

**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Iva Budimir  
0058213756**

**ODABIR ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA  
AKTIVNOSTI LIPOKSIGENAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** 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)

**Mentor:** prof. dr. sc. Dubravka Škevin

**Zagreb, 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Odabir analitičke metode određivanja aktivnosti lipoksigenaze**

**Iva Budimir, 0058213756**

**Sažetak:**

Fenoli i hlapljive tvari utječu na nutritivnu vrijednost i specifična senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja. Njihovo nastajanje posljedica je djelovanja endogenih enzima. Iz tjesta maslina sorti levantinka, oblica, rosulja i istarska bijelica u tri roka berbe provedena je ekstrakcija enzima lipoksigenaze. Aktivnost lipoksigenaze određena je dvijema metodama, spektrofotometrijski na 234 nm te pomoću HPLC metode. Ispitivanim metodama utvrđeno je da postoji korelacija rezultata, ali su u HPLC metodi rezultati precizniji.

**Ključne riječi:** djevičansko maslinovo ulje, senzorska svojstva, lipoksigenaza, spektrofotometrijske metode, HPLC metode

**Rad sadrži:** 26 stranica, 6 slika, 9 tablica, 20 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Dubravka Škevin

**Pomoć pri izradi:** mag.ing., Katarina Filipan

**Datum obrane:** 11. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering  
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

Selection of analytical method for Lipoxygenase activity determination

Iva Budimir, 0058213756

### Abstract:

Phenols and volatile substances affect the nutritional value and specific sensory properties of virgin olive oil. They are formed by the action of endogenous enzymes. Lipoxygenase enzyme was extracted from the pulp of different olive types: levantinka, oblica, rosulja and istarska bjelica, in three harvest periods. Lipoxygenase activity was determined by two methods, UV spectrophotometry at 234 nm and using the HPLC method. It was established that there is a correlation of the results with the tested methods, but the results are more precise in the HPLC method.

**Keywords:** virgin olive oil, sensory properties, lipoxygenase, spectrophotometric methods, HPLC methods

**Thesis contains:** 26 pages, 6 figures, 9 tables, 20 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

**Technical support and assistance:** Katarina Filipan, MSc

**Thesis defended:** July 11, 2021

# Sadržaj

<b>SADRŽAJ</b> .....	<b>1</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. MASLINA.....	2
2.2. PRERADA MASLINA I PROIZVODNJA MASLINOVOG ULJA .....	2
2.3. KEMIJSKI SASTAV PLODA MASLINE I MASLINOVOG ULJA .....	4
2.4. ENDOGENI ENZIMI U PLODU MASLINE .....	6
2.5. LIPOKSIKENAZA I LIPOKSIKENAZNI PUT .....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>11</b>
3.1. MATERIJAL .....	11
3.1.1. REAGENSI .....	11
3.2. METODE RADA .....	12
3.2.1. PRIPREMA OTOPINA .....	12
3.2.2. IZOLACIJA LIPOKSIKENAZE IZ MASLINOVA TIJESTA .....	13
3.2.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPOKSIKENAZE SPEKTROFOTOMETRIJSKOM METODOM .....	14
3.2.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPOKSIKENAZE HPLC METODOM.....	15
3.2.5. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO BRADFORDU .....	18
3.2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA .....	20
4.2. HPLC ANALIZA .....	22
4.3. USPOREDBA SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE I HPLC METODE.....	23
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>24</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>25</b>

## 1. UVOD

Zbog svoje velike nutritivne vrijednosti te blagotvornog djelovanja na zdravlje, djevičansko maslinovo ulje (DMU) sastavni je dio zdrave i uravnotežene prehrane. Prilikom proizvodnje DMU iz opranog i čistog ploda procesom mljevenja, miješenja i ekstrakcije iz ploda se izdvaja ulje bogato hlapljivim sastojcima i fenolima zaslužnima za specifična senzorska svojstva. Stvaranje hlapljivih spojeva posljedica je djelovanja specifičnih endogenih enzima. Jedan od njih je i lipoksigenaza (LOX), membranski enzim koji se nalazi u samom plodu masline te kao supstrat za svoj rad koristi linolensku i linolnu kiselinu. U lipoksigenaznom putu katalizira reakcije nastajanja ugodnih hlapljivih komponenti koje obogaćuju maslinovo ulje poželjnim senzorskim svojstvima. Aktivnost lipoksigenaze ovisi o mnogo čimbenika, kao što su: datum berbe, sorta maslina, način proizvodnje, način skladištenja, indeks zrelosti itd. Cilj ovog rada bio je usporediti dvije metode određivanja aktivnosti enzima lipoksigenaze: metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i spektrofotometrijsku metodu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MASLINA

Maslina ili uljika (*Olea europaea*) je subtropska vazdazelena biljka iz porodice maslina (*Oleaceae*). Zastupljena je dvjema podvrstama: divljom maslinom (*Olea europaea oleaster*) i kultiviranom maslinom (*Olea europaea sativa*). Kultivirana (pitoma) maslina ima karakteristično nepravilno, kvrgavo, razgranato stablo, visine oko 10 m u slobodnom rastu. U redovitom nasadu ono je visoko 4 do 5 m, a u industrijskim nasadima visina mu se nastoji smanjiti na 2 do 3 m. Listovi su kožasti, ovalni, s donje strane srebrnasti. Bijeli cvjetovi cvatu od svibnja do polovice lipnja, a plod dozrijeva od listopada do veljače, ovisno o sorti i klimatskim prilikama. Zreo plod je ovalna, tamnoplava do crna koštunica bogata uljem (15 do 30 %). Danas se maslina najviše uzgaja u zemljama oko Sredozemnog mora (Španjolska, Italija, Grčka, Tunis, Portugal, Turska, Maroko, Alžir). U svijetu je poznato više od tisuću sorti kultivirane masline različitih svojstava. Sorte se dijele na uljne, stolne i sorte kombiniranih svojstava kojih se plodovi mogu koristiti u obje svrhe (Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021)

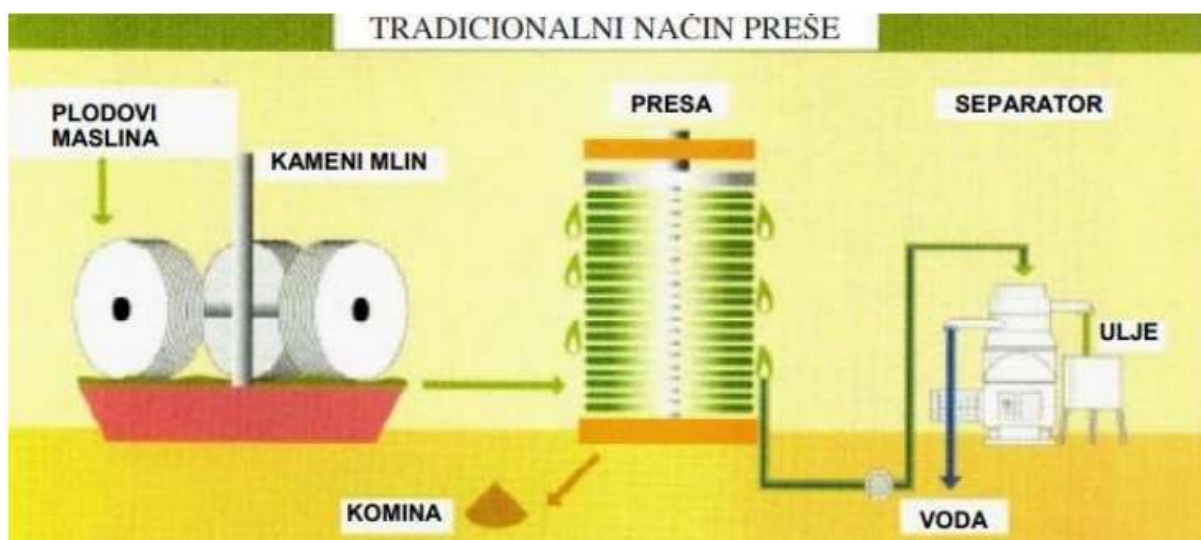
U 2006. godini registrirano je 1275 sorti maslina. Danas se u Hrvatskoj uzgajaju sljedeće sorte (Elezović, 1980):

