja napona, vremena i frekvencije na aktivnost enzima lipoksigenaze odmah nakon PEF tretmana. Prema pripadajućem koeficijentu determinacije i vrijednosti nedostatka modela odabrani su najbolji regresijski modeli za svaku promatranu zavisnu varijablu. Iz provedene ANOVA analize se može zaključiti da najveći utjecaj na enzimsku aktivnost ima vrijeme ( $p$ -vrijednost  $< 0.0001$ ), dok napon i frekvencija nemaju utjecaj na aktivnost enzima lipoksigenaze ( $p$ -vrijednosti su veće od 0,1 te zbog toga nisu značajnog utjecaja). Vrijeme trajanja primijenjenog tretmana je ključno za enzimsku aktivnost lipoksigenaze te bi upravo korekcija vremenskog intervala tretiranja bila poželjna u boljem shvaćanju same enzimске kinetike odabranog enzima.



**Slika 19.** Utjecaj napona i frekvencija na aktivnost lipoksigenaze 30 minuta nakon inkubacije na 25 °C



**Slika 20.** Utjecaj napona i vremena na aktivnost lipoksigenaze 30 minuta nakon inkubacije na 25 °C



**Slika 21.** Utjecaj vremena i frekvencija na aktivnost lipoksigenaze 30 minuta nakon inkubacije na 25 °C

Na slikama 19-21 prikazani su linearni modeli utjecaja napona, vremena i frekvencije na enzimsku aktivnost lipoksigenaze nakon 30 minuta inkubacije na 25 °C. Prema pripadajućem koeficijentu determinacije i vrijednosti nedostatka modela odabrani su najbolji regresijski modeli za svaku promatranu zavisnu varijablu. Iz provedene ANOVA analize se može zaključiti da najveći utjecaj na enzimsku aktivnost ima vrijeme ( $p$ -vrijednost=0,0167), dok napon i frekvencija nemaju značajan utjecaj na aktivnost enzima lipoksigenaze ( $p$ -vrijednosti su veće od 0,1 te ne utječu na aktivnost enzima). Vrijeme je i u ovom eksperimentu ključan faktor, ali sa svojim negativnim učinkom. Mogući negativni utjecaj vremena je da je došlo do spontanog raspada nestabilnog produkta enzimске aktivnosti, hidroperoksida na alkoksilne i hidroksilne radikale. Jedan od potencijalnih razloga je i različita termostabilnost izoformi enzima lipoksigenaze izoliranih iz soje, kako navode autori (Kalua i sur., 2007), a koje se razlikuju u afinitetu za supstratom, idealnim pH uvjetima za enzimsku aktivnost ili pak u stereospecifičnosti.

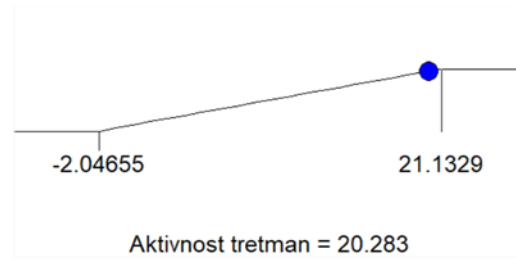
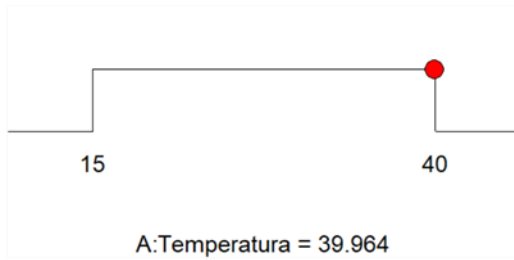
#### 4.4. Optimizacija UTT tretmana

Za analizu utjecaja UTT na aktivnost enzima postavljena je temperatura (°C) kao jedini nezavisni faktor.

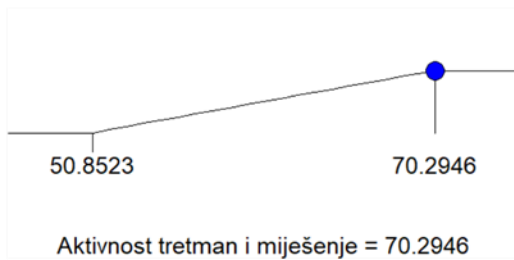
Za optimiranje utjecaja temperature UTT na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze nakon tretmana odabran je model drugog reda (kvadratni), a provedena ANOVA pokazala je značajan utjecaj temperature kao linearnog i kvadratnog faktora (A i A<sup>2</sup>). S druge strane, obzirom da su rezultati pokazali kompleksnu ovisnost o temperaturi, kao najbolji model za određivanje utjecaja na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze nakon tretmana i miješenja odabran je model petog reda za koji je također utvrđen značajan utjecaj temperature.

Provedena analiza funkcije poželjnosti pokazala je na slici 22 da optimalna temperatura UTT obzirom na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze iznosi 39,96 °C uz razinu poželjnosti 0,981 pri čemu odabrani modeli predviđaju aktivnost  $\beta$ -glukozidaze od 20,28  $\mu$ mol/mg proteina nakon tretmana te 70,29  $\mu$ mol/mg proteina nakon tretmana i miješenja.

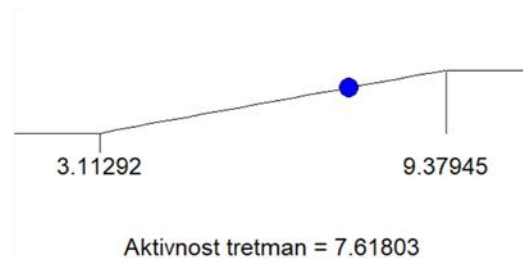
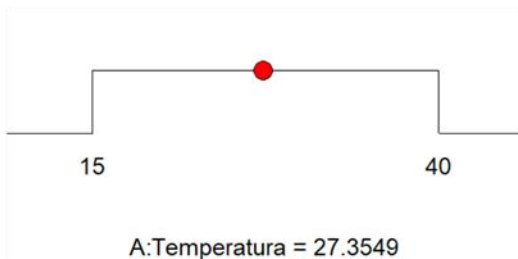
U slučaju lipoksigenaze ovisnost aktivnosti o temperaturi UTT nakon tretmana opisana je na slici 23 modelom četvrtog reda, dok je nakon miješenja kao najbolji odabran kvadratni model. Provedena ANOVA je za oba modela pokazala značajan utjecaj temperature kao kvadratnog faktora (A<sup>2</sup>) na aktivnost lipoksigenaze.



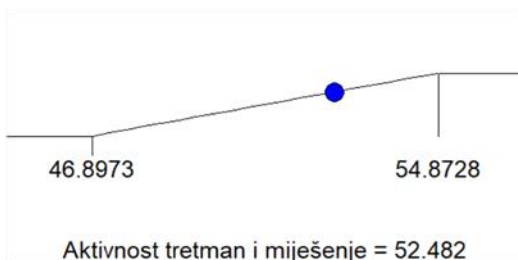
Desirability = 0.981



**Slika 22.** Utjecaj UTT temperature na aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze



Desirability = 0.710



**Slika 23.** Utjecaj UTT temperature na aktivnost enzima lipoksigenaze

#### 4.5. Optimizacija UZV tretmana

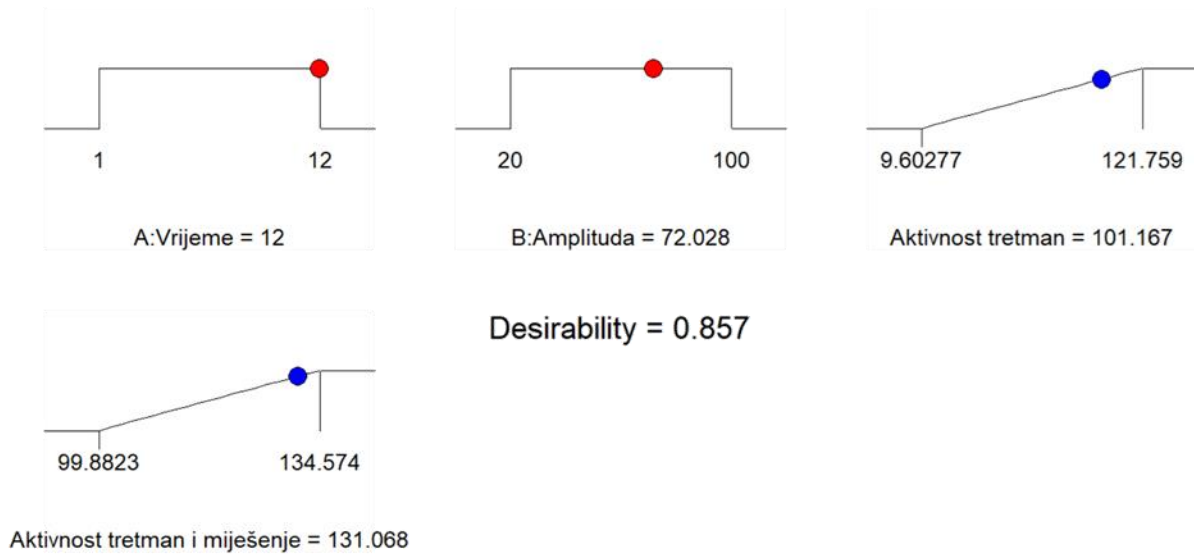
Za analizu utjecaja UZV na aktivnost enzima postavljen je faktorijalni dizajn s dva nezavisna faktora i to vrijeme tretmana (min) i amplituda (%).

Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze nakon tretmana UZV značajno ovisi o vremenu primjene kao i o primijenjenoj amplitudi te njihovoj interakciji (A, B, AB,  $A^2$ ). Za modeliranje ovog odnosa odabran je kvadratni model, a najbolji model za procjenu aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze nakon tretmana UZV i 30 minuta miješenja u ovisnosti o vremenu i amplitudi također je bio kvadratni. Značajan utjecaj na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze nakon tretmana i miješenja imali su vrijeme i amplituda (A, B,  $A^2$ ,  $B^2$ ).

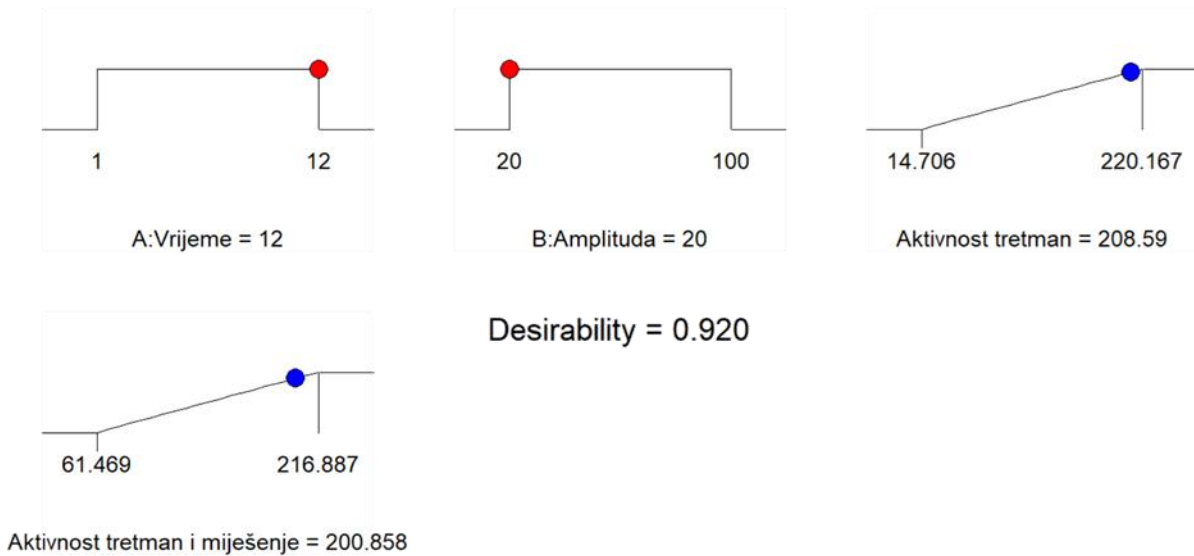
Optimizacija parametara primjene UZV analizom funkcije poželjnosti prikazanoj na slici 24 pokazala je da se maksimalne vrijednosti za aktivnost  $\beta$ -glukozidaze mogu dobiti tretmanom u trajanju od 12 min i pri amplitudi 72,03 %. Aktivnost nakon tretmana pri tim uvjetima iznosila bi 101,17  $\mu\text{mol/mg}$  proteina te 131,07  $\mu\text{mol/mg}$  nakon dodatnih 30 min miješenja.