- **SORTE ZA ULJE:** bjelica, buža, drobnica, leccino, grozdulja, karbona, karbunčela, lastovka, levantinka, puljka, piculja, rosinjola, rosulja, sitnica, slatka, šarulja, uljarica, zuzorka, žutica
- **STOLNE SORTE:** dužica, murgulja
- **MJEŠOVITE SORTE:** buža, karbonera, oblica, grozdača, slivnjača, mezanica, želudarica

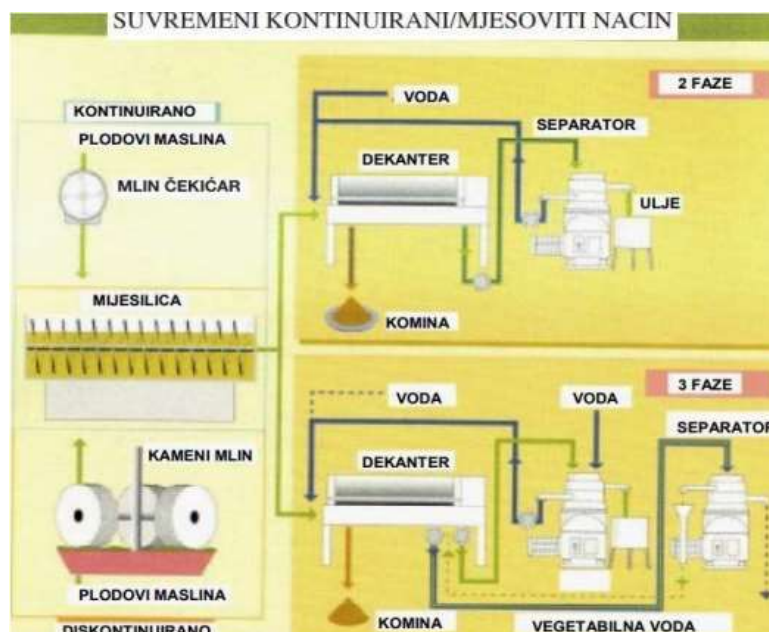
### 2.2. PRERADA MASLINA I PROIZVODNJA MASLINOVOG ULJA

Nakon berbe maslinari transportiraju plodove masline u uljaru. Slijedi vaganje i usipavanje u koš koji na površini ima rešetku. Na rešetki zaostaju krupnije grane, a plodovi se usisavaju u koš. Lišće i sitnije grančice uklanjaju se strujom zraka. Ostaci zemlje i druge nečistoće koje se nalaze na površini ploda masline uklanjaju se vodom. Plodovi se kratko moče i potom ispiru mlazovima vode. Kako bi se omogućilo izdvajanje ulja iz vakuole koja se nalazi

u citoplazmi stanice, potrebno je razbiti staničnu strukturu. To se postiže mljevenjem. Tijekom mljevenja ulje i specifične tvari koje se nalaze u kožici (klorofili, voskovi), sjemenci i pulpi (enzimi, tokoferoli), dolaze u međusobni kontakt. To je početak kemijskih i biokemijskih reakcija koji određuju sastav i svojstva djevičanskog maslinovog ulja. U procesu mljevenja koriste se kameni ili metalni mlinovi koji usitnjavaju plodove i tako potiču izdvajanje ulja. Nakon mljevenja slijedi miješenje. Miješenje je zapravo miješanje samljevene mase maslinovog tijesta kojom se postiže razbijanje emulzije. Male kapljice ulja se spajaju u veće i time se postiže bolje odvajanje uljne od vodene faze. Miješenje se odvija u inoks koritima. Nakon miješenja slijedi separacija uljne od vodene faze. Separacija se provodi prešanjem, centrifugalnom ekstrakcijom ili (rijetko) procjeđivanjem. Separacija ulja iz maslinovog tijesta prešanjem često se u žargonu naziva 'tradicionalni postupak'. Provodi se na hidrauličkim prešama otvorenog tipa. Princip separacije djevičanskog maslinovog ulja iz tijesta kontinuiranom centrifugalnom ekstrakcijom je razlika u gustoći ulja, vegetabilne vode i komine. Ovaj postupak odvija se u dekanterima (Škevin, 2016). Nakon provedenog postupka smjesa maslinovog ulja i vode prolazi kroz vertikalni centrifugalni separator gdje se odvajaju vodena faza (vegetabilna voda) i djevičansko maslinovo ulje (Slika 1. i 2.).



**Slika 1.** Opća shema proizvodnje maslinovog ulja postupkom prešanja (Gugić, 2006)



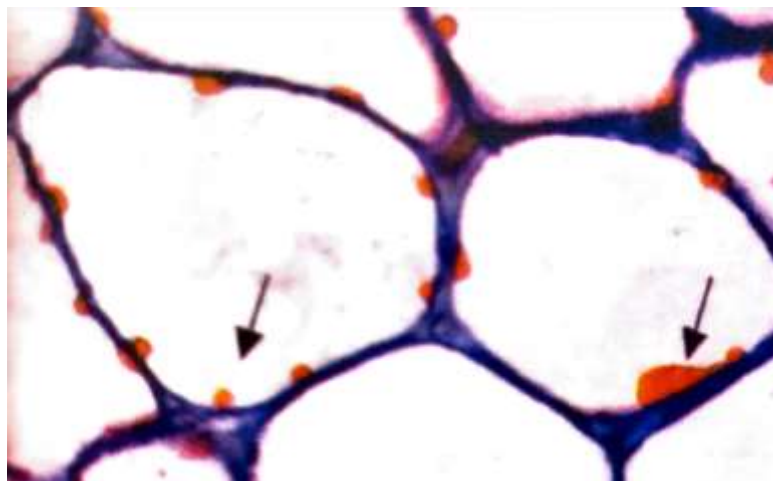
**Slika 2.** Proizvodnja maslinovog ulja horizontalnom centrifugalnom ekstrakcijom (Gugić, 2006)

### 2.3. KEMIJSKI SASTAV PLODA MASLINE I MASLINOVOG ULJA

Osnovni preduvjet za dobivanje kvalitetnog djevičanskog maslinovog ulja je kvalitetna sirovina tj. neoštećen, svjež i optimalno dozrio plod masline. S obzirom na različitu veličinu ploda kemijski sastav može biti vrlo različit. Plod u cijelosti može sadržavati 40 – 70 % vode, 6 – 25 % ulja te 25 – 35 % ostalih sastojaka (šećeri, organske kiseline, bjelančevine, biljna vlakna, tvari boje, mineralne tvari i dr.). Plod masline sastoji se od kožice, pulpe i koštice. Kožica masline građena je od sloja epidermalnih stanica iznad kojeg se nalazi kutikula prekrivena masno-voštanom prevlakom, sastavljenom od 40 % triacilglicerola, 30 % triterpenskijh kiselina, 20 % alifatskih i triterpenskijh alkohola te oko 10 % voskova. Prilikom prerade maslina masno voštana prevlaka dolazi u kontakt s uljem pa se dio ovih tvari otapa i postaje njegov sastavni dio. Kožica je i dio ploda koji u najvećoj mjeri sadrži i tvari boje-lipofilne klorofile, karotene i ksantofile te hidrofilne antocijane. Pulpa ploda građena je od stanica čija je primarna stanična stijenka sastavljena od celuloze, pektoceluloze i hemiceluloze. Za stanice pulpe karakteristično je nakupljanje ulja u vakuolama koje ispunjavaju 80% volumena stanice. Najveći udio sadržaja vakuola u uljnim stanicama ploda čine triacilgliceroli. U vodenom dijelu citoplazme sadržani su šećeri, organske kiseline, fenoli i druge u vodi topljive tvari (Koprivnjak, 2006). Od šećera u plodu masline uglavnom dominiraju glukoza, fruktoza i manoza (Nergiz i Engez, 2000). Od organskih kiselina u plodu masline



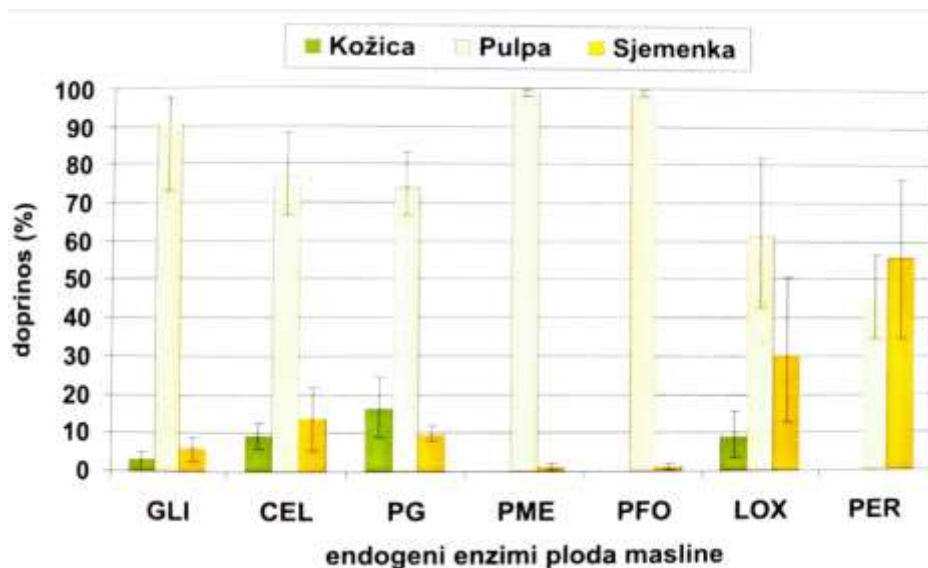
najzastupljenije su limunska, jabučna i oksalna kiselina (Koprivnjak, 2006). Fenolne tvari u stanicama ploda masline (fenolne kiseline i alkoholi te sekoiridoidi) javljaju se u vidu nakupina smještenih neposredno uz staničnu stijenku. (Slika 3.) (Bitonti i sur., 2000). Dozrijevanjem plodova maseni udio fenola smanjuje se s 20-30 g/kg u potpuno razvijenim zelenim plodovima, na 5-10 g/kg u zrelim pocrnjelim maslinama. (Castelli i sur., 1999). Fenoli su izrazito hidrofilnog karaktera, ali se djelomično otapaju i u kapljicama ulja s kojima dolaze u neposredan kontakt prilikom razaranja stanične strukture, za vrijeme prerade maslina. U pravilu se u ulju otopi tek 0,5-1,0 % ukupnih fenola. Fiziološka svrha nakupljanja triacilglicerola i fenola i vakuolama najvjerojatnija je njihova zaštita od endogenih enzima iz citoplazme koja ih okružuje. U slučaju kidanja vakuolarnih membrana, triacilgliceroli postaju dostupni djelovanju lipaza, masne kiseline lipoksigenazama i peroksidazama, a biofenoli glikozidazama i polifenolksidazama. U sjemenki masline uglavnom se nalaze tokoferoli i ulje. (Koprivnjak, 2006). Maslinovo ulje sadrži 2 glavne frakcije: Gliceridnu frakciju i negliceridnu frakciju. Gliceridna frakcija uglavnom je sastavljena od triacilglicerola, diacilglicerola, monoacilglicerola, slobodnih masnih kiselina i fosfolipida koji predstavljaju 98,5-99,5 % ukupnog kemijskog sastava ulja. Negliceridna frakcija sastoji se od ugljikovodika, tokoferola, pigmentata, sterola, fenola, triterpenskih alkohola i ostalih spojeva koji čine 0,5% - 1,5% ukupnog sastava. Kada je riječ o triacilglicerolima maslinovog ulja, najzastupljenije su mononezasićene masne kiseline (pretežno oleinska), ali su prisutne i zasićene masne kiseline te polinezasićene masne kiseline (linolenska kiselina). Kao što je navedeno, oleinska masna kiselina (18:1 n-9) čini najveći udio ukupnih masnih kiselina (55-83 %), ima veliku nutritivnu vrijednost i lako je probavljiva. Osim oleinske, najvažnija esencijalna masna kiselina prisutna u maslinovom ulju je linolna masna kiselina u udjelu od 3,5-21 %, ali ima i linolenske masne kiseline u znatno manjoj količini (do 0,9 %) (Šarolić i sur., 2014).



Slika 3. Vakuole s fenolnim tvarima (crveno obojene) unutar stanice pulpe ploda maslina (Bitonti i sur., 2000)

#### 2.4. ENDOGENI ENZIMI U PLODU MASLINE

Maslina sadrži više vrsta endogenih enzima. To su lipaze, glikozidaze, poligalakturonaze, celulaze, pektin-metilesteraze, lipoksigenaze, peroksidaze te polifenoloksidaze. Oni se oslobađaju kada se naruši struktura tkiva ploda, primjerice uslijed mehaničkih oštećenja tijekom berbe, napada mikroorganizama tijekom procesa skladištenja ili uslijed mehaničkih oštećenja tijekom same ekstrakcije (Hbaieb i sur., 2014). Pregled glavnih endogenih enzima prikazan je u Tablici 1., a doprinos pojedinog dijela ploda ukupnoj enzimskoj aktivnosti prikazan je na slici 4. Ovaj rad bavi se djelovanjem enzima lipoksigenaze. Lipoksigenaze su uključene u lipoksigenazni put i posljedica njegovog djelovanja je stvaranje C6 i C5 spojeva koji su kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi arome djevičanskog maslinovog ulja (Luaces i sur., 2007) i nosioci zelenih nota.



Slika 4. Doprinos pojedinih dijelova ploda masline u ukupnoj enzimskoj aktivnosti

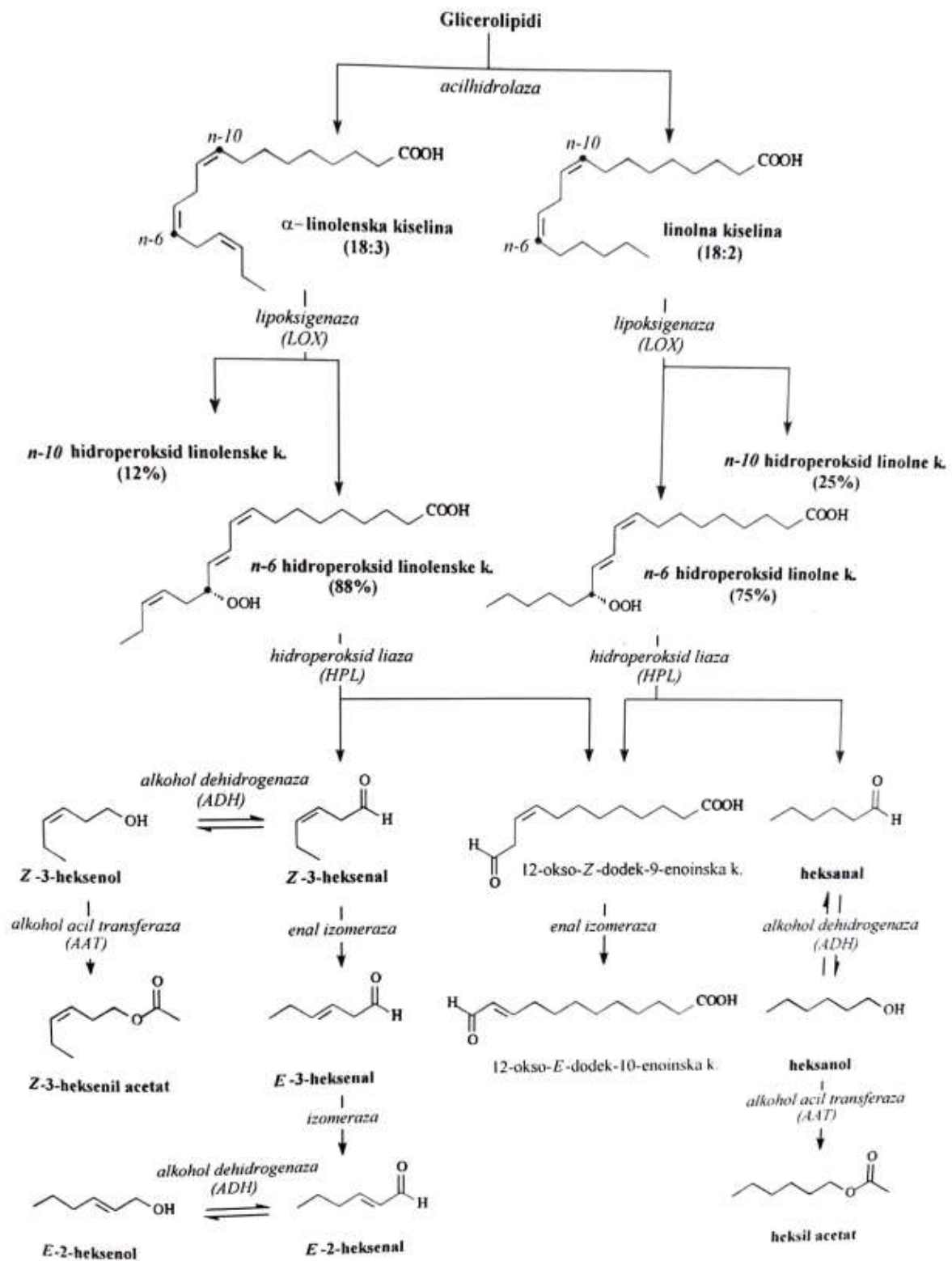
Tablica 1. Raspoređenost u plodu i posljedice djelovanja glavnih endogenih enzima ploda (Koprivnjak, 2006)