Iz rezultata ANOVA-e odabranog kvadratnog modela koji opisuje ispitivani utjecaj primjene UZV na aktivnost lipoksigenaze vidljivo je na slici 25 da su vrijeme i amplituda (A, B,  $B^2$ ) imali značajan utjecaj na rezultate. Sličan odnos, također opisan kvadratnim modelom, vidljiv je i u slučaju aktivnosti nakon tretmana UZV i 30 minuta miješenja pri temperaturi 25 °C. Međutim, prema ovom modelu, značajan utjecaj na rezultate ima vrijeme tretmana (B,  $B^2$ ) dok isto za amplitudu nije utvrđeno.





**Slika 24.** Optimizacija parametara tretmana UZV na aktivnost  $\beta$ -glukozidaze



**Slika 25.** Optimizacija parametara tretmana UZV na aktivnost lipoksigenaze

#### 4.6. Određivanje aktivnosti enzima i njihovih produkata HPLC metodama

Modelne otopine enzima  $\beta$ -glukozidaze i lipoksigenaze te njihovih supstrata, oleuropeina i linolenske masne kiseline, tretirane su prema optimalnim parametrima dobivenim statističkom obradom podataka aktivnosti izmjerenih spektrofotometrijskim metodama.

**Tablica 6.** Površine ispod pika pri optimalnim uvjetima pojedinih tretmana određene HPLC metodom uz oleuropein kao supstrat za  $\beta$ -glukozidazu

Tretman	Parametri tretmana	Površina ispod pika (hidroliziranog oleuropeina) na 34,2 minuti	Površina ispod pika (hidroliziranog oleuropeina) na 37,6 minuti
BEZ TRETMANA	1' na 25 °C	7802,4	548,3
BEZ TRETMANA + 30' MIJEŠENJA	1' na 25 °C + 30' na 25 °C	7647,3	558,2
UTT	1' na 40 °C	7089,9	500,9
UTT + 30' MIJEŠENJA	1' na 40 °C + 30' na 25 °C	6123,7	534,8
UZV	12'; 70 % snage	7004,3	560,0
UZV + 30' MIJEŠENJA	12'; 70 % snage + 30' na 25 °C	6364,8	490,9
PEF	5'; 125 Hz, 2 kV	7658,2	535,9
PEF + 30' MIJEŠENJA	5'; 125 Hz, 2 kV + 30' na 25 °C	7131,4	525,5

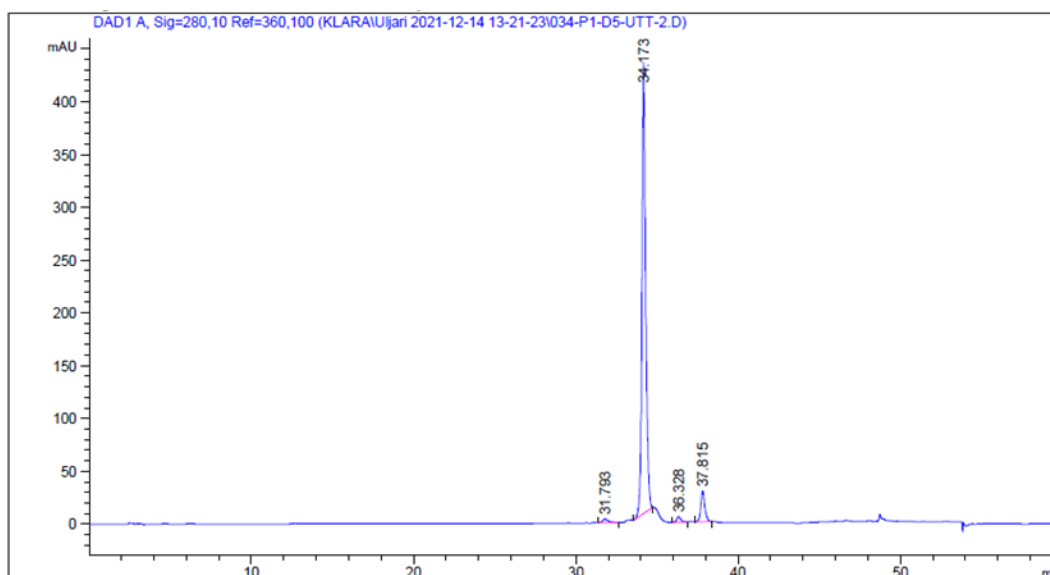
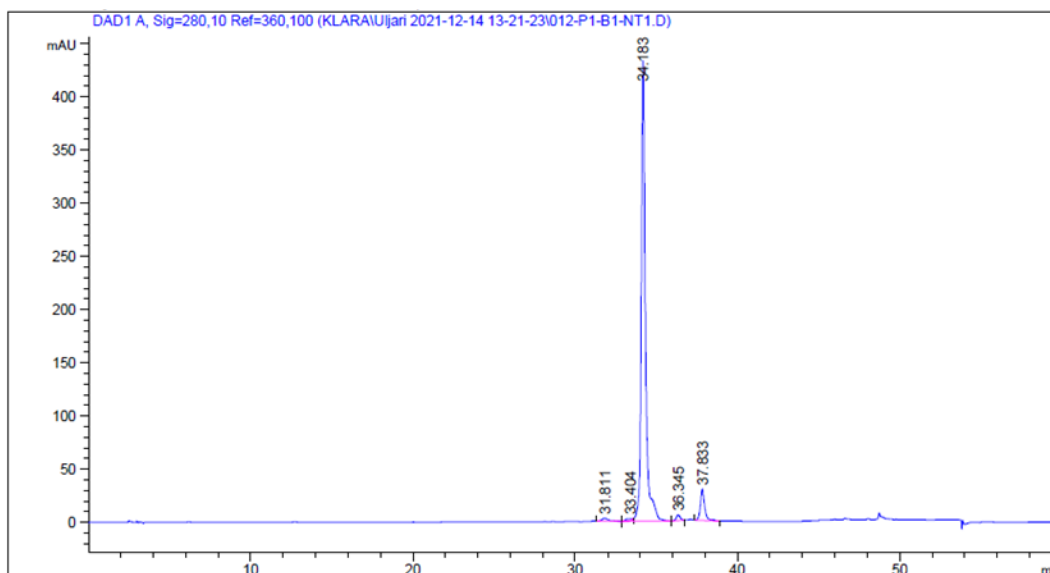
Iz tablice 6 se vide vrijednosti površina ispod pika s oleuropeinom kao supstratom u korelaciji s izmjerenim aktivnostima kada se kao supstrat koristio p-nitrofenilglukopiranozid (p-NPG). Najveća aktivnost izmjerena je kada se kao tretman, odnosno predtretman miješenju, koristi PEF.

Za navedene rezultate napravljena je jednosmjerna analiza varijance („one way ANOVA“) za nezavisne uzorke te se statistički značajno razlikuju ( $p$ -vrijednost= $3,43 \cdot 10^{-14}$ ) i utvrđena razlika ne smatra se slučajnom. Zanimljiva je usporedba određivanja enzimske aktivnosti HPLC i spektrofotometrijskom metodom, gdje je HPLC metodom dokazana efikasnost PEF tretmana koja se ne vidi tijekom spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti enzima. Tretmani UZV-om i UTT-om provedeni po optimalnim parametrima daju vrlo slične rezultate, dok je najmanja aktivnost zabilježena kod simulacije procesa miješenja bez ikakvog predtretmana. Dobiveni rezultati analize u skladu su sa literaturnim navodima (Puértolas i de Maraňón, 2015) gdje je primjena PEF tretmana uzrokovala značajan rast fenolnih spojeva u usporedbi sa kontrolnim uzorkom. Clodoveo i sur. (2013) ukazuju da primjena UZV dovodi do veće koncentracije fenolnih spojeva u usporedbi sa kontrolnim netretiranim uzorkom, kao i Jolayemi i sur. (2016) za primjenu UTT tretmana.

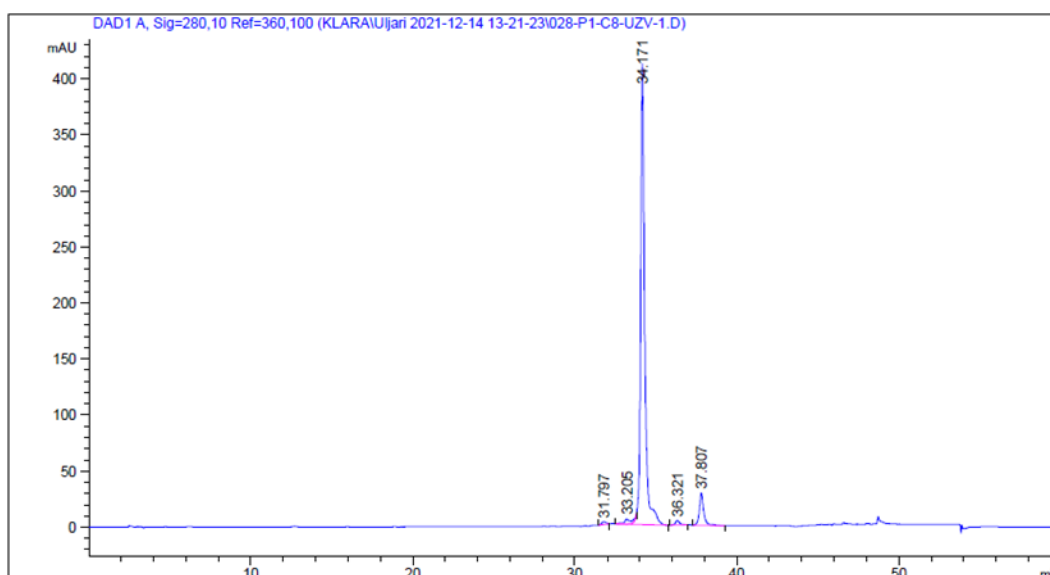
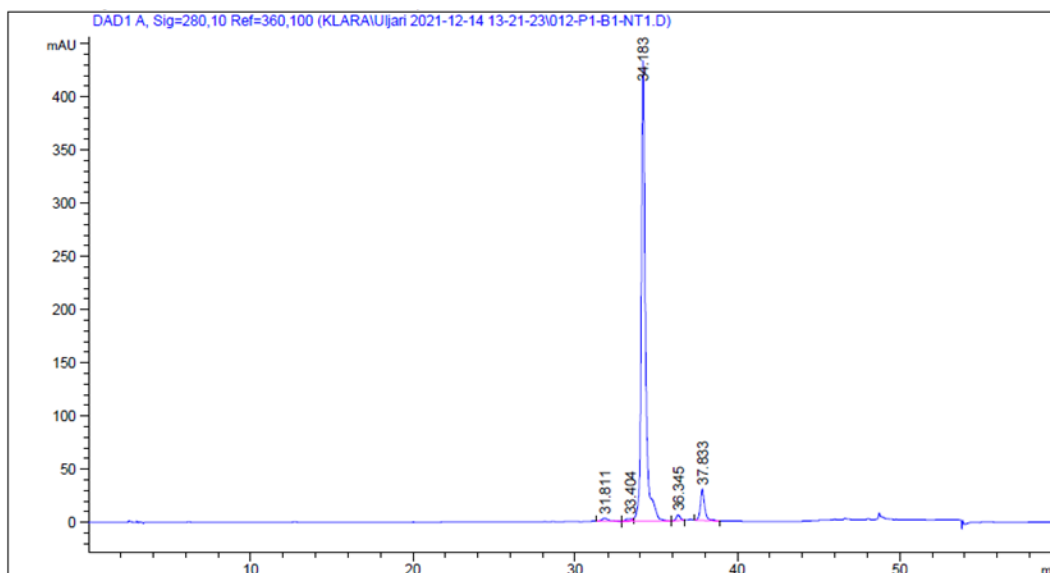
Na slikama 26-31 prikazane su usporedbe kromatograma fenolnih spojeva detektiranih nakon provedenih tretmana. Na svim kromatogramima može se uočiti dominantni fenolni spoj koji ima retencijsko vrijeme 34,2 minute. Taj spoj je nakon usporedbe s retencijskim vremenom ( $R_t$ ) i UV spektrom standarda oleuropeina, detektiran kao oleuropein. Osim toga na svim je kromatogramima zabilježen u značajnim koncentracijama i spoj s retencijskim vremenom od 37,6 minuta. Taj spoj ima isti UV spektar kao i oleuropein, a kako izlazi nešto kasnije na kromatogramu, vrlo vjerojatno se radi o nekom manje polarnom derivatu oleuropeina, vjerojatno o aglikonu oleuropeina.