Vrsta enzima	Endogeni enzimi	Glavni izvor	Posljedice djelovanja
<b>hidrolaze</b>	lipaze	Pulpa i sjemenka	Hidroliza triacilglicerola i oslobađanje masnih kiselina
	Glikozidaze (GLI)	Pulpa	Odvajanje šećera iz fenolnih glukozida pri čemu nastaju fenolni aglikoni koji su topljivi u ulju
	Celulaze (CEL) Poligalakturonaze(PG) Pektin- metilesteraze(PME)	Pulpa	Razgradnja celuloze, hemiceluloze i pektina; razgradnja stanične stijenke i time olakšavanje izdvajanja kapljica ulja
<b>oksidoreduktaze</b>	Polifenoloksidaze(PFO)	Pulpa	Oksidacija (degradacija)fenolnih tvari
	Peroksidaze (PER)	Sjemenka	
	Lipoksigenaze (LOX)	Pulpa i sjemenka	Oksidacija slobodnih masnih kiselina – početak enzimskih reakcija kojima nastaju poželjne tvari arome ulja

## 2.5. LIPOKSIKENAZA I LIPOKSIKENAZNI PUT

Lipoksigenaze su enzimi široko rasprostranjeni u biljkama, gljivama i životinjama. Enzimi lipoksigenaze građeni su od jednog polipeptidnog lanca molekularne mase od 75-80 kDa kod životinja te 94-104 kDa kod biljaka. Proteini imaju N-terminalnu B-bačva domenu i veću katalitičku domenu koja sadrži 1 atom ne hemske željezo. Atom željeza nalazi se u molekuli liganda zajedno sa konzerviranim histidinima i karboksilnom skupinom konzerviranog izoleucina na C terminalnom kraju proteina. S obzirom na to da željezo nema hema, lipoksigenaza se oku čini bezbojnom. Kada je izolirana lipoksigenaza je uglavnom u inaktivnom obliku (Brash, 1999). Slobodne masne kiseline, linolna i linolenska, supstrat su na koji u anaerobnim uvjetima djeluje enzim lipoksigenaza ugrađujući –OOH skupinu u položaje n-6 (oko 80 % nastalih hidroksiperoksida) ili n-10 (oko 20 % nastalih hidroksiperoksida). Osim preferencije prema položaju n-6, lipoksigenaza iz maslina kao supstrat preferira linolensku kiselinu, prema kojoj je dvostruko aktivnija nego prema linolnoj. Lipoksigenaza iz maslina membranski je enzim, s optimalnim pH od 5,0-5,5 (uobičajena vrijednost samljevenih maslina), a optimalna temperatura djelovanja je 25 °C. Povećanjem temperature iznad 35 °C aktivnost joj se naglo smanjuje. Visoke koncentracije fenola hidrofilnog karaktera u samljevenim maslinama također mogu inhibirati njeno djelovanje. Pored ovog glavnog djelovanja, lipoksigenaza sudjeluje i u reakcijama lipoksigenaznog puta (Slika 5.) Lipoksigenaza može cijepati nastale hidroperoksidge stvarajući alkoksi radikale i time pokrenuti niz reakcija čiji su produkti C5 komponente arome (LOX put): E-2-pentanal, 1-penten-3-on, Z-2-penten-1-ol, E-2-penten-1-ol i 1-penten-3-ol. Od ovih tvari, s obzirom na omjer uobičajenih masenih udjela u djevičanskim uljima i masenih udjela praga osjetljivosti, samo 1-penten-3-on samostalno pridonosi poželjnoj aromi ulja (po zelenilu, prodoran), dok ostale C5 komponente pridonose aromi u sinergiji s ostalim stvarima. ( Koprivnjak, 2006). Biosinteza većine poželjnih tvari arome djevičanskog maslinovog ulja počinje u trenutku pucanja stanica za vrijeme faze mljevenja i drobljenja ploda jer su enzimi lipoksigenaznog puta u tom trenutku oslobođeni iz stanice ploda. Prvi supstrat tim enzimima su fosfolipidi i glicerolipidi prisutni u membrani iz kojih enzim acil hidrolaza cijepa polinezasićene masne kiseline. Lipoksigenaza tada oksidira linolnu i linolensku kiselinu, na prethodno opisan način. Hidroksiperoksid liazza cijepa lanac oksidirane masne kiseline između ugljika s vezanom –OOH skupinom i njemu susjedne trans dvostruke veze. Tada iz n-6 hidroksiperoksida linolne kiseline nastaje heksanal (aldehid). Dobiveni aldehid kasnije se reducira u C6 alkohol pomoću alkohol dehidrogenaze i transformiran u C6 eter pomoću alkohol acil transferaze (Slika 5.). Pretpostavljalo se da blaži

intenzitet mljevenja te kraći period miješenja ima pozitivan utjecaj na aktivnost LOX te stvaranje poželjnih aroma djevičanskog maslinovog ulja (niže povećanje temperature maslinova tijesta). Hlapljive tvari arome nastaju u fazi mljevenja, ali za vrijeme faze miješenja, njihova biosinteza je usporena i dolazi do stvaranja većih količina C6 alkohola kao i C6 i C5 karbonilnih spojeva. U skladu s time, duže vrijeme miješenja pozitivno će utjecati na koncentraciju hlapljivih tvari u ulju jer će doći do preraspodjele hlapljivih tvari iz hidrofilne frakcije u lipofilnu. Održavanje temperature (sprječavanje zagrijavanja) dodatno će pridonijeti povećanju koncentracije poželjnih aroma maslinovog ulja (Koprivnjak i sur., 2012).



Slika 5. Lipoksigenazni (LOX) put nastanka tvari s poželjnim mirisnim svojstvima tijekom mljevenja i miješenja maslina (Koprivnjak, 2006)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

Kao materijal u ovom je završnom radu korišteno samljeveno tijesto maslina dviju istarskih sorti (rosulja i istarska bjelica) te dviju dalmatinskih sorti (levantinka i oblica). Masline su brane u 3 roka berbe. Datumi berbe i pripadajući indeksi zrelosti za sve istraživane sorte maslina prikazani su u tablici 2. (Uceda i Frias, 1975). Odmah nakon branja, masline su očišćene od lišća i grančica, oprane te samljevene na mlinu čekićaru (MM-100) koji je sastavni dio Abencor pilot-uljare (*MC2 Ingeniería y Sistemas S.L., Sevilla, Španjolska*). 25 g samljevenog tijesta stavljeno je u tankom sloju zip vrećicu te brzo smrznuto uranjanjem u tekući dušik. Tijesto je do analiza čuvano na -20 °C.

Tablica 2. Datum berbe i indeks zrelosti korištenih plodova maslina

SORTA	1. ROK		2. ROK		3. ROK	
	DATUM BERBE	INDEKS ZRELOSTI	DATUM BERBE	INDEKS ZRELOSTI	DATUM BERBE	INDEKS ZRELOSTI
OBLICA	28.10.2021.	1,03	2.11.2021.	2,10	11.11.2021.	3,45
LEVANTINKA	28.10.2021.	1,08	3.11.2021.	2,91	11.11.2021.	4,78
ROSULJA	28.10.2021.	2,56	3.11.2021.	2,89	11.11.2021.	3,72
ISTARSKA BJELICA	28.10.2021.	0,48	3.11.2021.	2,11	16.11.2021.	3,04

##### 3.1.1. Reagensi

- Triton (Sigma-Aldrich)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Fenil metansulfonilfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich)
- Benzamid (Sigma-Aldrich)
- D-norleucin (Alfa Aesar)
- Natrijev dihidrogen fosfat (Kemika)
- Bezvodni dinatrijev fosfat (Kemika)

- Klorovodična kiselina HCL(37 % v/v) (Ficher Scientific)
- Heksan (Kemika)
- 2-propanol (Kemika)
- BHT reagens (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril (Kemika)
- Linolenska kiselina (Sigma Aldrich)
- Tween 20 (Fluka)
- Natrijev hidroksid (NaOH) (1 mol/L)
- Coomasie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich)
- 95 % etanol (Kemika)
- 85 % fosfatna kiselina (Carlo Erba Reagens)
- 13(S)-hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienske kiseline (Larodan)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprema otopina

- Fosfatni pufer pH 6,7 – za pripremu 500 ml fosfatnog pufera pH 6,7 potrebno je na analitičkoj vagi odvagati 3,1879 g natrijeva dihidrogen fosfata te 4,065 g bezvodnog natrijeva fosfata. Izvagane kemikalije prenijeti u laboratorijsku čašu i otopiti u destiliranoj vodi. Tako priređenoj otopini treba izmjeriti pH vrijednost pomoću uređaja za mjerenje pH. Po potrebi dodati kapaljkom par kapi HCL-a ili NaOH ovisno o tome treba li spustiti vrijednost pH ili ju povećati. Kada se postigne pH 6,7 dobivena otopina prenosi se preko staklenog lijevka u odmjernu tikvicu i dopuni se do oznake destiliranom vodom.
- otopina za ekstrakciju lipoksigenaze – za pripremu 500 ml otopine za ekstrakciju na analitičkoj vagi treba izvagati 0,07306 g EDTA, 0,00435 g PMSF, 0,00300 g benzamida i 0,16396 g D-norleucina. Izvagane kemikalije prebaciti u odmjernu tikvicu te pomoću pipete dodati 0,25 ml tritona. U odmjernu tikvicu doliti fosfatni pufer pH 6,7 do oznake te prebaciti odmjernu tikvicu na ultrazvučnu kupelj kako bi se sve kemikalije u potpunosti otopile



- Fosfatni pufer pH=6,0 –za pripremu 500 ml fosfatnog pufera pH 6,0 potrebno je na analitičkoj vagi odvagati 6,7322 g natrijeva dihidrogen fosfata i 0,82184 g bezvodnog dinatrijeva fosfata. Izvagane kemikalije otopiti u laboratorijskoj čaši dodatkom destilirane vode. Pomoću uređaja za mjerenje pH treba postići vrijednost pH 6,0 dodatkom par kapi HCL-a ili NaOH ovisno o tome treba li otopini povećati/smanjiti kiselost. Dobivenu otopinu preko staklenog lijevka preliterati u odmjernu tikvicu i dopuniti ju destiliranom vodom do oznake.
- Supstrat  $\alpha$ -linolenska masna kiselina priprema metodi Axelrod i sur. (1981). U 5 ml vode u koju se prethodno uvodi dušik doda se 192  $\mu$ l linolne kiseline i 256  $\mu$ l Tween 20. Sadržaj se pažljivo miješa pazeći da se ne zapjeni, a otapanje emulzije se pospješi dodatkom 600  $\mu$ l natrijeva hidroksida(1mol/L) te se odmjerna tikvica od 25 ml nadopuni vodom koja je propuhana dušikom do oznake. Dobivena otopina razdijeli se u alikvote te se pohrani na -80 °C.
- Bradfordov reagens – priprema: priprema se otapanjem sljedećih kemikalija u destiliranoj vodi: u odmjernu tikvicu od 500 ml dodaje se 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 ml 95% EtOH, 50 ml 85% fosfatne kiseline te destilirana voda do oznake

### 3.2.2. Izolacija lipoksigenaze iz maslinova tijesta

Izolacija lipoksigenaze provedena je prema metodi Luaces i sur. (2005). 5 g netom odmrznutog tijesta izvaže se u plastičnu kivetu od 50 mL te se doda 20 mL otopine za ekstrakciju. Smjesa se homogenizira u 2 ciklusa po 60 sekundi na homogenizatoru (GLH 850, OMNI International, Kennesow, SAD) s brzinom 11000 o/min. Između ciklusa pauzira se 60 sekundi. Nakon provedene homogenizacije, uzorak se filtrira pomoću Buchnerovog lijevka preko duplog sloja Miracloth filter papira pod vakuumom. Dobiveni filtrat skuplja se u plastičnu vijalu. I izolacija enzima i filtracija dobivenog ekstrakta provedeni su u ledenoj kupelji. Profiltriran ekstrakt dodatno se pročisti centrifugiranjem na 27000 g kroz 30 minuta na temperaturi od 4 °C koristeći centrifugu ROTINA 420R, Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, Njemačka. Supernatant nakon centrifugiranja korišten je kao sirovi ekstrakt za određivanje aktivnosti lipoksigenaze.

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze spektrofotometrijskom metodom

Ekstrakt enzima, fosfatni pufer pH=6,0 i supstrat se prije određivanja aktivnosti enzima stave na 30 minuta u vodenu kupelj zagrijanu na 25 °C kako bi se istemperirali na temperaturu određivanja. Za određivanje aktivnosti enzima korištena je modificirana metoda koja je objavljena u radu Luaces i sur. (2005).

Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti lipoksigenaze sastoji se od 3,763 mL fosfatnog pufera pH=6,0 ( $c=0,1$  mol/L), 50  $\mu$ L supstrata ( $\alpha$ -linolenske masne kiseline) i 50  $\mu$ L enzimskog ekstrakta. Epruveta u kojoj se priprema reakcija snažno protrese se 10 sekundi na vorteksu, a nakon točno 1 minutu temperiranja na 25 °C izmjeri se apsorbancija pri 234 nm na spektrofotometru (UviLine 9000 SECOMAM). Paralelno se izmjeri i apsorbancija slijepih proba. Jedna koja predstavlja apsorbanciju samog enzimskog ekstrakta i sastoji se od 3,813 mL fosfatnog pufera pH=6,0 ( $c=0,1$  mol/L) i 50  $\mu$ L ekstrakta enzima i druga koja predstavlja apsorbanciju otopine supstrata i sastoji se od 3,763 mL fosfatnog pufera pH=6,0 ( $c=0,1$  mol/L), 50  $\mu$ L otopine za ekstrakciju i 50  $\mu$ L supstrata. Nakon mjerenja, otopine su se temperirane dodatnih 30 minuta na 25 °C te su ponovno izmjerene apsorbancije na 234 nm. Iz dobivenih apsorbancija izračuna se apsorbancija nastalih hidroperoksida prema formuli [1].