Iz kromatograma je također vidljivo kako nema pojavljivanja drugih neidentificiranih spojeva u uzorcima koji su tretirani UTT, UZV-om ili PEF-om, što ukazuje na veliku vjerojatnost da primjena inovativnih tehnika pri odabranim parametrima ne djeluje direktno na fenolne spojeve već na aktivaciju samog enzima.

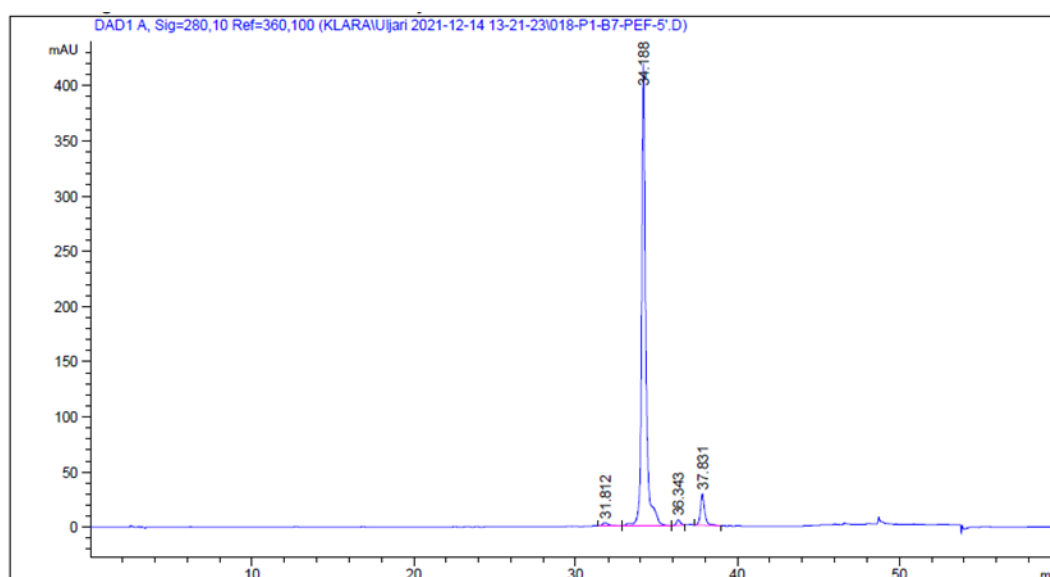
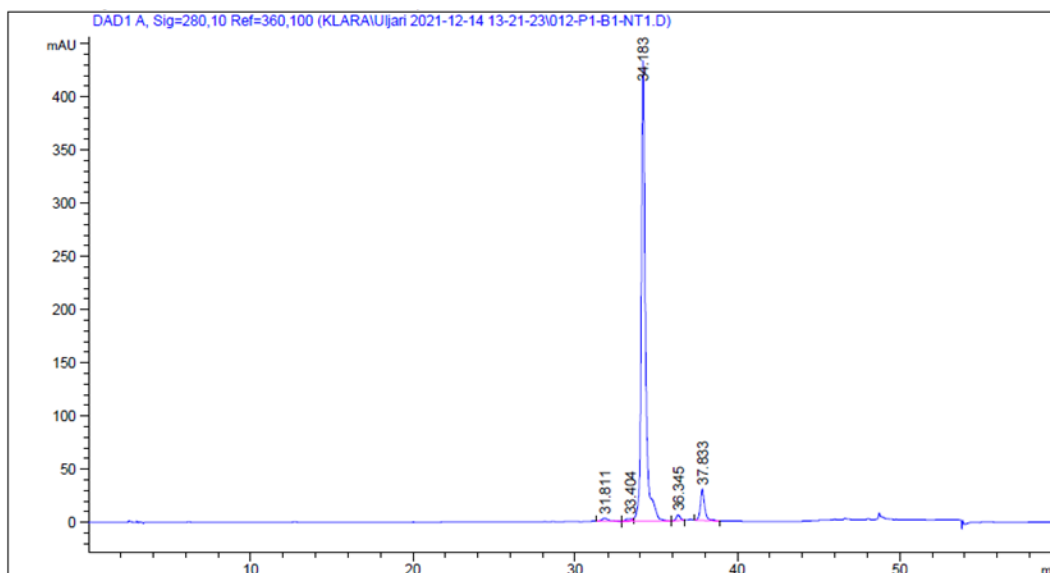
Iako su provedene sve HPLC analize praćenja aktivnosti lipoksigenaze nakon svih tretmana po optimalnim uvjetima, zbog kašnjenja u isporuci internog standarda butil hidroksitoluena, nije bilo moguće kvantificirati nastale hidroperoksidge tijekom izrade ovog rada te rezultati nisu prikazani brojčano. Osim toga, bez upotrebe internog standarda nije moguće pratiti efikasnost ekstrakcije hidroperoksidge pa sami rezultati nisu pouzdani. Stoga su na slikama 32-37 prikazane se usporedbe kromatograma hidroperoksidge detektiranih nakon provedenih tretmana.



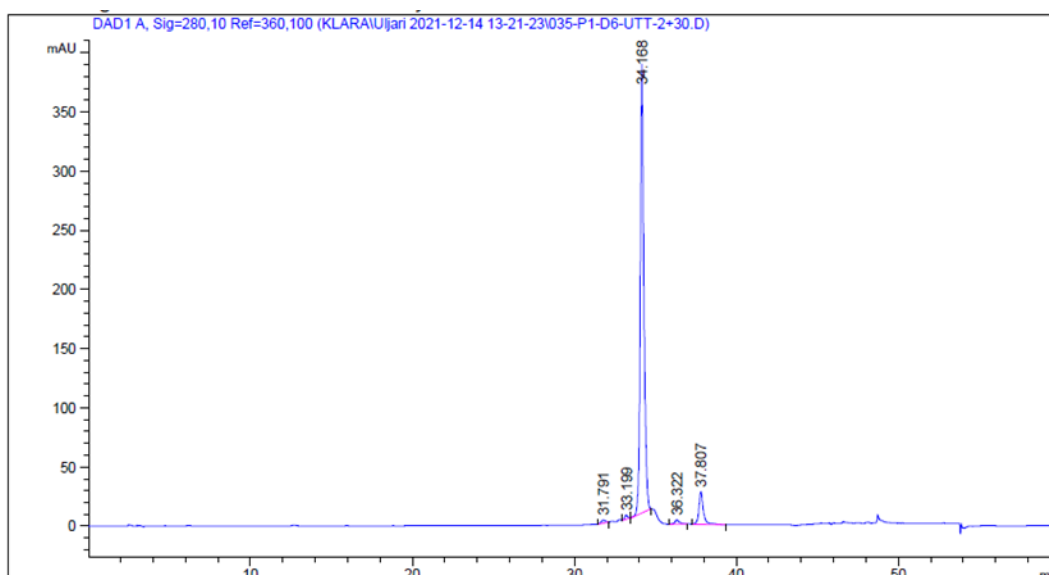
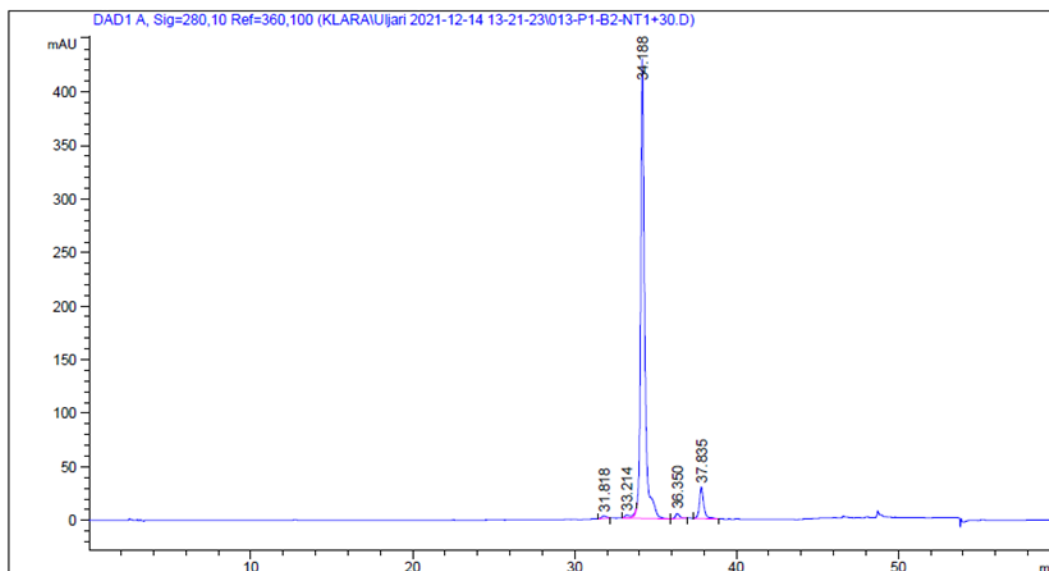
**Slika 26.** Usporedba kromatograma fenolnih spojeva u modelnoj otopini bez tretmana i modelnoj otopini podvrgnutoj UTT tretmanu



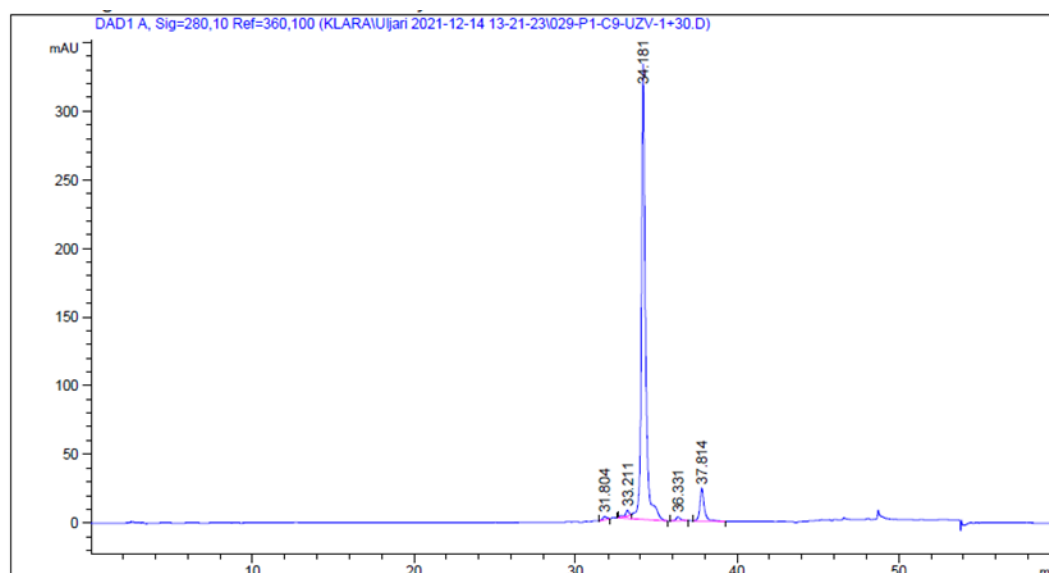
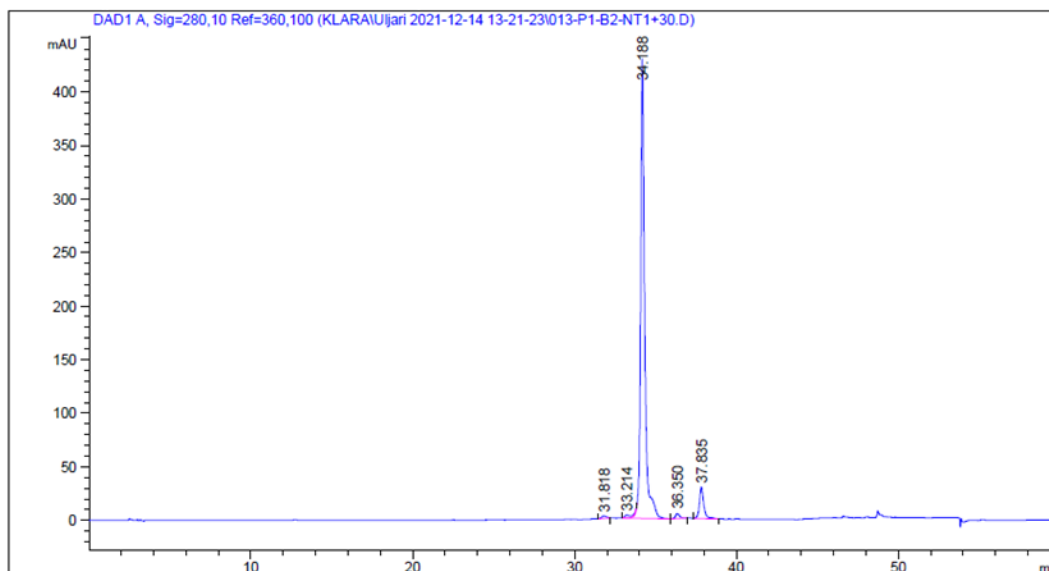
**Slika 27.** Usporedba kromatograma fenolnih spojeva u modelnoj otopini bez tretmana i modelnoj otopini podvrgnutoj UZV tretmanu



**Slika 28.** Usporedba kromatograma fenolnih spojeva u modelnoj otopini bez tretmana i modelnoj otopini podvrgnutoj PEF tretmanu

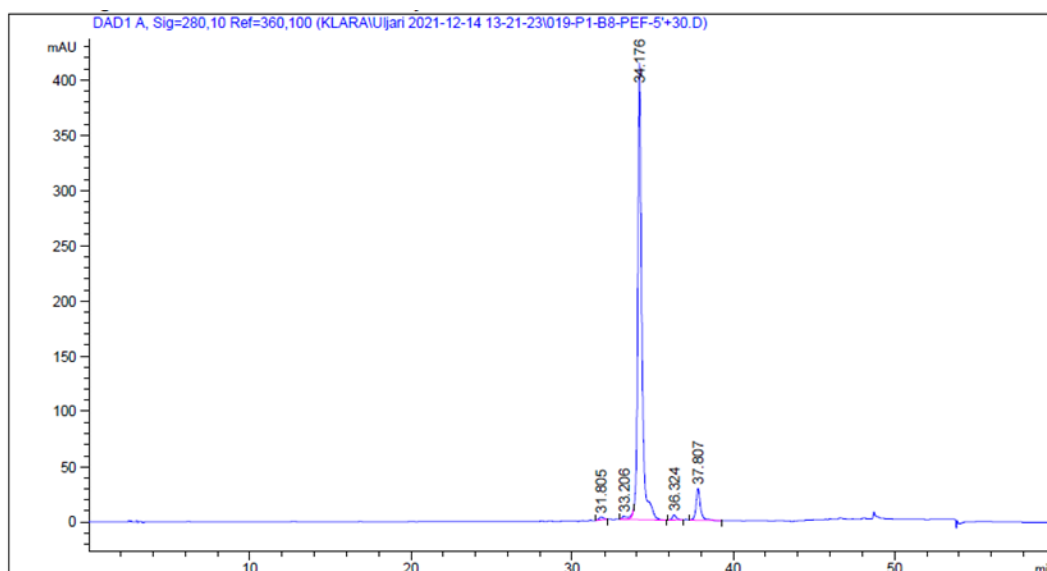
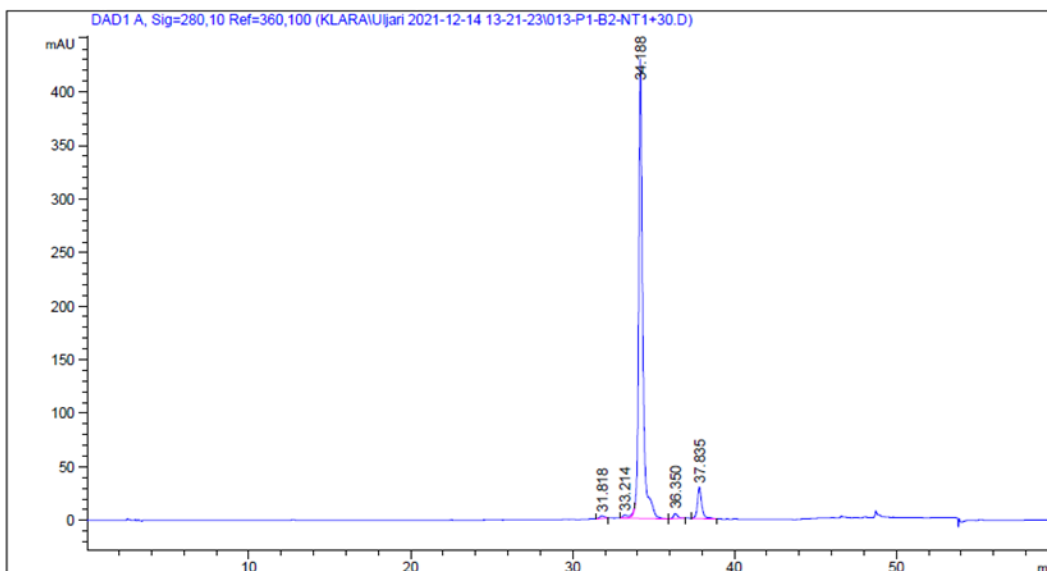


**Slika 29.** Usporedba kromatograma fenolnih spojeva u modelnoj otopini bez tretmana te temperiranoj 30 minuta na 25 °C i modelnoj otopini podvrgnutom UTT tretmanom te temperiranoj 30 minuta na 25 °C

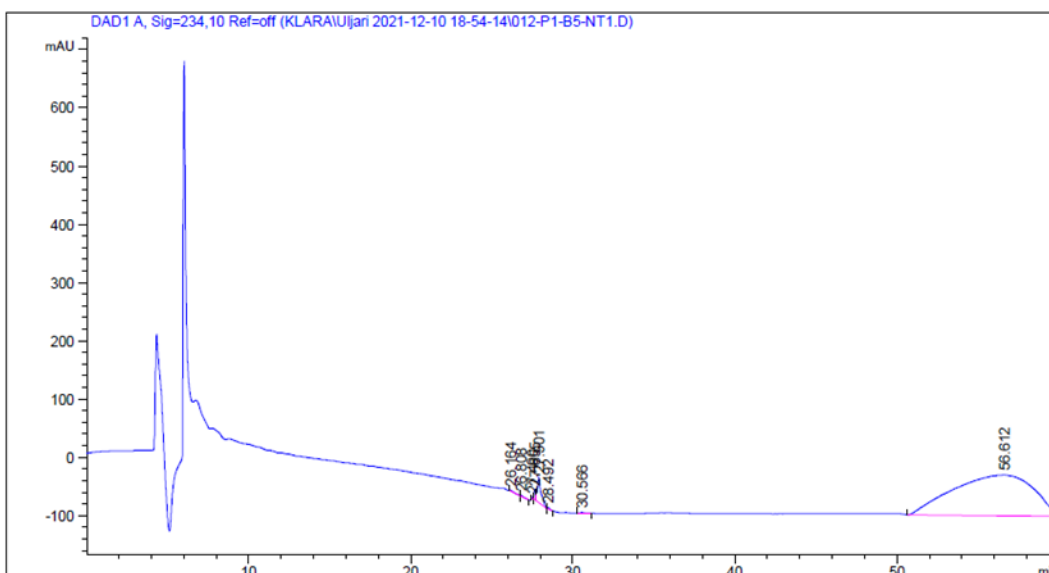
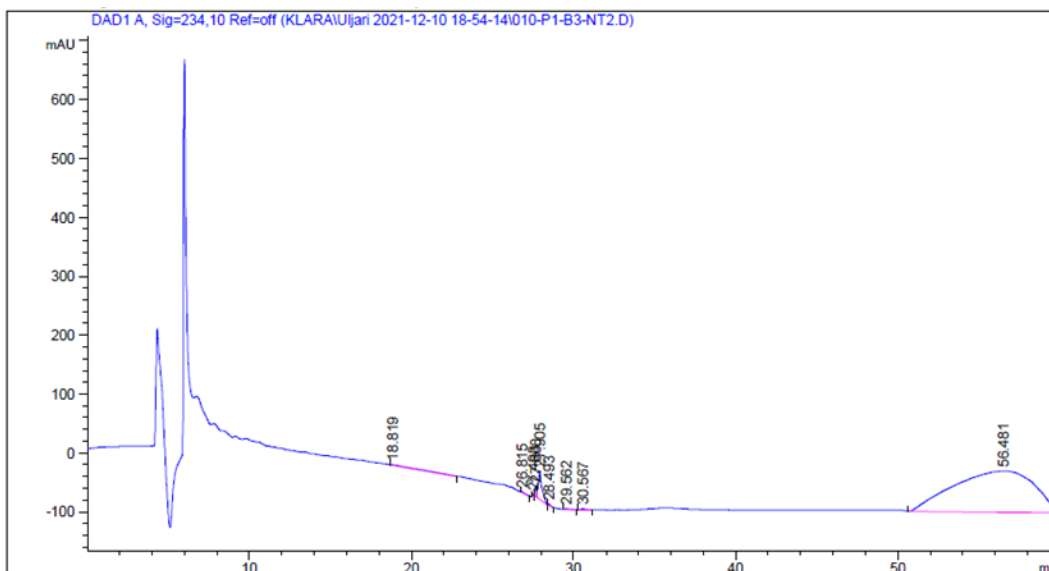