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

Gdje je :

- $\Delta A$  – apsorbancija nastalih hidroperoksida
- $A_1$  – apsorbancija reakcijske smjese
- $A_2$  – apsorbancija enzimskog ekstrakta
- $A_3$  – apsorbancija supstrata

Iz izračunate apsorbancije hidroperoksida, izračunata je koncentracija nastalih hidroperoksida uzimajući u obzir molarni ekstincijski koeficijent od  $2,5 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> prema formuli [2].

$$c(\text{hidroperoksida}) = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l} \cdot 1000 \quad [2]$$

Gdje je

- $c(\text{hidroperoksida})$  – koncentracija hidroperoksida (mmol/L)
- $\Delta A$  – apsorbancija hidroperoksida pri 234 nm
- $\epsilon$  – molarni ekstincijski koeficijent ( $2,5 \cdot 10^4$  L/mol cm)
- $l$  – širina kivete (1 cm)

Aktivnost enzima izražena je kao količina produkta ( $\mu\text{mol}$ ) koju proizvede 1 mg enzima i izračuna se prema formuli [3]. Točna koncentracija proteina u otopini lipoksigenaze određena je metodom po Bradford-u (opisanoj u potpoglavlju 3.2.5.).

$$AE = \frac{c(\text{hidroperoksid}) \cdot V_{RS}}{\gamma(\text{proteina}) \cdot V} \quad [3]$$

Gdje je:

- AE – aktivnost enzima ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )
- $c(\text{hidroperoksid})$  – koncentracija nastalih hidroperoksida ( $\text{mmol}$ )
- $V_{RS}$  – ukupni volumen reakcijske smjese ( $\text{mL}$ )
- $\gamma(\text{proteina})$  – koncentracija proteina u otopini enzima ( $\text{mg}/\text{mL}$ )
- $V$  – volumen enzimskog ekstrakta korišten u reakciji ( $\text{mL}$ )

#### 3.2.4. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze HPLC metodom

Za određivanje aktivnosti lipoksigenaze pomoću HPLC metode korištena je modificirana metoda Soldo (2016). Ekstrakt enzima, fosfatni pufer  $\text{pH}=6,0$  ( $c=0,1 \text{ mol}/\text{L}$ ) i supstrat se također prije provođenja reakcije istemperiraju 30 minuta u vodenoj kupelji zagrijanoj na  $25^\circ\text{C}$ . Reakcijska smjesa koja sadrži 4 mL fosfatnog pufera, 500  $\mu\text{L}$  ekstrakta enzima i 500  $\mu\text{L}$  supstrata miješa se na magnetskoj miješalici 30 minuta pri stalnoj temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ . Nakon 30 min reakcija se zaustavlja dodatkom 5 kapi klorovodične kiseline ( $1 \text{ mol}/\text{L}$ ) kako bi se  $\text{pH}$  reakcijske smjese snizio na 2. U reakcijsku smjesu dodaje se 1 mL otopine butilhidroksitoluena (BHT) koncentracije  $0,25 \text{ mmol}/\text{L}$  kao internog standarda koji nam služi za praćenje uspješnosti izolacije hidroperoksida. BHT se koristi kao interni standard jer apsorbira na 234 nm, a njegova hidrofobna svojstva slična su onima koje posjeduju hidroperoksidi.

Ekstrakcija formiranih hidroperoksida provodi se dodatkom 10 ml otapala za ekstrakciju hidroperoksida (heksan/ izopropanol = 95/5). Smjesa se snažno protrese 1 minutu na vorteksu, a epruveta se ostavi da se razdvoje faze (gornji sloj organskog otapala i donji vodeni sloj). Ekstrakcija hidroperoksida se ponovi još 2 puta. Nakon treće ekstrakcije, kako bi došlo do potpunog odvajanja organske i vodene faze, smjesa se centrifugira 10 minuta na 5000 o/min. Organski slojevi od sve tri ekstrakcije se spoje, otapalo se otpari pri sniženom tlaku i  $40^\circ\text{C}$  koristeći rotavapor (Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Njemačka) do volumena 2 mL, ostatak se prebaci u vijalicu te otpari do suha u struji dušika. Upareni ostatak može se čuvati na  $-20^\circ\text{C}$  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.

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<sup>-1</sup> kroz čitavo vrijeme trajanja analize, a korišteni gradijent prikazan je u tablici 3. U sustav je injektirano 10 μL pripremljenog uzorka hidroperoksida. Kromatogrami su snimljeni pomoću DAD detektora (Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, SAD) na 234 nm uz bandwidth (širinu pojasa) od 8 nm te korekciju pri referentnoj valnoj duljini od 350 nm, bandwidth 50 nm. Čitavo vrijeme analize snimani su UV spektri od 190 do 400 nm.

Tablica 3. Prikaz promjene gradijenta otapala B (acetonitril) u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine B (%)
0	63
17	63
20	80
32	80
35	63
45	63

Za identifikaciju hidroperoksida korišten je komercijalno dostupan standard 13(S)-hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienske kiseline (hidroperoksid linolenske masne kiseline - HPOT) koji je injektiran pod istim uvjetima kao i uzorci uz BHT kao standard (slika 6.). Množine formiranih hidroperoksida izražene u μmol zračunate su iz površina ispod pikova detektiranih hidroperoksida prema formulama [4] do [7] a aktivnost enzima izražena u μmol/mg izračunata je formuli [8].

$$n(\text{hidroperoksida}) = \frac{\Sigma A \times RRF_{BHT/HPOT} \times n_{BHT}}{A_{BHT}} \quad [4]$$

gdje je:

- n (hidroperoksida) – množina formiranih hidroperoksida (μmol)
- ΣA – suma površina ispod pikova hidroperoksida
- A<sub>BHT</sub> - površina ispod pika BHT-a
- n<sub>BHT</sub> – množina BHT-a (μmol) dodanog u uzorak 1 mL otopine internog standarda

- $RRF_{BHT/HPOT}$  – korekcijski faktor za izražavanje rezultata preko hidroperoksida linolenske masne kiseline (HPOT) (formula [5])

$$RRF_{BHT/HPOT} = \frac{RF_{1\mu mol}(BHT)}{RF_{1\mu mol}(HPOT)} \quad [5]$$

gdje je

- $RF_{1\mu mol}(BHT)$  – faktor odziva BHT-a koji se računa po formuli [6]

$$RF_{1\mu mol}(BHT) = \frac{\text{površina pika BHT}}{\mu\text{mol injektiranog BHT}} \quad [6]$$

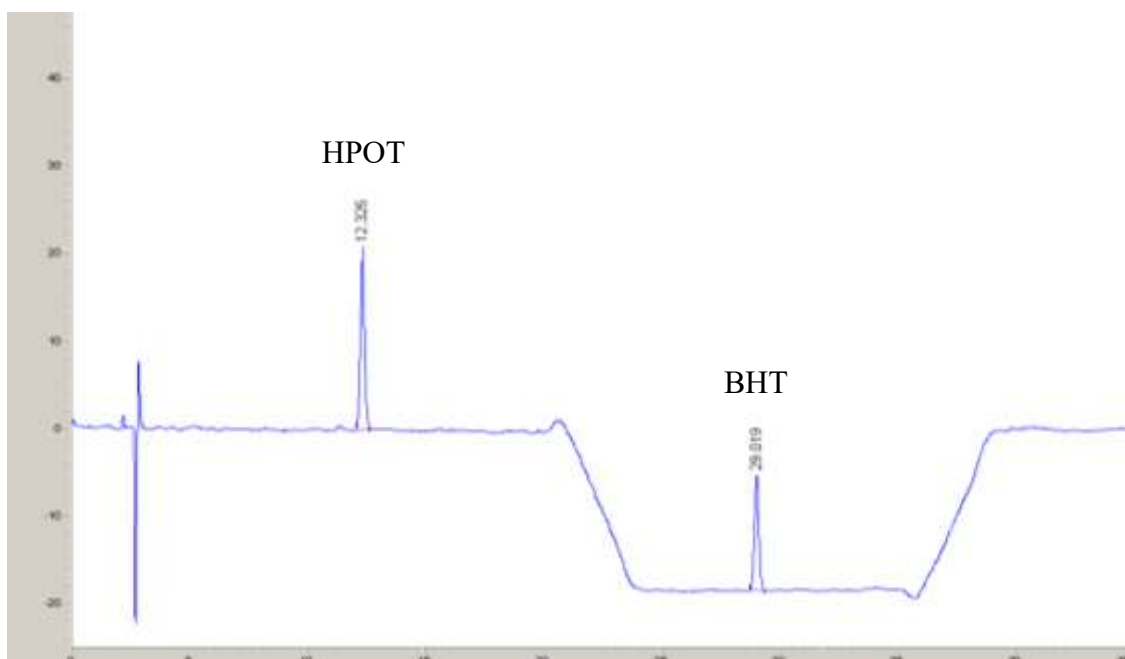
- $RF_{1\mu mol}(HPOT)$  - faktor odziva HPOT koji se računa po formuli [7]

$$RF_{1\mu mol}(HPOT) = \frac{\text{površina pika HPOT}}{\mu\text{mol injektiranog HPOT}} \quad [7]$$

$$AE = \frac{n(\text{hidroperoksid})}{\gamma(\text{proteina}) * V} \quad [8]$$

Gdje je:

- AE – aktivnost enzima ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )
- $n(\text{hidroperoksida})$  – koncentracija nastalih hidroperoksida (mmol)
- $\gamma(\text{proteina})$  – koncentracija proteina u otopini enzima (mg/mL)
- V – volumen enzimskog ekstrakta korišten u reakciji (mL)



Slika 6. Kromatogram 13(S)-hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienolne kiseline (HPOT) uz BHT kao interni standard

### 3.2.5. Određivanje proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi opisanoj u diplomskom radu Vujnović (2021). Ukratko, u polimernu semimikro kivetu otpipetirano je 0,3 mL ekstrakta enzima i dodano 1,2 mL Bradfordovog reagensa. Kiveta se poklopi, a sadržaj kivete dobro promiješa i nakon 5 minuta mjeri apsorbancija pri 595 nm uz slijepu probu. Bitno je da očitana apsorbancija bude u rasponu od 0,2 do 1,0.

Za izračun koncentracije proteina izrađena je baždarna krivulja [9] pomoću standardnih otopina albumina goveđeg seruma u koncentracijama od 0,005 do 0,5 mg mL<sup>-1</sup>

$$\gamma(\text{proteina}) = \frac{A+0,0436}{13,7292} \quad [9]$$

gdje je

- $\gamma(\text{proteina})$  – masena koncentracija proteina (mg mL<sup>-1</sup>)
- A – apsorbancija otopine proteina pri 595 nm

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

### 3.2.6. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu dobivenih podataka korištena je Two Factor – ANOVA analiza koja ispituje utjecaj dvije različite neovisne varijable (u ovom slučaju, sorta masline i rok berbe) na jednu ovisnu varijablu (aktivnost LOX enzima). Cilj ovakve statističke obrade je procjena ukupnog utjecaja pojedine varijable te utjecaja njihove međusobne interakcije na ispitivanu varijablu. Ako je vrijednost F u tablici statističke obrade veća od vrijednosti  $F_{\text{kritično}}$  tada neovisne varijable imaju značajan utjecaj na ovisnu.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu provodilo se mjerenje aktivnosti lipoksigenaze u enzimskim ekstraktima iz tijesta 4 sorte maslina pobranih u tri roka berbe. Mjerenje aktivnosti provodilo se u enzimskom ekstraktu primjenom spektrofotometrijske metode i metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). U obje metode izvele su se izolacije lipoksigenaze iz maslinovog tijesta. Rezultati aktivnosti LOX prikazani su u tablicama kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije, a provedena je i statistička obrada.

### 4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA

U tablicama 4-6 su navedene aktivnosti enzima lipoksigenaze izražene kao srednja vrijednost od 4 ponavljanja uz standardnu devijaciju. U tablici 7 prikazani su rezultati statističke obrade podataka iz tablica 4-6.

Tablica 4. Aktivnost enzima LOX kod sorti maslina branih u 1. roku berbe ( $\mu\text{mol/mL}$ )

SORTA	AKTIVNOST 1 MIN	AKTIVNOST 30 MIN
LEVANTINKA	$3,86\pm 2,28$	$2,85\pm 2,23$
ROSULJA	$0,52\pm 0,49$	$0,29\pm 0,53$
OBLICA	$1,74\pm 0,93$	$1,73\pm 0,99$
ISTARSKA BJELICA	$0,78\pm 0,99$	$0,83\pm 0,94$

Tablica 5. Aktivnost enzima LOX kod sorti maslina branih u 2. roku berbe ( $\mu\text{mol/mL}$ )

SORTA	AKTIVNOST 1 MIN	AKTIVNOST 30 MIN
LEVANTINKA	$1,26\pm 0,86$	$0,77\pm 0,43$
ROSULJA	0	0
OBLICA	0	0
ISTARSKA BJELICA	$1,15\pm 1,06$	$0,90\pm 0,89$

Tablica 6. Aktivnost enzima LOX kod sorti maslina branih u 3. roku berbe ( $\mu\text{mol/mL}$ )

SORTA	AKTIVNOST 1 MIN	AKTIVNOST 30 MIN
LEVANTINKA	$1,04\pm 1,01$	$1,46\pm 1,09$
ROSULJA	$0,66\pm 0,38$	$0,65\pm 0,41$
OBLICA	$1,14\pm 0,89$	$1,33\pm 0,61$
ISTARSKA BJELICA	$0,98\pm 0,69$	$0,87\pm 0,74$



U tablici 7. prikazani su rezultati statističke obrade podataka za aktivnost lipoksigenaze.

Tablica 7. Rezultati statističke obrade podataka za aktivnost lipoksigenaze nakon 1 minute reakcije određeni pomoću Two-Factor ANOVA-e

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-vrijednost</i>	<i>F crit</i>
Sorta	20,80812	3	6,93604	7,340582	0,000582	2,866266
Rok berbe	10,54032	2	5,270158	5,577539	0,007761	3,259446
Interakcija	13,12424	6	2,187373	2,314951	0,054204	2,363751

Iz dobivenih rezultata za aktivnost enzima lipoksigenaze (LOX) primjećuje se kako aktivnost enzima u 1. roku berbe kod sorti levantinka i oblica postiže najveću vrijednost, dok se kod sorti rosulja i istarska bjelica najveća aktivnost postiže u 3. roku berbe. Prema indeksima zrelosti navedenim u tablici 3. sorte rosulja i levantinka pokazuju najveću zrelost u prvom roku berbe. U odnosu na to, prilikom mjerenja aktivnosti primjećuje se da levantinka ima najveću aktivnost u 1. roku berbe, ali kod ostalih sorti nije zamijećena korelacija s indeksom zrelosti. Ovisno o trajanju reakcije, na temelju tablica 4-6 aktivnost enzima nema značajnu razliku nakon jedne i nakon 30 minuta. Nepromjenjivost aktivnosti može biti uzrokovana zbog male količine LOX u reakcijskoj smjesi ili zbog činjenice da su nastali hidroperoksidi vrlo nestabilni te se raspadaju na sekundarne produkte. Promatrajući ovisnost enzimske reakcije o koncentraciji enzima, zamjećuje se da je koncentracija enzima značajan parametar koji diktira aktivnost enzima (Vujnović, 2021). Moguće objašnjenje za nižu aktivnosti LOX također može biti inhibicijski učinak fenolnih spojeva na enzim. Majetić Germek i sur. (2013) su proučavali utjecaj egzogenih fenolnih spojeva iz ploda masline na sintezu hlapljivih tvari u DMU. Dodatkom fenolnih spojeva u maslinovo tijesto sorte buža, značajno se smanjio maseni udio *Z*-3-heksenala i heksenala, te *E*-2-heksenola i heksanola. Moguće objašnjenje snižavanja vrijednosti udjela navedenih C6 aldehida i alkohola, ovi autori vide u nižoj aktivnosti LOX enzima, što za posljedicu ima usporavanje cijelog LOX puta. Iz F vrijednosti u tablici statističke obrade podataka, može se zaključiti da sorta masline i rok berbe imaju značajan utjecaj na aktivnost LOX. Takav rezultat potvrđuju i znanstvenici Palmieri-Thiers i sur. (2009) čiji rezultati istraživanja aktivnosti LOX enzima tijekom razvoja i zrenja ploda masline, provedenog na četiri sorte, sabina (Korzika), germaine (Korzika), leccino (Italija) i arbequina (Španjolska), bilježili su očekivane razlike enzimske aktivnosti lipoksigenaze u pojedinim sortama. Najviša aktivnost izmjerena je u sorti leccino (783 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), slijede arbequina (549 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) i sabina (554 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), te germaine (217 nmol

min-1 mg-1). Navedene su sorte u različito vrijeme dosegle maksimalnu enzimsku aktivnost, ali značajno je da je najviši porast enzimske aktivnosti kod ispitivanih sorti zabilježen u fazi zrenja kada se boja ploda mijenja iz zeleno-žute u crveno-ljubičastu. Budući da su sorte uzgojene u istom nasadu, a plodovi brani u istoj fazi razvoja (stupnju zrelosti), razlike u enzimskoj aktivnosti mogu se pripisati sortnim karakteristikama.

Statistička obrada rezultata aktivnosti lipoksigenaze u tijestu levantinke, rosulje, oblice i istarske bjelice određene spektrofotometrijskom metodom, pokazala je da i sorta i rok berbe imaju statistički značajan utjecaj na aktivnost LOX na razini  $p \leq 0,01$ , a njihova međusobna interakcija je statistički značajna na razini  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2. HPLC ANALIZA

S obzirom na to da rezultati postignuti spektrofotometrijskom metodom nisu naročito pouzdani zbog visokih vrijednosti standardne devijacije, isprobana je i druga metoda određivanja LOX aktivnosti, HPLC metoda. Nakon što su uzorci pušteni na HPLC analizu, iz dobivenih kromatograma izračunava se aktivnost enzima lipoksigenaze u pojedinom uzorku kao što je opisano u poglavlju 3.2.4. Rezultati su prikazani u tablici 8., a u tablici 9. prikazani su rezultati statističke obrade podataka.

Tablica 8. Aktivnosti enzima lipoksigenaze mjerenih HPLC metodom izraženi u  $\mu\text{mol/mg}$  proteina

SORTA	1.ROK	2.ROK	3.ROK
LEVANTINKA	300,56±21,00	209,17±47,69	211,68±46,79
ROSULJA	370,83±35,40	147,33±25,53	164,48±26,16
OBLICA	153,70±52,05	184,56±36,17	191,89±44,48
ISTARSKA BJELICA	184,32±12,21	239,71±67,62	204,39±16,78

Tablica 9. Rezultati statističke obrade podataka za aktivnost lipoksigenaze određeni pomoću Two-Factor ANOVA-e

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-vrijednost	F crit
Sorta	8775,118	3	2925,039	1,715721	0,216762	3,490295
Rok berbe	18353,98	2	9176,991	5,382888	0,021448	3,885294
Interakcija	62731,81	6	10455,3	6,132697	0,003863	2,99612

Rezultati iz tablice 8. pokazali su da je u maslinama sorti Levantinka i Rosulja LOX imala maksimalnu aktivnost u 1. roku, kod Istarske bjelice u 2. roku a kod Oblice u 3. roku berbe. Vrijednosti standardne devijacije su mnogo manji no u tablicama 4-6, no ipak će se u daljnjim fazama Projekta provesti validiranje metode kako bi se ispitalo je li pouzdana za provođenje ovih analiza. U Tablici 9 vidi se da na aktivnost LOX statistički značajan utjecaj ima samo rok berbe ( $p \leq 0,05$ ), a sorta ne. Ipak, interakcija sorte i roka berbe značajno utječe na aktivnost ovog enzima na razini  $p \leq 0,01$ .

#### **4.3. USPOREDBA SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE I HPLC METODE**

Nakon obrade podataka objema metodama, dobiveni rezultati su u korelaciji samo za dva uzorka, masline iz levantinke i iz istarske bjelice. Kao što je navedeno, u obje metode na aktivnost LOX enzima utjecaj ima rok berbe te interakcija roka berbe i sorte maslina. HPLC metoda je selektivnija od UV spektrofotometrije jer se njome precizno detektiraju hidroperoksidi u ispitivanom uzorku, dok se kod spektrofotometrijske metode uz sam enzim LOX apsorbiraju i fenoli i ostali spojevi koji apsorbiraju na 234 nm. Kod spektrofotometrijske metode zabilježene su i niže vrijednosti za aktivnost, koje su uzrokovane manjom količinom enzima, ali ta vrijednost dodatkom dodatne količine enzima niti ne može biti puno veća jer se prilikom pripreme uzorka, priprema i jedna od 2 slijepe probe koja u svojoj reakcijskoj smjesi sadrži enzim. Vrijednosti za aktivnost enzima, prikazane kao koncentracija, su kod HPLC metode jako visoke iz razloga što se u reakcijsku smjesu za pripremu uzorka za HPLC analizu dodaje veća količina enzima. Veća količina enzima dovoljna je za formiranje veće količine hlapljivih spojeva.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Primjenom obje metode pokazalo se da je aktivnost lipoksigenaze najveća u maslinama sorte Levantinka i to pri stupnju zrelosti 1,08 (1.rok berbe).
2. Statistička obrada rezultata i spektrofotometrijske i HPLC pokazala je da stupanj zrelosti ploda (rok berbe) ima značajan utjecaj na aktivnost lipoksigenaze, te da na nju djeluje i interakcija sorte i roka berbe
3. Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) je pouzdanija od spektrofotometrijske, no potrebno ju je validirati kako bi se pokazalo je li prikladna za određivanje aktivnosti lipoksigenaze u tijestu maslina.

## 6. POPIS LITERATURE

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

Bitonti MB, Chiapetta A, Innocenti AM, Muzzalupo I, Ucella N (2000) Funzionalità e distribuzione dei biofenoli nella di *Olea europea* L. *Olivo & Olio* **1-2**, 20-29.

Brash AR (1999) Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *J Biol Chem* **34**, 23679-23682. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23679>

Castelli F, Muzzalupo I, Saija A, Tomaino A, Uccella N (1999) I biofenoli nelle olive e nell'olio per il benessere dell'uomo. *Olivo & Olio* **9**, 48-61.

Elezović D (1980) Praktično maslinarstvo, NITRO Slobodna Dalmacija, Split.

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

Hbaieb RH, Kotti F, Garcia-Rodriguez R, Gargouri M, Sanz C, Perez AG (2014) Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: correlation with virgin olive oil phenolic profiles. *Food Chem* **174**, 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.033>

Koprivnjak O, Majetić V, Brkić Bubola K, Kosić U (2012) Phenolics and Volatiles in Istrian Virgin Olive Oil. *Food Technol Biotechnol* **50**, 216-221.

Koprivnjak O (2006) Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, 1. izd., MIH, Poreč, str.7-12, 33-39.

Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2021) Maslina U: Hrvatska enciklopedija. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=39294>. Pristupljeno 7. srpnja 2022.

Luaces P, Garcia Pérez A, Garcia JM, Sanz C (2005) Effects of heattreatments of olive fruit on pigment composition of virgin olive oil. *Food Chem* **90**, 169-174.

Luaces P, Sanz C, Garcia Pérez A (2007) Thermal stability of lipoxygenase and hydroperoxide lyase from olive fruit and repercussion on olive oil biosynthesis. *J Agric Food Chem* **55**, 6309-6313.

Majetić Germek V, Koprivnjak O, Butinar B, Pizzale L, Bučar-Miklavčič M, Conte SL (2013) Influence of Phenols Mass Fraction in Olive (*Olea europaea* L.) Paste on Volatile Compounds in Buža Cultivar Virgin Olive Oil. *J Agric Food Chem* **61**, 5921-5927. <https://doi.org/10.1021/jf400692m>

Nergiz C, Engez, Y (2000) Compositional variation of olive fruit during ripening. *Food Chem* **69**, 55–59. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00238-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00238-1)

Palmieri-Thiers C, Canaan S, Brunini V, Lorenzi V, Tomi F, Desseyn JL i sur. (2009) A lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea* L.) during ripening. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1791**, 339-346. [ff10.1016/j.bbalip.2009.02.012](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.012). [ffhal-00593598f](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.012)

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

Šarolić M, Gugić M, Marjanović Z, Šuste M (2014) Virgin olive oil in nutrition. *Hrana u zdravlju i bolesti* **3**, 38-43.

Škevin D (2016) Kemija i tehnologija ulja i masti (interna skripta), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 61-69.

Uceda M, Frias L (1975) Harvest dates. Evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality. U: Proceedings of the Del Segundo Seminario Oleicola Internacional IOC, Cordoba, Spain, str. 125–128.

Vujnović A (2021) Endogeni enzimi ploda masline (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

## Izjava o izvornosti

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

A handwritten signature in black ink, reading "Iva Budimir", written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal line.

Vlastoručni potpis