**Slika 30.** Usporedba kromatograma fenolnih spojeva u modelnoj otopini bez tretmana te temperiranoj 30 minuta na 25 °C i modelnoj otopini podvrgnutom UZV tretmanom te temperiranoj 30 minuta na 25 °C

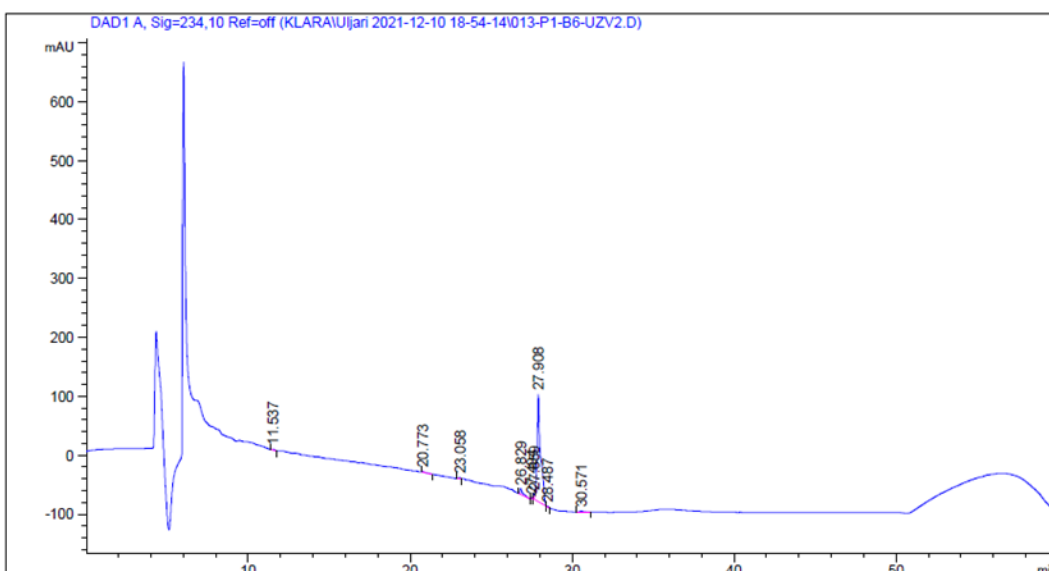
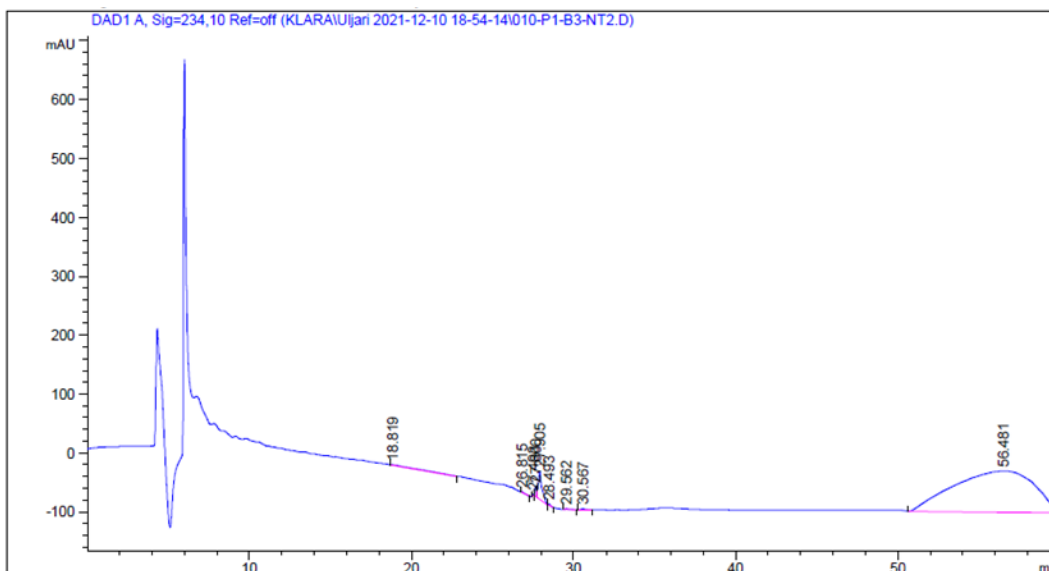




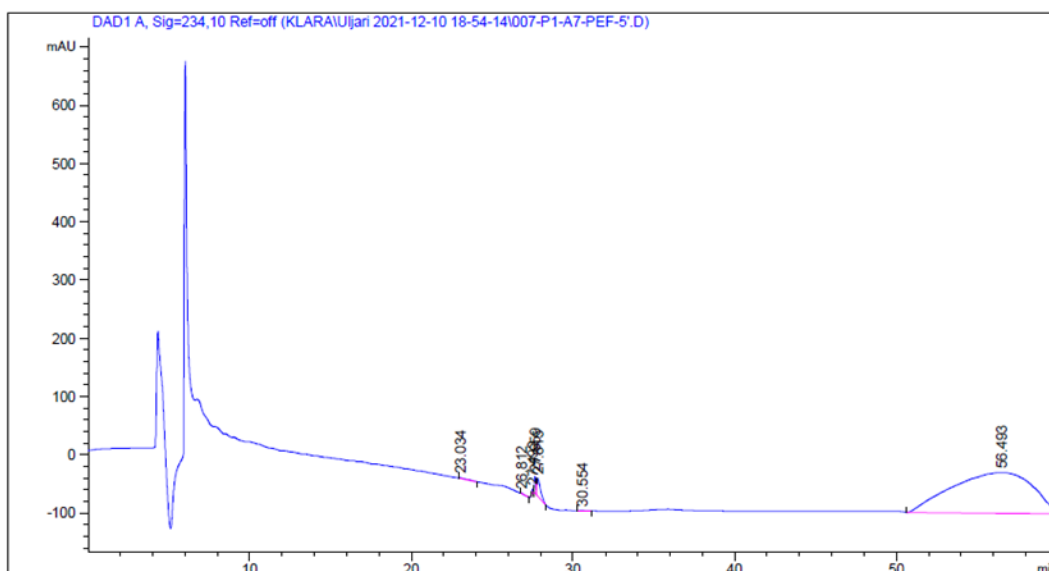
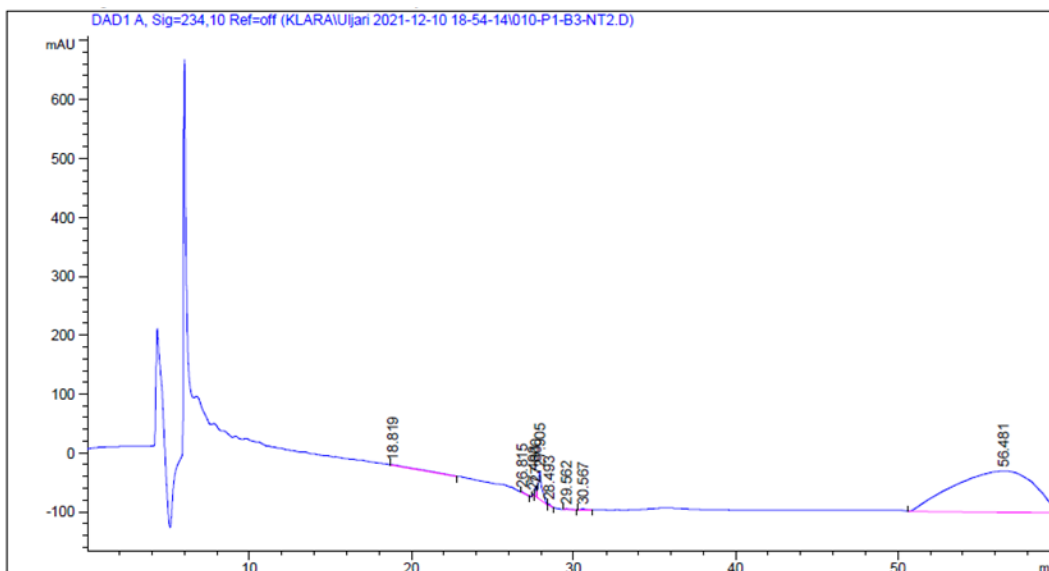
**Slika 31.** Usporedba kromatograma fenolnih spojeva u modelnoj otopini bez tretmana te temperiranoj 30 minuta na 25 °C i modelnoj otopini podvrgnutom PEF tretmanom te temperiranoj 30 minuta na 25 °C



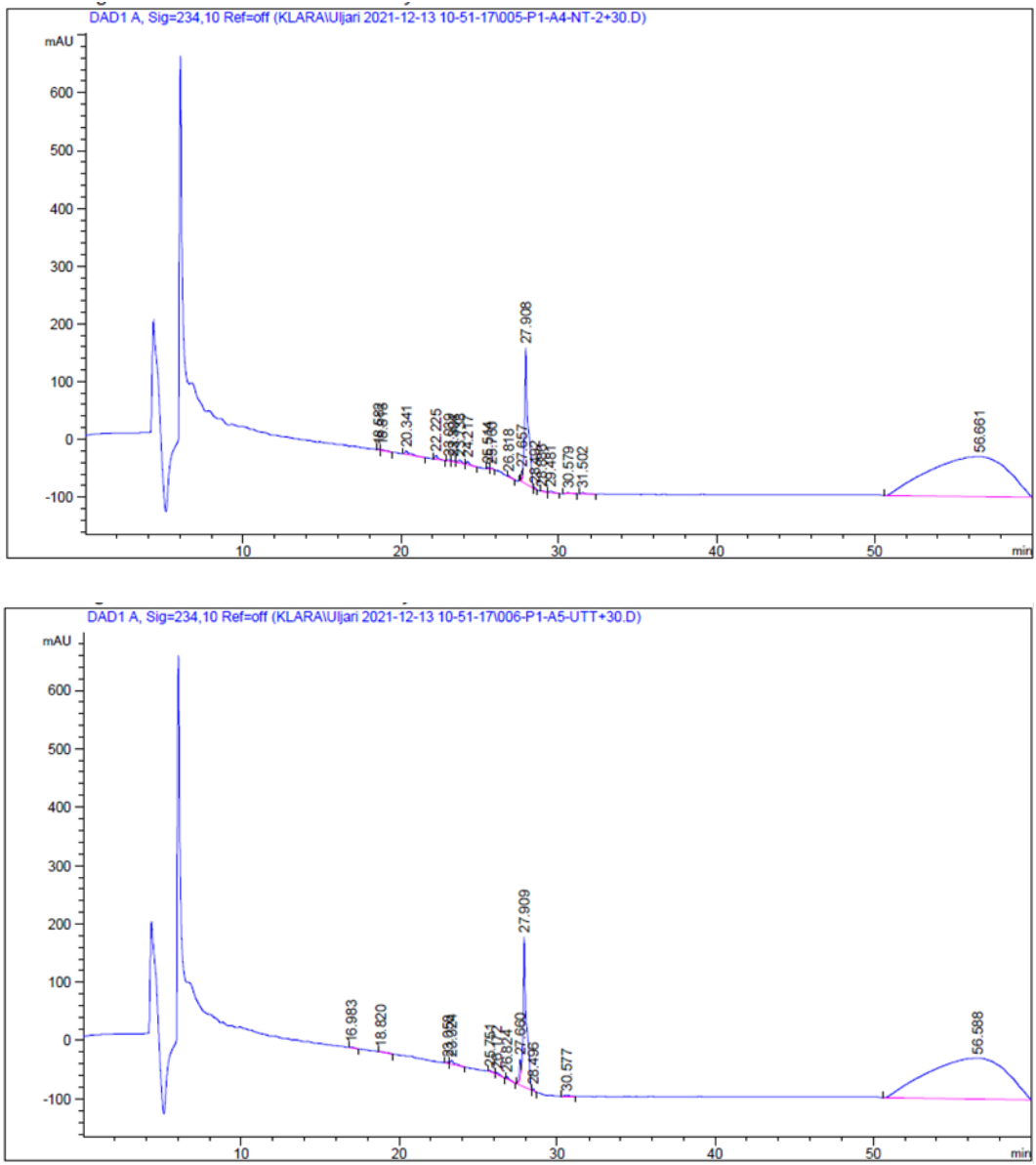
**Slika 32.** Usporedba kromatograma hidroperoksida u modelnoj otopini bez tretmana nakon temperiranja 1 minute na 25 °C i modelnoj otopini podvgrnutoj UTT tretmanu (1 minuta na 27.4 °C)



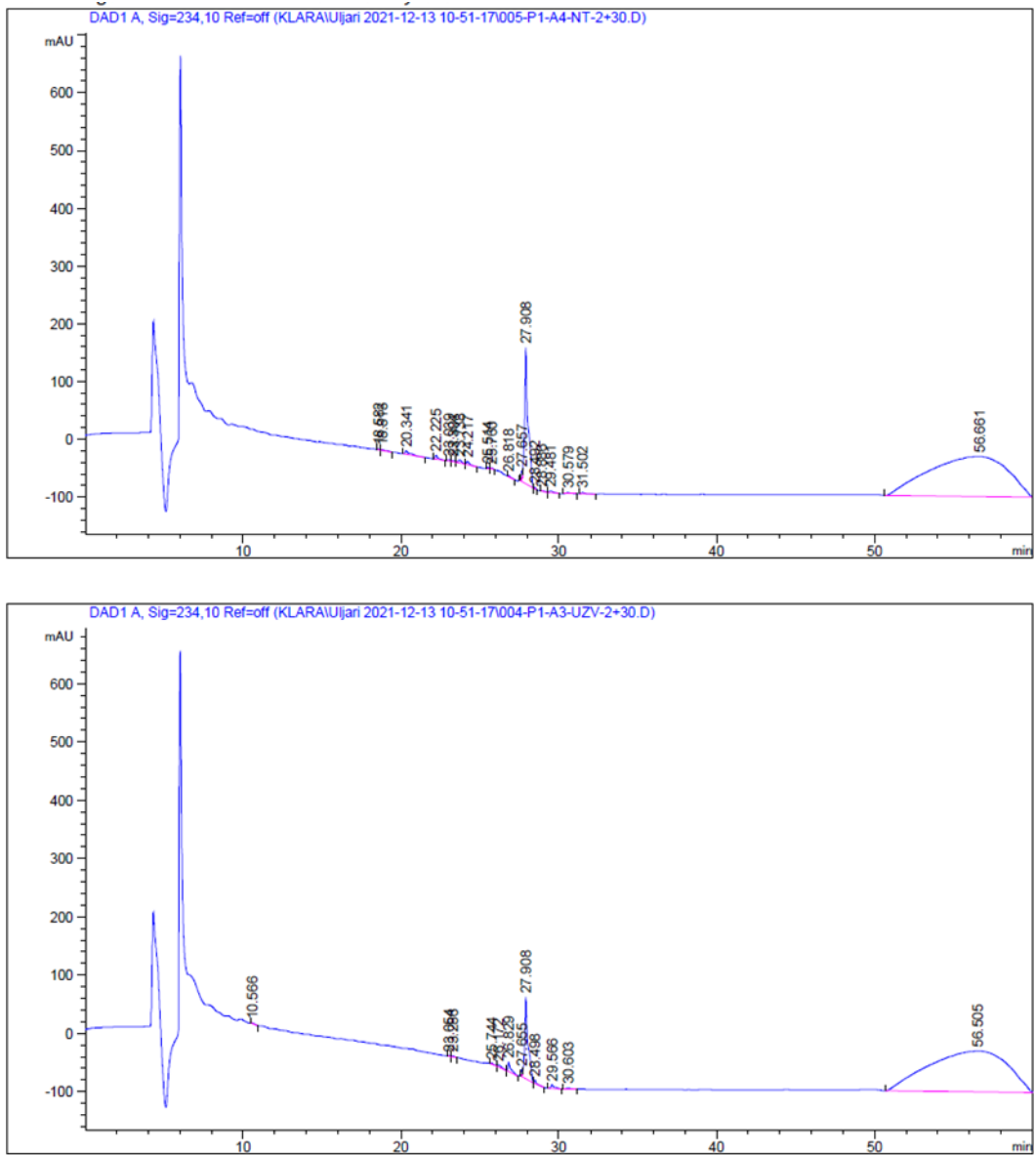
**Slika 33.** Usporedba kromatograma hidroperoksida u modelnoj otopini bez tretmana nakon temperiranja 1 minute na 25 °C i modelnoj otopini podvgrnutoj UZV tretmanu (12 minuta, snaga 20 %)



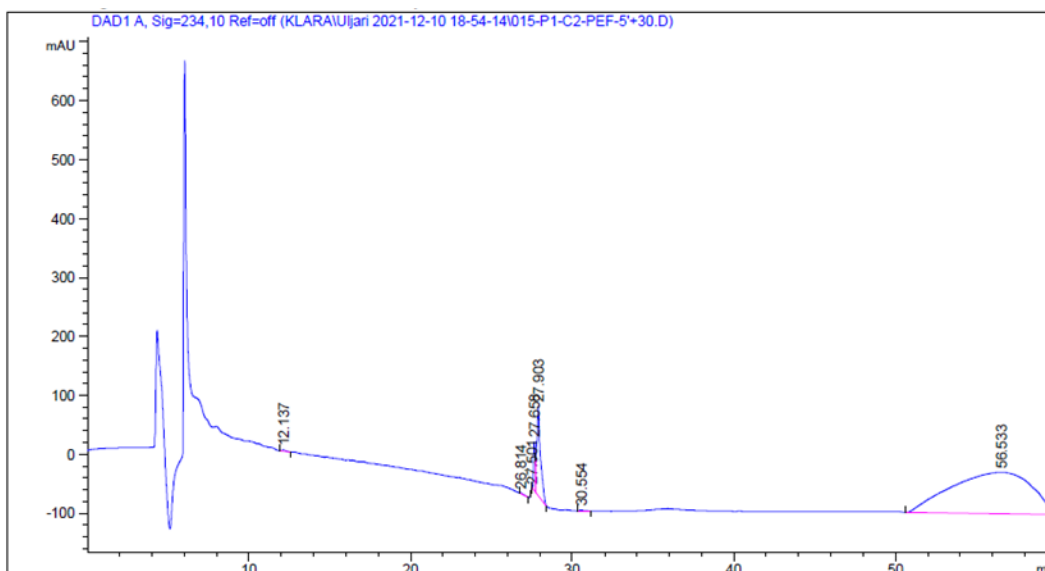
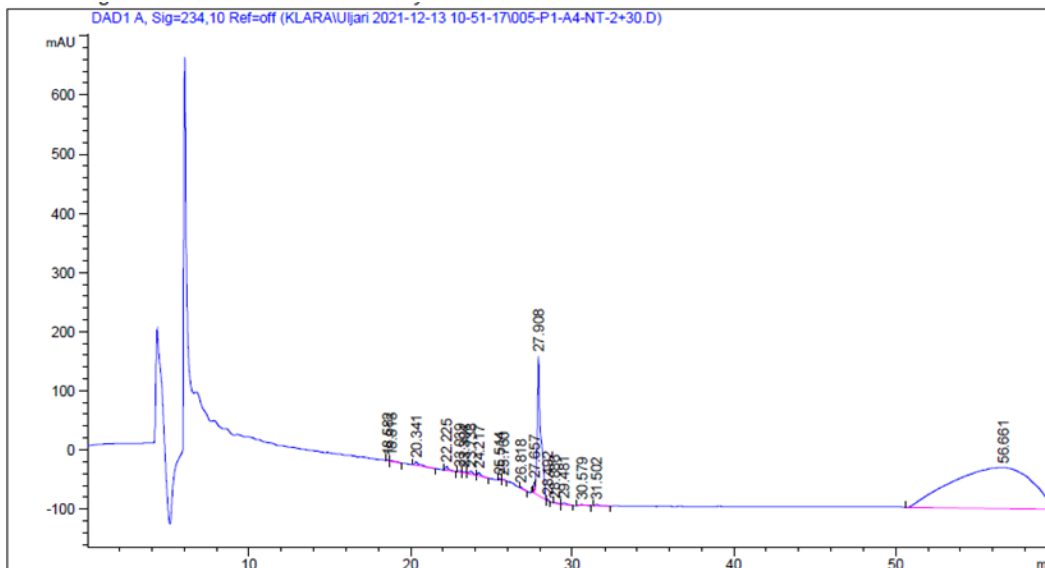
**Slika 34.** Usporedba kromatograma hidroperoksida u modelnoj otopini bez tretmana nakon temperiranja 1 minute na 25 °C i modelnoj otopini podvgrnutoj UTT tretmanu (5 minuta, frekvencija 25 Hz, napon 2 kV)



**Slika 35.** Usporedba kromatograma hidroperoksida u modelnoj otopini bez tretmana nakon temperiranja 1 minute na 25 °C te temperiranoj dodatnih 30 minuta na 25 °C i modelnoj otopini podvgrnutoj UTT tretmanu (1 minuta na 27.4 °C) te temperiranoj dodatnih 30 minuta na 25 °C



**Slika 36.** Usporedba kromatograma hidroperoksida u modelnoj otopini bez tretmana nakon temperiranja 1 minute na 25 °C te temperiranoj dodatnih 30 minuta na 25 °C i modelnoj otopini podvgrnutoj UZV tretmanu (12 minuta, snaga 20 %) te temperiranoj dodatnih 30 minuta na 25 °C



**Slika 37.** Usporedba kromatograma hidroperoksida u modelnoj otopini bez tretmana nakon temperiranja 1 minuta na 25 °C te temperiranoj dodatnih 30 minuta na 25 °C i modelnoj otopini podvgrnutoj PEF tretmanu (5 minuta, frekvencija 25 Hz, napon 2 kV) te temperiranoj dodatnih 30 minuta na 25 °C

## 5. ZAKLJUČAK

1. Praćenjem koncentracije p-nitrofenola pri simulaciji miješenja pri 27 °C, optimalni uvjeti za enzimsku aktivnost  $\beta$ -glukozidaze postignuti su u 40. minuti, dok su kod lipoksigenaze optimalni uvjeti miješenja postignuti u 30. minuti simulacije gdje je očitana najveća koncentracija nastalih hidroperoksida.
2. Primjenjeni tretmani pulsirajućim elektičnim poljem nisu u korelaciji sa navedenim podacima iz literature, gdje su dobiveni porasti aktivnosti enzima  $\beta$ -glukozidaze, a samim time i rast koncentracije fenolnih spojeva (produkata), dok je lipoksigenaza pokazala neznatne razlike u aktivnosti između netretiranih i tretiranih postupaka, što također ne odgovara literaturnim navodima.
3. Optimiranje PEF tretmana ukazuje na iznimnu važnost primjenjenog napona i njegovog vremenskog intervala na oba istražena enzima te bi se u daljnjim istraživanjima trebao staviti fokus upravo na duljinu trajanja tretiranja uzoraka. Pri optimiranju UTT tretmana važnost je stavljena na temperaturu, dok je pri optimiranju UZV dokazana važnost primjenjene amplitude i njenog vremenskog trajanja na  $\beta$ -glukozidaze i lipoksigenazu.
4. HPLC metodom je dokazano pozitivno djelovanje inovativnih tehnologija na enzimsku aktivnost  $\beta$ -glukozidaze, najveće PEF tretmanom, a zatim UZV i UTT tretmanom što je vidljivo iz priloženih kromatograma, dok nažalost utjecaj inovativnih tehnologija na enzimsku aktivnost lipoksigenaze nije bilo moguće sa sigurnošću dokazati isključivo radi nedostatka internog standarda tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.



## 6. LITERATURA

Abenoza M, Benito M, Saldaña G, Álvarez I, Raso J, Sánchez-Gimeno AC (2013) Effects of pulsed electric field on yield extraction and quality of olive oil. *Food Bioprocess Technol* **6**, 1367–1373. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0817-6>

Aguilera MP, Beltran G, Sanchez-Villasclaras S, Uceda M, Jimenez A (2010) Kneading olive paste from unripe “Picual” fruits: I. Effect on oil process yield. *J Food Eng* **97**, 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.11.013>

Aguilera MP, Jimenez A, Sanchez-Villasclaras S, Uceda M, Beltran G (2015) Modulation of bitterness and pungency in virgin olive oil from unripe “Picual” fruits. *Eur J Lipid Sci Technol* **117**, 1463–1472. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400432>

Aiello G, Catania P, Enea M, La Scalia G, Pipitone F, Vallone M (2012) Real time continuous oxygen concentration monitoring system during malaxation for the production of virgin olive oil. *Grasas Aceites* **63**, 475–483. <https://doi.org/10.3989/gya.058012>

Alagna F, Mariotti R, Panara F, Caporali S, Urbani S, Veneziani G i sur. (2012) Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biol* **12**, 162 <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-162>

Al-Azzawie HF, Alhamdani MSS (2006) Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci* **78**, 1371– 1377. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.07.029>

Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P (2011) Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor. *Food Chem* **128**, 704–710. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.092>

Amirante R, Cini E, Montel GL, Pasqualone A (2001) Influence of mixing and extraction parameters on virgin olive oil quality. *Grasas Aceites* **52**, 198–201. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i3-4.357>

Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, Constantinou M, Agalias A, Magiatis P i sur. (2006) The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr* **136**, 2213–2219. <https://doi.org/10.1093/jn/136.8.2213>

Angerosa F, Camera L, D'alessandro N, Mellerio G (1998) Characterization of seven new hydrocarbon compounds present in the aroma of virgin olive oils. *J Agric Food Chem* **46**, 648–653. <https://doi.org/10.1021/jf970352y>

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**, 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00194-1)

Angerosa F, Di Giovacchino L (1996) Natural antioxidants of virgin olive oil obtained by two and tri-phase centrifugal decanters. *Grasas Aceites* **47**, 247–254. <https://doi.org/10.3989/gya.1996.v47.i4.866>

Angerosa F (2002) Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 639–660. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9:10<639::AID-EJLT639>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9:10<639::AID-EJLT639>3.0.CO;2-U)

Aparicio R, Morales MT, Alonso V (1997) Authentication of European virgin olive oils by their chemical compounds, sensory attributes, and consumers` attitudes. *J Agric Food Chem* **45**, 1076–1083. <https://doi.org/10.1021/JF960659H>

Awad AB, Fink CS (2000) Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *J Nutr* **130**, 2127–2130. <https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2127>

Axelrod B, Cheesebrough T, Laakso S (1981) Lipoxygenase from Soybeans. *Methods Enzymol* **71**, 441-451. [https://doi:10.1016/0076-6879\(81\)71055-3](https://doi:10.1016/0076-6879(81)71055-3)

Bazoti FN, Gikas E, Skaltsounis AL, Tsaibopoulos A (2006) Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Anal Chim Acta* **573–574**, 258-266. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.075>

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q i sur. (2005) Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* **437**, 45–46. <https://doi.org/10.1038/437045a>

Bermudez B, Lope S, Ortega A, Varel, LM, Pacheco, YM, Abia R. i sur. (2011) Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr Pharm Des* **17**, 831–843. <https://doi.org/10.2174/138161211795428957>

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](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F0-306-48057-3_19) Pristupljeno 20. prosinca 2021.

Buttery RG, Takeoka GR (2004) Some unusual minor volatile components of tomato. *J Agric Food Chem* **52**, 6264–6266. <https://doi.org/10.1021/jf040176a>

Caponio F, Gomes T, Summo C, Pasqualone A (2003) Influence of the type of olive-crusher used on the quality of extra virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Technol* **105**, 201–206. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390041>

Caponio F, Summo C, Paradiso VM, Pasqualone A (2014) Influence of decanter working parameters on the extra virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* **116**, 1626–1633. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400068>

Catania P, Vallone M, Farid A, De Pasquale C (2016) Effect of O<sub>2</sub> control and monitoring on the nutraceutical properties of extra virgin olive oils. *J Food Eng* **169**, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.009>

Catania P, Vallone M, Pipitone F, Inglese P, Aiello G, La Scalia G (2013) An oxygen monitoring and control system inside a malaxation machine to improve extra virgin olive oil quality. *Biosyst Eng* **114**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.10.009>

Chemat F, Rombaut N, Meullemiestre A, Turk M, Perino S, Fabiano-Tixier A-S i sur. (2017) Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov Food Sci Emerg Technol* **41**, 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>

Chiacchierini E, Mele G, Restuccia D, Vinci G (2007) Impact of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. *Trends Food Sci Technol* **18**, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.008>

Clodoveo ML, Hbaieb RH, Kotti F, Mugnozza GS, Gargouri M (2014) Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Compr Rev Food Sci* **13**, 135–154. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12054>

Clodoveo ML (2012) Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future—An overview. *Trends Food Sci Technol* **25**, 13–23.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.004>

Clodoveo ML, Durante V, La Notte D (2013) Working towards the development of innovative ultrasound equipment for the extraction of virgin olive oil. *Ultrason Sonochem* **20**, 1261–1270.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.001>

Connor DJ, Fereres E (2005) The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Hortic Rev (Am Soc Hortic Sci)* **31**, 155–229. <https://doi.org/10.1002/9780470650882.ch4>

Dabbou S, Issaoui M, Esposto S, Sifi S, Taticchi A, Servili M i sur. (2009) Cultivar and growing area effects on minor compounds of olive oil from autochthonous and European introduced cultivars in Tunisia. *J Sci Food Agric* **89**, 1314–1325. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3588>

Dell'Agli M, Fagnani R, Mitro N, Scurati S, Masciadri M, Mussoni L i sur. (2006) Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J Agric Food Chem* **54**, 3259–3264. <https://doi.org/10.1021/jf0529161>

De Stefano G, Piacquadio P, Servili M, Di Giovacchino M, Sciancalepore V (1999) Effect of extraction systems on the phenolic composition of virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Technol* **101**, 328–332. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(199909\)101:9<328::AID-LIPI328>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(199909)101:9<328::AID-LIPI328>3.0.CO;2-M)

Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D (2002a) Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 587–601. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M)

Di Giovacchino L, Costantini N, Serraiocco A, Surricchio G, Basti C (2001) Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *Euro J Lipid Sci Technol* **103**, 279–285. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200105\)103:5<279::AID-EJLT279>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200105)103:5<279::AID-EJLT279>3.0.CO;2-I)

Di Giovacchino L, Costantini N, Ferrante ML, Serraiocco A (2002b) Influence of malaxation time of olive paste on oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive

oil obtained by a centrifugal decanter at water saving. *Grasas Aceites* **53**, 179–186. <https://doi.org/10.3989/gya.2002.v53.i2.302>

Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P (2013) Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem* **48**, 1532–1552. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>

El Darra N, Turk MF, Ducasse M-A, Grimi N, Maroun RG, Louka N i sur. (2016). Changes in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments. *Food Chem* **194**, 944–950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.059>

Elshafei AM, Hassan MM, Morsi NM, Elghonamy DH (2011) Purification and some kinetic properties of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus terreus* NRRL 265. *African J Biotechnol* **10**, 19556–19569. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2617>

Espínola F, Moya M, Fernández DG, Castro E (2009) Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *J Food Eng* **92**, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.038>

Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F i sur. (2013) Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* **368**, 1279–1290. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200303>

Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF i sur. (2006) Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr* **136**, 614–619. <https://doi.org/10.1093/jn/136.3.614>

Galli F, Birringer M, Lorkowski S, Frank J, Azzi A, Cruciani G i sur. (2017) Vitamin E: emerging aspects and new directions. *Free Radic Biol Med* **102**, 16–36. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017>

García A, Brenes M, Martínez F, Alba J, García P, Garrido A (2001) HPLC evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *J Am Oil Chem Soc* **78**, 625–629. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0316-x>

- García-Rodríguez R, Romero-Segura C, Sanz C, Sánchez-Ortiz A, Pérez AG (2011) Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res Int* **44**, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.023>
- Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N (2012) Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)-a review. *Int J Mol Sci* **13**, 3291–3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>
- Gomez-Rico A, Inarejos-Garci AM, Salvador MD, Fregapane G (2009) Effect of Malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra). *J Agric Food Chem* **57**, 3587–3595. <https://doi.org/10.1021/jf803505w>
- Goulas V, Manganaris GA (2012) Towards an Efficient Protocol for the Determination of Triterpenic Acids in Olive Fruit: A Comparative Study of Drying and Extraction Methods. *Phytochem Anal* **23**, 444–449. <https://doi.org/10.1002/pca.1378>
- Ha TJ, Nihei KI, Kubo I (2004) Lipoxygenase inhibitory activity of octyl gallate. *J Agric Food Chem* **52**, 3177–3181. <https://doi.org/10.1021/jf034925k>
- Inarejos-García AM, Gómez-Rico A, Salvador MD, Fregapane G (2009) Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition. *Eur Food Res Technol* **228**, 671–677. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0977-9>
- Jerman T, Trebše P, Vodopivec BM (2010) Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chem* **123**, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.006>
- Jolayemi OS, Tokatli F, Ozen B (2016) Effects of malaxation temperature and harvest time on the chemical characteristics of olive oils. *Food Chem* **211**, 776-783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.134>
- Kalogianni EP, Georgiou D, Hasanov JH (2019a) Olive Oil Processing: Current Knowledge, Literature Gaps, and Future Perspectives. *J Am Oil Chem Soc* **96**, 481-507. <https://doi.org/10.1002/aocs.12207>

Kalogianni EP, Georgiou D, Exarhopoulos S (2019b) Olive oil droplet coalescence during malaxation. *J Food Eng* **240**, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.017>

Kalua CM, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD (2006) Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. *J Agric Food Chem* **54**, 7641–7651. <https://doi.org/10.1021/jf061122z>

Kalua CM, Allen MS, Bedgood Jr DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K (2007) Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem* **100**, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.059>

Kapellakis IE, Tsagarakis KP, Crowther JC (2008) Olive oil history, production and by-product management. *Rev Environ Sci Biotechnol* **7**, 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9120-9>

Kiritsakis AK (1998) Flavor components of olive oil - a review. *J Am Oil Chem Soc* **75**, 673–681. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0205-6>

Klen TJ, Vodopivec BM (2012) The fate of olive fruit phenols during commercial olive oil processing: Traditional press versus continuous two- and three-phase centrifuge. *LWT* **49**, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.029>

Kwon WT, Park K, Han SD, Yoon SM, Kim JY, Bae W, i sur. (2010). Investigation of water separation from water-in-oil emulsion using electric field. *J Ind Eng Chem* **16**, 684–687. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2010.07.018>

Lee-Huang S, Huang PL, Zhang DW, Lee JW, Bao J, Sun YT i sur. (2007) Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. fusion [corrected] inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 872–878. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.071>

Leone A, Esposito S, Tamborrino A, Romaniello R, Taticchi A, Urbani S i sur. (2016) Using a tubular heat exchanger to improve the conditioning process of the olive paste: Evaluation of yield and olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* **118**, 308–317. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400616>

Leone A, Romaniello R, Zagaria R, Tamborrino A (2014) Development of a prototype malaxer to investigate the influence of oxygen on extra-virgin olive oil quality and yield, to define a new



design of machine. *Biosyst Eng* **118**, 95–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2013.12.002>

Lercker G, Frega N, Bocci F, Mozzon M (1999) Volatile constituents and oxidative stability of virgin olive oils: Influence of the kneading of olive-paste. *Grasas Aceites* **50**, 26–29.  
<https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i1.632>

Lipshitz N, Gophna R, Hartman M, Biger G (1991) The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the old world: a reassessment. *J Arch Sci* **18**, 441–453. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(91\)90037-P](https://doi.org/10.1016/0305-4403(91)90037-P)

Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, Jaramillo S, Varela LM, Ortega-Gomez A i sur. (2014) Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1638–1656. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.007>

Luaces P, Romero C, Gutierrez F, Sanz C, Pérez AG (2007) Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *J Sci Food Agric* **87**, 2721–2727. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3049>

Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M i sur. (2004) Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J Nutr Biochem* **15**, 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.12.010>

Masella P, Parenti A, Spugnoli P, Calamai L (2011) Malaxation of olive paste under sealed conditions. *J Am Oil Chem Soc* **88**, 871–875. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1739-y>

Micol V, Caturla N, Perez-Fons L, Mas V, Perez L, Estepa A (2005) The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res* **66**, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.005>

Migliorini M, Mugelli M, Cherubini C, Viti P, & Zanoni B (2006) Influence of O<sub>2</sub> on the quality of virgin olive oil during malaxation. *J Sci Food Agric* **86**, 2140–2146.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2588>

Miles EA, Zoubouli P, Calder PC (2005) Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Clin Nutr* **24**, 780–784. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.06.031>



- Moya M, Espínola F, Fernández DG, de Torres A, Marcos J, Vilar J i sur. (2010) Industrial trial son coadjuvants for olive oil extraction. *J Food Eng* **97**, 57–63. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2009.09.015>
- Naziri E, Consonni R, Tsimidou MZ (2014) Squalene oxidation products: monitoring the formation, characterisation and pro-oxidant activity. *Eur J Lipid Sci Technol* **116**, 1400–1411. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300506>
- Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockmann R (2005) Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *J Agric Food Chem* **53**, 823–837. <https://doi.org/10.1021/jf048569x>
- Obied HK, Prenzler PD, Ryan D, Servili M, Taticchi A, Esposito S i sur. (2008) Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Nat Prod Rep* **25**, 1167–1179. <https://doi.org/10.1039/b719736e>
- Oliveras López MJ, Innocenti M, Ieri F, Giaccherini C, Romani A, Mulinacci N (2008) HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea europaea* L. fruits. *J Food Compost Anal* **21**, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.04.012>
- Omar SH (2010) Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm* **78**, 133–154. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18>
- Parenti A, Spugnoli P, Masella P, Calamai L (2008) The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *Eur J Lipid Sci Technol* **110**, 735–741. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700307>
- Pavlič K (2021) Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana i ultrazvuka na aktivnost enzima ploda masline (Diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Piacquadio P, De Stefano G, Sciancalepore V (1998) Quality of virgin olive oil extracted with the new centrifugation system using a two-phases decanter. *Eur J Lipid Sci Technol* **100**, 472–474. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(199810\)100:10<472::AID-LIPI472>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(199810)100:10<472::AID-LIPI472>3.0.CO;2-6)
- Piroddi M, Albini A, Fabiani R, Giovannelli L, Luceri C, Natella F i sur. (2017) Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. *BioFactors* **43**, 17–41. <https://doi.org/10.1002/biof.1318>

Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaoujon I (2006) Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci* **12**, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>

Puel C, Mathey J, Agalias A, Kati-Coulibaly S, Mardon J, Obled C i sur. (2006) Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clin Nutr* **25**, 859–868. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2006.03.009>

Puértolas E, de Marañón IM (2015) Olive oil pilot-production assisted by pulsed electric field: Impact on extraction yield, chemical parameters and sensory properties. *Food Chem* **167**, 497–502. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.029>

Puértolas E, Luengo E, Álvarez I, Raso J (2012) Improving mass transfer to soften tissues by pulsed electric fields: fundamentals and applications. *Annu Rev Food Sci and Technol* **3**, 263–282. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101208>

Raffo A, Bucci R, D'Aloise A, Pastore G (2015) Combined effects of reduced malaxation oxygen levels and storage time on extra-virgin olive oil volatiles investigated by a novel chemometric approach. *Food Chem* **182**, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.128>

Ranalli A, Angerosa F (1996) Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products. *J Am Oil Chem Soc* **73**, 417–422. <https://doi.org/10.1007/BF02523912>

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 Technol* **103**, 228–238. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200104\)103:4<228::AID-EJLT228>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200104)103:4<228::AID-EJLT228>3.0.CO;2-7)

Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Lucera L, Del Re P (2003) Enhancing the quality of virgin olive oil by use of a new vegetable enzyme extract during processing. *Eur Food Res Technol* **216**, 109–115. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0618-7>

Rayat K, Feyzi F (2011) Influence of external electric field on the polarity of water droplets in water-in-oil emulsion phase transition. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **375**, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.11.056>

Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, De Castro A (2007) In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem* **55**, 680–686. <https://doi.org/10.1021/jf0630217>

Romero-Segura C, Sanz C, Perez AG (2009) Purification and characterization of an olive fruit  $\beta$ -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *J Agric Food Chem* **57**, 7983–7988. <https://doi.org/10.1021/jf901293c>

Ryan D, Antolovich M, Herlt T, Prenzler PD, Lavee S, Robards K (2002) Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. *J Agric Food Chem* **50**, 6716–6724. <https://doi.org/10.1021/jf025736p>

Sánchez-Ortiz A, Romero C, Pérez AG, Sanz C (2008) Oxygen concentration affects volatile compound biosynthesis during virgin olive oil production. *J Agric Food Chem* **56**, 4681–4685. <https://doi.org/10.1021/jf8004838>

Saulis G (2010) Electroporation of Cell Membranes: The Fundamental Effects of Pulsed Electric Fields in Food Processing. *Food Eng Rev* **2**, 52–73. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9023-3>

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 Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J Agric Food Chem* **47**, 12–18. <https://doi.org/10.1021/jf9806210>

Servili M, Esposito S, Taticchi A, Urbani S, Di Maio I, Veneziani G i sur. (2015) New approaches to virgin olive oil quality, technology, and by-products valorization. *Eur J Lipid Sci Technol* **117**, 1882–1892. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500138>

Servili M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A* **1054**, 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.070>

Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G (2003) Air exposure time of olive pastes during the extraction process and phenolic and volatile composition of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* **83**, 685–695. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0759-0>

- Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I. i sur. (2013) Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *ANTIGE* **3**, 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>
- Servili M, Taticchi A, Esposto S, Urbani S, Selvaggini R, Montedoro G (2008) Influence of the decrease in oxygen during Malaxation of olive paste on the composition of volatiles and phenolic compounds in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **56**, 10048–10055. <https://doi.org/10.1021/jf800694h>
- Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A (2014) Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. *Public Health Nutr* **17**, 2769–2782. <https://doi.org/10.1017/S1368980013003169>
- Soldo B (2016) Utjecaj lipoksigenaze na sastav hlapljivih tvari u maslinovom ulju autohtonih dalmatinskih sorti (Doktorska disertacija), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Stefanoudaki E, Koutsaftakis A, Harwood JL (2011) Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil. *Food Chem* **127**, 1481–1486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.120>
- Stiti N, Triki S, Hartmann MA (2007) Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids* **42**, 55–67. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-3002-8>
- Takahama U, Oniki T (2000) Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions. *J Plant Res* **113**, 301–309. <https://doi.org/10.1007/PL00013933>
- Tamborrino A, Romaniello R, Zagaria R, Leone A (2014) Microwave-assisted treatment for continuous olive paste conditioning: Impact on olive oil quality and yield. *Biosyst Eng* **127**, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.08.015>
- Tamborrino A, Urbani S, Servili M, Romaniello R, Perone C i Leone A (2019) Pulsed electric fields for the treatment of olive pastes in the oil extraction process. *Appl Sci* **10**, 114. <https://doi.org/10.3390/app10010114>

- 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**, 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.071>
- Traber MG, Atkinson J (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* **43**, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D (2003) Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* **348**, 2599–2608. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025039>
- Turk MF, Vorobiev E, Baron A (2012) Improving apple juice expression and quality by pulsed electric field on an industrial scale. *LWT - Food Sci Technol* **49**, 245–250. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.07.024>
- Turner R, Etienne N, Alonso MG, de Pascual-Teresa S, Minihane AM, i sur. (2005) Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics. *Int J Vitam Nutr Res* **75**, 61–70. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.75.1.61>
- Uceda M, Jimenez A, Beltran G (2006) Olive oil extraction and quality. *Grasas Aceites* **57**, 25–31. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.19>
- Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize (1991) *Službeni list europske unije* **248**, Strasbourg <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A01991R2568-20191020&qid=1656776773094> Pristupljeno 30. svibnja 2022.
- Velagić, D (2016) Razvoj LC/MS metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju (Diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Veillet S, Tomao V, Bornard I, Ruiz K, Chemat F (2009) Chemical changes in virgin olive oils as a function of crushing systems: Stone mill and hammer crusher. *C R Chim* **12**, 895–904. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2009.01.003>

Venkateshwarlu G, Let MB, Meyer AS, Jacobsen C (2004) Modeling the sensory impact of defined combinations of volatile lipid oxidation products on fishy and metallic off-flavors. *J Agric Food Chem* **52**, 1635–1641. <https://doi.org/10.1021/jf0351321>

Viola P, Viola M (2009) Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin protector. *Clin Dermatol* **27**, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.01.008>

Volpe MG, De Cunzio F, Siano F, Paolucci M, Barbarisi C, Cammarota G (2014) Influence of extraction techniques on physical-chemical characteristics and volatile compounds of extra virgin oil. *J Oleo Sci* **63**, 875–883. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14053>

WHO (2015) Healthy diet - Fact sheet N8394. WHO- World Health Organization. <https://www.who.int/publications/m/item/healthy-diet-factsheet394> Pristupljeno 30. svibnja 2022.

Willett WC (2006) The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr* **9**, 105–110. <https://doi.org/10.1079/phn2005931>

Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJ (2009) Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr* **63**, 813–820. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.29>

Zanichelli D, Baker TA, Clifford MN, Adams MR (2005) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by oleuropein is mediated by hydrogen peroxide. *J Food Prot* **68**, 1492–1496. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.7.1492>



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja NIKO JAKOLIŠ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis