

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

**Mia Tokić
0058218250**

**UTJECAJ UBRZANOG TOPLINSKOG TRETMANA
NA AKTIVOST LIPOKSIGENAZE U MASLINAMA
SORTI BJELICA I LEVANTINKA**

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, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana na aktivnost lipoksigenaze u maslinama sorti bjelica i levantinka

Mia Tokić, 0058218250

Sažetak:

Lipoksigenaza je važan endogeni enzim koji utječe na senzorske karakteristike djevičanskog maslinovog ulja. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana, kao predtretmana miješenja, na aktivnost enzima lipoksigenaze u tijestu maslina sorti bjelice i levantinke. Aktivnost lipoksigenaze je određena mjerenjem koncentracije hidroperoksida masne kiseline HPLC metodom. Pokazalo se da ubrzani toplinski tretman ne povećava aktivnost lipoksigenaze kod sorte bjelica, dok je lipoksigenaza sorte levantinka svoju najveću aktivnost imala primjenom ubrzanog toplinskog tretmana pri 15 °C. Statistička obrada potvrdila je značajan utjecaj temperature i njene interakcije sa sortom i provedenim postupkom proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja (s ili bez miješenja) na aktivnost lipoksigenaze.

Ključne riječi: Djevičansko maslinovo ulje, lipoksigenaza, miješenje, ubrzani toplinski tretman, hrvatske sorte maslina

Rad sadrži: 27 stranica, 4 slike, 4 tablice, 19 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: izv.prof.dr.sc. Klara Kraljić, Katarina Filipan, mag. ing. techn. aliment.

Datum obrane: 10. srpnja 2023.

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

Influence of flash thermal treatment on lipoxygenase activity in olives of Bjelica and Levantinka varieties

Mia Tokić, 0058218250

Abstract:

Lipoxygenase is an important endogenous enzyme affecting virgin olive oil's sensory characteristics. The aim of this study was to examine the influence of flash thermal treatment, as a pre-treatment of the malaxation phase, on the activity of lipoxygenase enzyme in the dough of olives of the Bjelica and Levantinka varieties. Lipoxygenase activity was determined by measuring fatty acid hydroperoxide concentration using the HPLC method. It showed that flash thermal treatment does not increase lipoxygenase activity in the Bjelica variety while the lipoxygenase of the Levantinka variety had its highest activity at 15 °C. Statistical analysis confirmed the significant influence of temperature and its interaction with the variety and the virgin olive oil production process (with or without malaxation) on lipoxygenase activity.

Keywords: virgin olive oil, lipoxygenase, malaxation, flash thermal treatment, Croatian varieties of olives

Thesis contains: 27 pages, 4 figures, 4 tables, 19 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: Klara Kraljić, Associate Professor, Katarina Filipan, mag. ing. techn. aliment

Thesis defended: June 10, 2023

SADRŽAJ

1	UVOD.....	2
2	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1	MASLINA.....	3
2.2	PRIPREMA I PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA.....	4
2.3	ENDOGENI ENZIMI	7
2.4	INOVATIVNE TEHNOLOGIJE	10
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1	MATERIJALI.....	11
3.1.1	REAGENSI	12
3.2	METODE RADA	13
3.2.1	PRIPREMA OTOPINA	13
3.2.2	EKSTRAKCIJA LIPOKSIKGENAZE	14
3.2.3	ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPOKSIKGENAZE HPLC METODOM.....	15
3.2.4	POSTUPAK ODREĐIVANJA PROTEINA METODOM PO BRADFORDU.....	17
3.2.5	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	18
4	REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1	HPLC ANALIZA	19
5	ZAKLJUČCI.....	24
6	POPIS LITERATURE	25

1 UVOD

Iz ploda masline, mehaničkim postupcima, dobiva se djevičansko maslinovo ulje (DMU) koje odlikuje intenzivnim mirisima i okusima te ima pozitivan utjecaj na zdravlje. Osim što ima pozitivan utjecaj na zdravlje koristi se za pripremu macerata te u proizvodnji kozmetičkih proizvoda. Djevičanska maslinova ulja svoj specifičan miris i okus dobivaju iz hlapljivih sastojaka te fenola koji su produkti djelovanja nekih enzima. Među tim enzimima je i lipoksigenaza kao i njen lipoksigenazni put (LOX). Lipoksigenaza se kao membranski enzim nalazi u plodu masline te koristeći linolnu i linolensku nezasićenu masnu kiselinu stvara hlapljive spojeve koji djevičanskom maslinovom ulju daju poželjna senzorska svojstva.

Budući da enzimi znatno utječu na udio i sastav poželjnih hlapljivih i fenolnih tvari, postali su fokus novih istraživanja zajedno sa parametrima koji utječu na njih. Ujedno se istražuju inovativne tehnologije poput ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja i ubrzanog toplinskog tretmana čiji su ciljevi bolja održivost, smanjenje troškova proizvodnje, povećanje iskorištenja proizvodnje te povećanje proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja više nutritivne vrijednosti. Ove sve inovativne metode istražuju se kao predtretman fazi miješenja maslinovog tijesta.

Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je ispitati utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana (UTT), kao predtretmana miješenju, na aktivnost enzima lipoksigenaze u maslinama sorti bjelice i levantinke.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 MASLINA

Maslina (*Olea europaea L.*) pripada zimzelenoj kulturi koja ima razgranato korijenje, debelo stablo i bogate krošnje. Njene podvrste su *Olea europaea sativa L.* (pitoma maslina) i *Olea europaea oleaster L.* (divlja maslina – mastrinka). Danas se maslina najviše uzgaja u zemljama oko Sredozemnog mora (Španjolska, Italija, Grčka, Tunis, Portugal, Turska, Maroko, Alžir). Osnovna podjela maslina po sortama s obzirom na namjenu je: uljne i stolne sorte. Postoje i sorte kombiniranih svojstava koje se mogu koristiti u obje svrhe.

Danas se u Hrvatskoj uzgajaju sljedeće sorte (Elezović, 1980):

- SORTE ZA ULJE: Bjelica, Buža, Drobница, Leccino, Grozdulja, Karbona, Karbunčela, Lastovka, Levantinka, Puljka, Piculja, Rosinjola, Rosulja, Sitnica, Slatka, Šarulja, U-ljarica, Zuzorka, Žutica
- STOLNE SORTE: Dužica, Murgulja
- MJEŠOVITE SORTE: Buža, Karbonera, Oblica, Grozdača, Slivnjača, Mezanica, Želudarica

Istarska bjelica je stara sorta, koja je prenesena iz maslinika Boljunca kod Trsta. Stablo je bujnog rasta, guste krošnje koja ima tendenciju rasta u visinu, primarne grane su duge, uspravne, čvrste s glatkom korom. Nije osjetljiva na niske temperature i vjetar dok je osjetljiva na rose i magle, kada zna odbaciti lišće. Cvjeta krajem svibnja i početkom lipnja, dok resu razvija od ožujka do svibnja (Maslinar, 2022).

Uzgoj Levantinke ograničen je na područje južne i srednje Dalmacije. Ova sorta ima veliki postotak samooplodnje, radi čega Levantinka redovito i obilno rađa. Levantinka razvija veoma bujno stablo. Deblo je visoko i glatko, a krošnja je kuglasta. Levantinka razvija cvat od ožujka do svibnja. Cvatnja se odvija od sredine do kraja mjeseca svibnja (Agroportal, 2019).

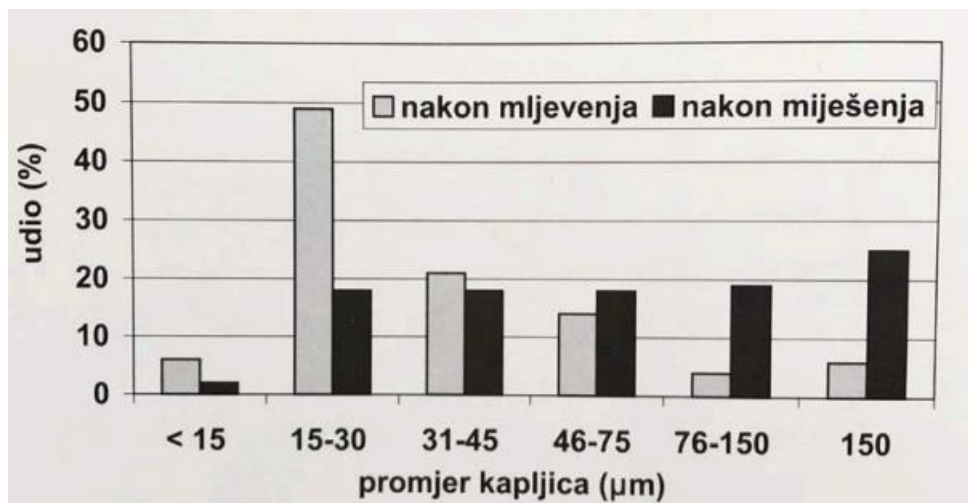
2.2 PRIPREMA I PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Berba je prvi korak prilikom proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja. Masline se beru kada je trećina plodova crne boje, a dvije trećine zelene boje, odnosno kada imaju optimalnu zrelost. Ukratko, branje ploda masline u optimalnoj zrelosti (ili čak i malo prije nje) osigurava postizanje bolje kvalitete ulja, izbjegavanje fiziološkog opadanja plodova, izbjegavanje kasnog napada maslinove muhe i postizanje veće učinkovitosti berača. Skladištenje maslina bi trebalo biti što kraće kako se ne bi odvale kemijske i biokemijske reakcije koje mogu dovesti do kvarenja i degradacije ulja (Škarica, 1996).

Plodovi maslina, prilikom transporta u uljaru, sadrže nečistoće kao što su: lišće, grančice, zemlja i kamenje. Te nečistoće mogu negativno utjecati na kakvoću ulja, oštećivati dijelove strojeva i umanjiti efikasnost ekstrakcije. Stoga je potrebno maslinama odstraniti lišće i grančice usipavanjem u koš kroz rešetku te strujom zraka, dok se ostale nečistoće uklanjaju pranjem maslina.

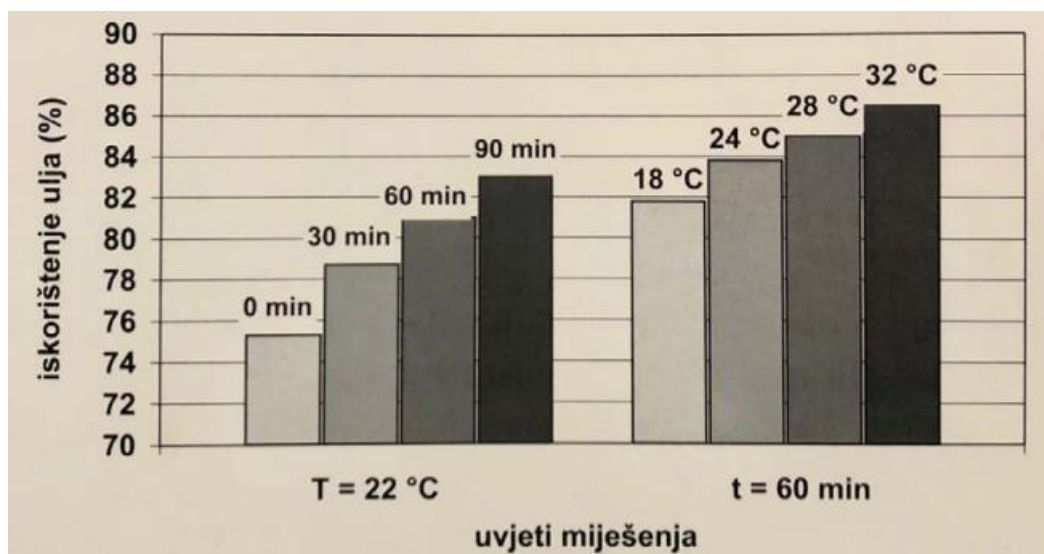
U plodovima maslina ulje se nalazi u vakuoli i manjim djelom u citoplazmi stanice. Kako bi ekstrakcija ulja bila što efikasnija potrebno je u što većoj mjeri razbiti staničnu strukturu. Razbijanje stanične strukture postiže se mljevenjem, koji uključuje i drobljenje koštice masline. Izdrobljena koštica masline je drenažni materijal u samljevenom tijestu koji stvaraju kanaliće i omogućavaju izlazak uljnog mošta. Cilj mljevenja je oslobađanje što više ulja, a da se ulje što manje rasprši u sitne kapljice kako bi se spriječila pojava emulzija. Mljevenje se osim mehaničkog postupka još smatra i kemijski i biokemijski postupak jer specifične tvari koje su sadržane u kožici i sjemenki dolaze u izravan dodir s uljem (klorofili iz kožice, tokoferoli i enzimi iz sjemenki). U procesu mljevenja koriste se kameni ili metalni mlinovi (s diskovima, čekićar, konusni) koji usitnjavaju plodove i tako potiču izdvajanje ulja (Škevin, 2016).

Miješenje je postupak koji slijedi nakon mljevenja i njegov cilj je razbijanje emulzije u što većoj mjeri te ujedinjenje sitnih kapljica ulja u kapljice većih od 30 μm , kako bi se olakšala ekstrakcija ulja (Di Giovacchino i sur., 2002). Slika 1. prikazuje kako se udio kapljica zadovoljavajućeg promjera povećao s 45% na 80% procesom miješenja.



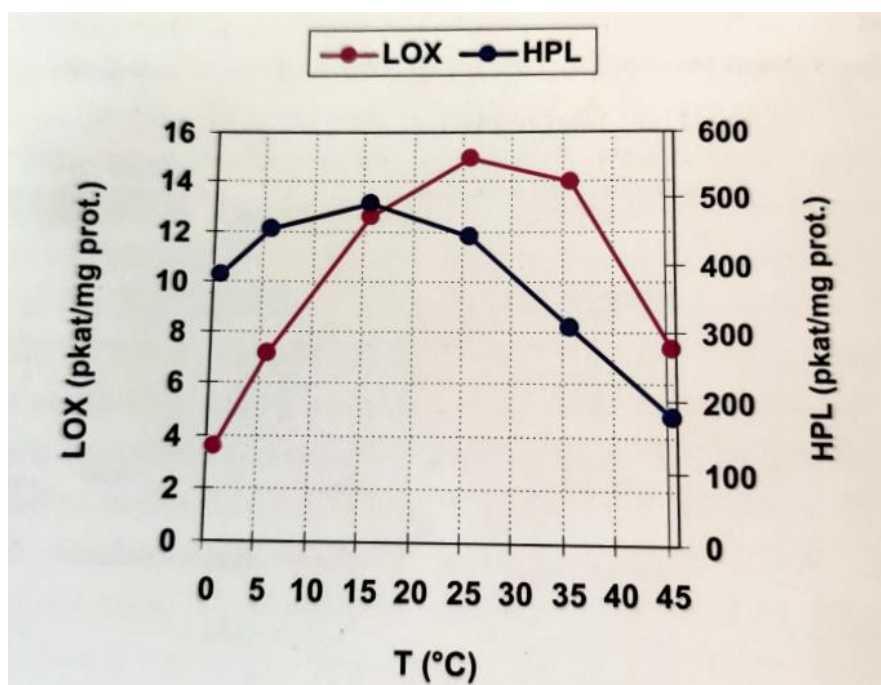
Slika 1. Udio kapljica ulja s obzirom na promjer, nakon mljevenja maslina i miješanja tijesta (Koprivnjak, 2006)

Miješenje tijesta odvija se u seriji od 2 do 3 korita od inoksa s metalnim mješačima i plaštem. Kroz plašt struji topla voda koja se dodaje radi smanjenja viskoznosti maslinovog tijesta. Temperatura vode u plaštu u pravilu mora biti 5-6 °C viša od željene temperature tijesta kako bi se postigla odgovarajuća temperatura tijesta. Na slici 2. prikazano je da je iskorištenje ulja veće dovođenjem topline i produljenjem vremena operacije (Koprivnjak, 2006). Idealni parametri za dobivanje djevičanskog maslinovog ulja visoke kvalitete su: temperatura tijesta manja od 28 °C, te miješenje tijesta u vremenu do 60 minuta.



Slika 2. Utjecaj temperature (T) i vremena (t) miješenja na iskorištenje ulja (Koprivnjak, 2006)

Miješenje je proces koji u najvećem postotku određuje pozitivna ili negativna svojstva ulja. Reakcije od najvećeg interesa za kvalitetu djevičanskog maslinovog ulja su reakcije sa pigmentima, triacilglicerolima i masnim kiselinama te fenolnim tvarima i enzimima. Enzimske reakcije tijekom miješenja su vrlo važne jer njihovom aktivnošću dobivaju se poželjna senzorska svojstva. Jedan od ključnih enzima u procesima nastajanja tvari arome ulja je lipoksigenaza. Lipoksigenaza iz maslina je najaktivnija pri 25 °C, a njeno pH područje je 5,0 - 5,5, koliko obično iznosi i pH samljevenih maslina. Uz lipoksigenazu ključan enzim jest i hidroperoksid liaza. Ovi enzimi zajedno sudjeluju u lipoksigenaznom putu (LOX) te pospješuju nastajanje poželjnih mirisnih tvari ulja. Prilikom miješenja, ako je temperatura tijesta viša od 25 °C te 30 °C, aktivnost lipoksigenaze i hidroperoksid liaze se smanjuju, što je vidljivo na slici 3. Pri višim temperaturama dolazi do nastajanja aldehida i alkohola koji dovode do nepoželjnog mirisa, po upaljenom plodu maslina (Koprivnjak, 2006).



Slika 3. Aktivnost lipoksigenaze (LOX) i hidroperoksid liaze (HPL) u ovisnosti o temperaturama (Koprivnjak, 2006)

Niža temperatura (sprječavanje zagrijavanja) dodatno će pridonijeti povećanju koncentracije poželjnih aroma maslinovog ulja (Koprivnjak i sur., 2012).

Nakon miješenja slijedi separacija ulja. Ulje je moguće odvojiti prešanjem koji se još naziva 'tradicionalni postupak', kontinuiranom centrifugalnom ekstrakcijom i procjeđivanjem. Prešanjem se dobiva komina (pogača) i tekuća faza koja odlazi na separaciju u vertikalnom separatoru te se dobije djevičansko maslinovo ulje i vegetabilna voda. Kontinuirana centrifugalna ekstrakcija odvija se u dekanterima gdje se dobije maslinovo ulje i vegetabilna voda. Procjeđivanje je postupak namijenjen tijestima sa malim udjelom vode (Škevin, 2016).

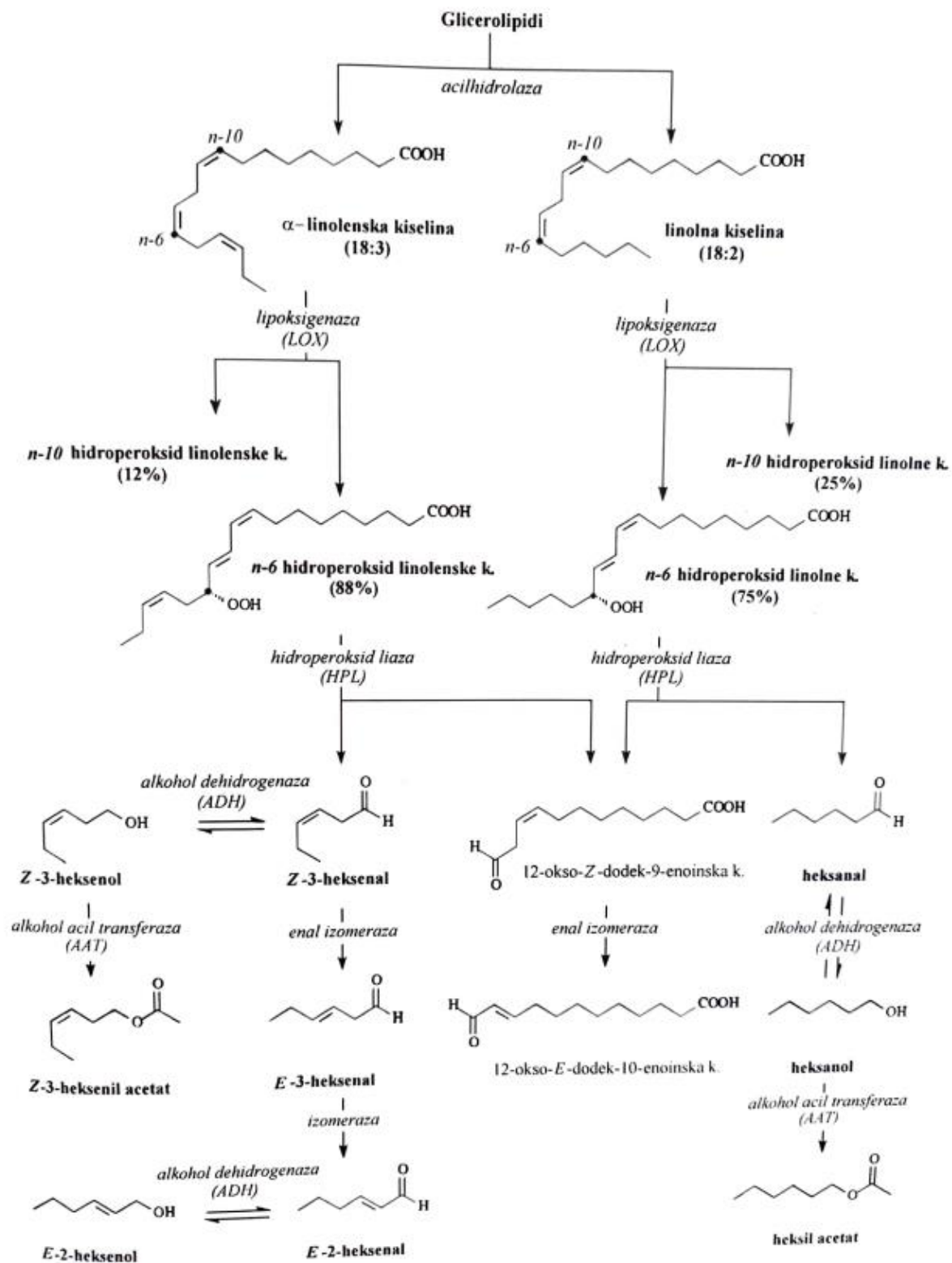
2.3 ENDOGENI ENZIMI

Endogeni enzimi u maslinama imaju veliku ulogu u formiranju mirisnih i okusnih svojstava. Oni se mogu osloboditi narušavanjem strukture tkiva ploda, primjerice uslijed mehaničkih oštećenja tijekom berbe, napada mikroorganizama tijekom procesa skladištenja ili uslijed mehaničkih oštećenja tijekom same ekstrakcije (Hbaieb i sur., 2014). Vrste enzima u maslinama možemo podijeliti u dvije skupine: hidrolaze i oksidoreduktaze.

Hidrolaze su enzimi koji cijepaju veću molekulu i dobiva se više manjih molekula. Takvi enzimi u plodovima maslina su: lipaze, glikozidaze, celulaze, poligalakturonaze, pektin-metilesteraze. Lipaze hidroliziraju triacilglicerol i oslobađaju masne kiseline, glikozidaze odvajaju šećer iz fenolnih glukozida gdje nastaju hidrofilni fenolni aglikoni, celulaza, poligalakturonaze i pektin-metilesteraze razgrađuju celulozu, hemicelulozu, pektin, stanične stijenke i time olakšavanje izdvajanja kapljica ulja.

Oksidoreduktaze su enzimi koji provode reakcije oksidacije i redukcije. U tu skupinu pripadaju: polifenoloksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze. Polifenoloksidaza (pri maksimalnoj temperaturi od 50 °C) i peroksidaza (pri maksimalnoj temperaturi od 37 °C) oksidiraju fenolne spojeve dok lipoksigenaza (pri maksimalnoj temperaturi od 25 °C) oksidira slobodne masne kiseline što je početak enzimskih reakcija u kojima nastaju poželjne tvari arome ulja (Koprivnjak, 2006).

Lipoksigenazni put je niz enzimskih reakcija koje se odvijaju za vrijeme mljevenja maslina i miješenja maslinovog tijesta, a čiji su produkti : C6 aldehidi, C6 alkoholi te C6 esteri. Kako bi se sintetizirali ti produkti, supstrati u lipoksigenaznom putu su slobodne masne kiseline odnosno linolna i linolenska masna kiselina. Na linolensku masnu kiselinu, kao poželjniji supstrat, djeluje lipoksigenaza koja ugrađuje -OOH skupinu na položaj n-6. Ugrađivanjem -OOH skupine dolazi do prelaska dvostruke veze iz izoliranog (cis) položaja u konjugirani (trans) položaj. Time nastaje oko 80% hidroperoksida sa -OOH skupinom na n-6 položaju, te djelujući na linolnu masnu kiselinu oko 20% hidroperoksida sa -OOH skupinom na n-10 položaju. Upravo ti produkti postaju supstrati za sljedeći enzim, hidroperoksid liazu, koji kao i lipoksigenaza više preferira linolensku masnu kiselinu, odnosno n-6 hidroperokside, i nastaje C-6 aldehyd. Optimalni pH i temperatura hidroperoksid liaze su pH 5,7, a temperatura 15 °C (Koprivnjak, 2006). Kao što je rečeno u prethodnom poglavlju, temperatura smjese ne bi trebala bit veća od 25 °C jer time se smanjuje aktivnost i lipoksigenaze i hidroperoksid liaze.



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

2.4 INOVATIVNE TEHNOLOGIJE

Prilikom suvremene proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja dolazi do problema kao što su gubici polifenola u vegetabilnoj vodi i komini, te relativno nisko iskorištenje proizvodnog procesa. U svrhu optimiranja proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja provedena su brojna istraživanja uključivanjem inovativnih tehnologija poput ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja i ubrzanog toplinskog tretmana. Pokazalo se da one mogu doprinijeti održivosti, smanjenju troškova proizvodnje i povećanju iskorištenja proizvodnje. Ove inovativne metode vežu se uz fazu miješenja maslinovog tijesta. Metoda ubrzanog toplinskog tretmana (UTT) maslinovog tijesta omogućava regulaciju njegove temperature i enzimskih reakcija koje doprinose nutritivnom i senzorskom profilu djevičanskog maslinovog ulja. Istraživanja su pokazala da zagrijavanje maslinovog tijesta može skratiti trajanje miješenja, povećati udjel fenolnih i izmijeniti profil hlapljivih spojeva dok hlađenje maslinovog tijesta prije miješenja također može povećati koncentraciju polifenola (Clodoveo, 2013; Salas i Sánchez, 1999; Veneziani i sur., 2017).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

U ovom završnom radu kao materijal korišteno je smrznuto tijesto ploda masline dalmatinske sorte (levantinka) i istarske sorte (istarska bjelica), izuzeto iz proizvodnje prije i nakon faze miješenja, uz i bez primjene ubrzanog toplinskog tretmana kao predtretmana miješenju. Odmah nakon branja, masline su očišćene od lišća i grančica, oprane te samljevene na mlinu čekićaru MM-100 koji je sastavni dio Abencor MC2 pilot-uljare (Ingeniería y Sistemas S.L., Sevilla, Španjolska). Prije miješenja, tijesto je podvrgnuto ubrzanom toplinskom tretmanu na temperaturama 40, 35, 30, 25, 20 i 15 °C. Hlađenje na temperaturu 15 i 20 °C provedeno je u uređaju za ubrzano hlađenje ATT05 ATTILA ABB (Tecnodom SpA, Padova, Italija) koji je postavljen na temperaturu od -18 °C. Maslinovo tijesto u sloju visine 1-1,5 cm nanoseno je na pladnjeve od inoksa. Tijekom hlađenja temperatura tijesta kontrolira se ubodnim termometrom (Quartz, New York, SAD). Toplinska energija odvodi se konvekcijom. S druge strane, maslinovo tijesto je zagrijano na temperature 30 – 40 °C u vodenoj kupelji SUB Aqua Pro SAP12 (Grant Instruments, Shepreth, UK). Gornja strana posude u kojoj se tijesto zagrijavalo bila je obložena aluminijskom folijom kako bi se toplina ravnomjerno rasporedila. Temperatura tijesta je praćena ubodnim termometrom (Quartz, New York, SAD). Toplina se prenosi kondukcijom preko vode zagrijane na 52 °C (za temperaturu tijesta 40 °C) i 50 °C (za temperaturu tijesta 30 -35 °C). 25 g samljevenog tijesta stavljeno je u tankom sloju u plastičnu vrećicu te brzo smrznuto uranjanjem u tekući dušik. Tijesto je do analiza čuvano na -20 °C.

3.1.1 Reagensi

- Triton x-100 (Sigma-Aldrich)
- Klorovodična kiselina HCl (37 % v/v) (Fischer Scientific)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Fenil metansulfonilfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich)
- Benzamidin (Sigma-Aldrich)
- D-norleucin (Alfa Aesar)
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika)
- Bezvodni dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika)
- Heksan (Kemika)
- 2-propanol (Kemika)
- Butilhidroksitoluen (Sigma-Aldrich)
- α -linolenska kiselina (Sigma Aldrich)
- Tween 40 (Fluka)
- Natrijev hidroksid (NaOH) (1 M) (Kemika)
- Acetonitril (Kemika)
- Coomasie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich)
- 95 % etanol (Kemika)
- 13(S)-hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienske kiseline (Larodan)
- 85 % ortofosforna kiselina (Carlo Erba Reagens)

3.2 METODE RADA

3.2.1 Priprema otopina

- Fosfatni pufer pH=6,0 c=0,1 M

Za pripremu 500 ml fosfatnog pufera pH 6,0 (c=0,1 M) na analitičkoj vagi treba izvagati 0,82184 g bezvodnog dinatrijeva hidrogenfosfata i 6,7322 g natrijeva dihidrogenfosfata dihidrata. Izvagane kemikalije prenesu se u laboratorijsku čašu i otope u destiliranoj vodi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH vrijednost pomoću pH-metra. Na temelju vrijednosti pH, kapaljkom dodati par kapi 4 M NaOH. Postignuvši vrijednost pH 6,0 otopina se preko staklenog lijevka prelije u odmjernu tikvicu i dopuni destiliranom vodom do oznake.

- Otopina za ekstrakciju lipoksigenaze

Za pripremu 500 ml otopine za ekstrakciju na analitičkoj vagi potrebno je odvagati 0,00439 g PMSF, 0,07305 g EDTA, 0,16395 g D-norleucina i 0,00301 g benzamida. Izvagane kemikalije prenijeti u odmjernu tikvicu te uz pomoć pipete dodati 0,27 ml Tritona x-100. Odmjernu tikvicu do oznake nadopuniti fosfatnim puferom pH 6,7 te ju staviti na ultrazvučnu kupelj kako bi se sve kemikalije u potpunosti otopile.

- Fosfatni pufer pH 6,7 (c=0.1 M)

Za pripremu 500 ml fosfatnog pufera pH 6,7 (c=0.1 M) na analitičkoj vagi treba izvagati 4,065 g bezvodnog dinatrijeva hidrogenfosfata te 3,187 g natrijeva dihidrogenfosfata dihidrata. Izvagane kemikalije prebaciti u laboratorijsku čašu i otopiti u destiliranoj vodi. Pomoću pH-metra namjestiti vrijednost pH 6,7 dodatkom par kapi 3 M HCl-a. Postignuvši vrijednost pH 6,7 otopina se prenosi preko staklenog lijevka u odmjernu tikvicu i dopuni do oznake destiliranom vodom.

- Bradfordov reagens
Za pripremu 500 ml otopine 50 mg Coomasie Brilliant Blue G-250 kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu te se doda 25 ml 95% EtOH i 50 ml 85% fosfatne kiseline te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Supstrat α -linolenska masna kiselina priprema se prema metodi Axelrod i sur. (1981). Za pripremu 25 ml otopine, u 5 ml vode u koju se prethodno uveo dušik doda se 256 μ l Tween 40 i 192 μ l linolne kiseline. Sadržaj se pažljivo miješa pazeći da se ne zapjeni, a otapanje emulzije se pospješi dodatkom 600 μ l NaOH (1 M). Odmjerna se tikvica zatim nadopuni vodom prethodno propuhanom dušikom do oznake. Dobivena otopina razdijeli se u alikvote te pohrani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do korištenja.

3.2.2 Ekstrakcija lipoksigenaze

Ekstrakcija lipoksigenaze provedena je prema metodi iz rada Luaces i sur. (2005). U plastičnu kivetu od 50 ml izvaže se 5 g odmrznutog tijesta maslina te se doda 20 ml otopine za ekstrakciju. Smjesa se homogenizira na homogenizatoru GLH 850 (Omni International, Kenesaw, SAD) u 2 ciklusa od 1 minute uz 60 sekundi stanke između, s brzinom od 11000 o/min. Homogenizirana smjesa dalje se profiltrira vakuum filtracijom uz pomoć Buchnerova lijevka preko dvostrukog sloja Miracloth filter papira, a filtrat se skuplja u Falcon epruveti koja je uronjena u led. Slijedi centrifugiranje na centrifugi Rotina 420R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka) pri 27000 g i temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 30 minuta. Bistri supernatant koristi se kao sirovi ekstrakt za određivanje aktivnosti lipoksigenaze.

3.2.3 Određivanje aktivnosti lipoksigenaze HPLC metodom

Za određivanje aktivnosti lipoksigenaze HPLC metodom korištena je modificirana metoda opisana u radu Soldo i sur. (2016). Prije provođenja reakcije supstrat, ekstrakt enzima i fosfatni pufer pH=6,0 temperiraju se na 25 °C. U staklenu vijalu prvo se doda magnetič za miješanje te se otpipetira 4 mL fosfatnog pufera, 500 µL supstrata i 500 µL ekstrakta enzima te se reakcijska smjesa miješa na magnetskoj miješalici 30 minuta pri stalnoj temperaturi od 25 °C. Nakon 30 min reakcija se zaustavlja dodatkom 4 kapi klorovodične kiseline (3 M) kako bi se pH reakcijske smjese snizio na 2. Nakon toga u reakcijsku se smjesu dodaje 1 mL otopine butilhidroksitoluena (BHT) koncentracije 0,25 mM kao internog standarda kako bismo mogli pratiti uspješnost izolacije hidroperoksida.

Reakcijska smjesa iz staklenih vijala dalje se prebaci u plastične falkonice te se doda 10 ml smjese otapala za ekstrakciju hidroperoksida (heksan/izopropanol = 95:5). Smjesa se snažno protrese 30 sekundi na vorteksu te se nakon toga ostavi kako bi se razdvojile faze (gornji sloj organskog otapala i donji vodeni sloj). Gornji sloj se odijeli u tikvicu sa okruglim dnom. Postupak ekstrakcije ponovi se na jednak način još 2 puta. Nakon treće ekstrakcije, kako bi došlo do potpunog odvajanja faza, smjesa se centrifugira 10 minuta na 5000 o/min koristeći centrifugu Rotina 380 (Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Organski slojevi od sve tri ekstrakcije se spoje, otapalo se upari do suha pri sniženom tlaku i 40 °C koristeći rotavapor (Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Njemačka). U tikvicu se zatim u dva navrata otpipetira 500 µl mobilne faze (acetonitril/voda = 67:33) i sonificira u ultrazvučnoj kupelji 20 sekundi kako bi se hidroperoksidi u potpunosti otopili u njoj te se otopina hidroperoksida prebaci u vijalicu za HPLC.

Hidroperoksidi su određeni pomoću tekućinske kromatografije visokog učinka reverznih faza (Agilent Technologies LC 1200, Santa Clara, SAD) na koji je instalirana C18 nepolarna kolona (Luna 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) zagrijana na 35 °C. Kao mobilne faze korištene su 0,25 % otopina octene kiseline u vodi (mobilna faza A) i acetonitril (mobilna faza B) ukupnog protoka 1 mL min⁻¹ tijekom cjelokupnog trajanja analize, a korišteni gradijent prikazan je u tablici 1. U sustav je injektirano 10 µL pripremljenog uzorka. 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 dužini od 360 nm. Čitavo vrijeme analize snimani su UV spektri od 190 do 400 nm.

Tablica 1. Promjena gradijenta otapala B (acetonitril) u ovisnosti o vremenu analize

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

Za identifikaciju hidroperoksida korišteni su komercijalno dostupan standard 13(S)-hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienska kiselina (hidroperoksid linolenske masne kiseline - HPOT) i BHT koji su injektirani pod istim uvjetima kao i uzorci.

Množine formiranih hidroperoksida (μmol) izračunate su iz površina ispod pikova detektiranih hidroperoksida prema formulama [1] - [4], dok je aktivnost enzima ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) izračunata prema formuli [5].

$$n \text{ (hidroperoksida)} = \frac{\Sigma A \times RRF_{BHT/HPOT} \times n_{BHT}}{A_{BHT}} \quad [1]$$

gdje je:

- n (hidroperoksida) – množina formiranih hidroperoksida (μmol)
- ΣA – zbroj površina ispod pikova hidroperoksida
- A_{BHT} - površina ispod pika BHT-a
- n_{BHT} – množina BHT-a (μmol) dodanog u uzorak kao 1 mL otopine internog standarda
- $RRF_{BHT/HPOT}$ – korekcijski faktor za izražavanje rezultata preko hidroperoksida linolenske masne kiseline (HPOT) (formula [2])

$$RRF_{\text{BHT/HPOT}} = \frac{RF_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT})}{RF_{1\mu\text{mol}}(\text{HPOT})} \quad [2]$$

gdje je

- $RF_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT})$ – faktor odziva BHT-a koji se računa po formuli [3]

$$RF_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT}) = \frac{\text{površina pika BHT}}{\mu\text{mol injektiranog BHT}} \quad [3]$$

- $RF_{1\mu\text{mol}}(\text{HPOT})$ - faktor odziva HPOT koji se računa po formuli [4]

$$RF_{1\mu\text{mol}}(\text{HPOT}) = \frac{\text{površina pika HPOT}}{\mu\text{mol injektiranog HPOT}} \quad [4]$$

$$AE = \frac{n(\text{hidroperoksid})}{\gamma(\text{proteina}) \cdot V} \quad [5]$$

gdje je:

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

3.2.4 Postupak određivanja proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina u enzimskim ekstraktima određena je na način da je u polimernu mikrokivetu otpipetirano 0,02 mL otopine enzima i 0,28 mL otopine za ekstrakciju enzima te je dodano 1,2 mL Bradfordovog reagensa. Kiveta se poklopi te se njezin sadržaj dobro promiješa. Nakon 5 minuta reakcije mjeri se apsorbancija pri 595 nm na spektrofotometru UviLine 9400 (Secomam, Alès, Francuska) pri čemu se prvo mjeri apsorbancija slijepe probe (0,3 ml otopine za ekstrakciju enzima i 1,2 ml Bradfordovog reagensa). Očitane apsorbancije trebale bi biti u rasponu od 0,2 do 1,0.

Za izračun koncentracije proteina izrađena je baždarna krivulja pomoću standardnih otopina albumina goveđeg seruma u koncentracijama od 0,005 do 0,5 mg mL^{-1} iz koje proizlazi jednadžba:

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

gdje je

- γ (proteina) – masena koncentracija proteina (mg mL^{-1})
- A – apsorbancija otopine proteina pri 595 nm.

3.2.5 Statistička obrada podataka

Statistička obrada dobivenih podataka provedena je Two Factor – ANOVA analizom s 95 %-tnom vjerojatnošću ($p \leq 0,05$) napravljenom u programu Excel (Microsoft).

4 REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovo rada bio je ispitati utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana, kao predtretmana miješenju, na aktivnost enzima lipoksigenaze u maslinama sorti bjelice i levantinke. Lipoksigenaza je važan endogeni enzim odgovoran prvenstveno za formiranje hlapljivih komponenti te pozitivna senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja. Korišteni plodovi obrani su u listopadu 2021. godine, odnosno bjelica je obrana 25. listopada, a levantinka 27. listopada. Indeks zrelosti levantinke je 0,68, a indeks zrelosti bjelice iznosi 2,52. Indeks zrelosti procjenjuje stupanj zrelosti plodova maslina i ima veliki utjecaj na iskorištenje proizvodnje, kvalitetu, stabilnost i senzorska svojstva konačnog proizvoda (Peres i sur., 2016). Materijal odnosno samljeveno tijesto levantinke i bjelice koje je izuzeto iz proizvodnje prije i nakon faze miješenja, uz i bez primjene ubrzanog toplinskog tretmana, smrznuto je i čuvano na - 20 °C do analiza. Mjerenje aktivnosti provodilo se primjenom metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i spektrofotometrijske metode. Rezultati aktivnosti LOX prikazani su u tablicama kao srednje vrijednosti uz standardne devijacije, a provedena je i statistička obrada.

4.1 HPLC ANALIZA

U tablici 2. prikazani su rezultati aktivnosti endogenog enzima lipoksigenaze pri različitim temperaturama te bez ili s miješenjem tijesta bjelice.

Tablica 2. Aktivnost enzima lipoksigenaze u sorti bjelice mjerenih HPLC metodom izraženi u $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteina

	BEZ MIJEŠENJA	S MIJEŠENJEM
KONTROLA		342,0 ± 14,4
15 °C	206,3 ± 11,5	168,9 ± 5,0
20 °C	209,0 ± 11,6	183,8 ± 11,3
25 °C	154,3 ± 7,5	167,5 ± 2,5
30 °C	176,8 ± 66,9	195,4 ± 73,6
35 °C	189,2 ± 6,2	215,6 ± 52,4
40 °C	268,4 ± 25,2	281,2 ± 8,7

Pokazalo se da je maksimalna aktivnost lipoksigenaze postignuta kod kontrolnog uzorka koji nije bio podvrgnut ubrzanom toplinskom tretmanu. To upućuje na činjenicu da ubrzani toplinski tretman nije povećao aktivnost lipoksigenaze kod maslina sorte bjelica. Uspoređujući uzorke djevičanskog maslinovog ulja pri čijoj proizvodnji je primijenjen ubrzani toplinski tretman, maksimalna aktivnost lipoksigenaze postignuta je pri 40 °C kod tijesta bez miješenja i s miješenjem. Najmanja aktivnost lipoksigenaze postignuta je pri 25 °C kod oba tijesta, bez i s miješenjem. Aktivnost lipoksigenaze kod tijesta bjelice koji su podvrgnuti ubrzanom toplinskom tretmanu u početku je manja, zatim raste, pa pada na najmanju aktivnost te u konačnici raste do najveće aktivnosti. Takav tijek aktivnosti lipoksigenaze odnosi se na tijesta koja su ili nisu podvrgnuta procesu miješenja.

Tablica 3. prikazuje aktivnost lipoksigenaze u tijestu, maslina sorte levantinke, bez ili s miješenjem pri različitim temperaturama.

Tablica 3. Aktivnost enzima lipoksigenaze u sorti levantinke mjerenih HPLC metodom izraženi u $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteina

	BEZ MIJEŠENJA	S MIJEŠENJEM
KONTROLA		135,7 ± 6,7
15 °C	254,5 ± 40,3	240,4 ± 28,4
20 °C	152,6 ± 2,1	210,3 ± 12,8
25 °C	140,5 ± 13,3	147,1 ± 22,4
30 °C	161,2 ± 13,9	167,0 ± 11,9
35 °C	186,2 ± 13,1	237,5 ± 37,7
40 °C	231,2 ± 42,1	150,0 ± 7,9

Maksimalna aktivnost lipoksigenaze u sorti levantinke je pri 15 °C kod tijesta koje je i nije podvrgnuto procesu miješenja, dok je minimalna aktivnost lipoksigenaze kod oba tijesta, s ili bez miješenjem, pri 25 °C. Iz tablice je vidljivo da temperatura utječe na aktivnost lipoksigenaze jer je aktivnost između temperaturi 20 °C i 35 °C s miješenjem veća nego bez miješenja.

Kod levantinke u tijestima bez miješenja uočeno je da je aktivnost lipoksigenaze najveća pri najmanjoj temperaturi te se smanjuje, a zatim ponovno raste. Isti je slučaj za aktivnost lipoksigenaze kod levantinke sa miješenjem gdje je aktivnost prvo najveća, zatim pada te raste ali do temperature 35 °C gdje nakon toga naglo opada aktivnost. Soldo (2016.) pokazala je da kod levantinke produljenjem trajanja miješenja koncentracija produkata raste što je i vidljivo u ovom radu uz iznimku posljednje temperature.

Uspoređujući aktivnosti lipoksigenaze bjelice i levantinke može se zaključiti da je kod obje sorte aktivnost najmanja pri 25 °C. Maksimalna aktivnost levantinke postignuta pri 15 °C u tijestima izuzetima prije i nakon miješanja, no kod bjelice maksimalna aktivnost postignuta je u kontrolnome uzorku. Ovime se potvrdilo da najveći utjecaj ima genetska karakteristika svake sorte kao što autori (Salas 2004, Angerosa i sur. 2004) navode u svojim radovima.

Statistička obrada podataka za aktivnost lipoksigenaze provedena je pomoću Two-Factor ANOVA-e. Ako je $p \leq 0,001$ (***) za istraživačku varijablu tada ta istraživačka varijabla ima visoko signifikantan učinak na aktivnost lipoksigenaze, ako je $p \leq 0,01$ (**) tada je istraživačka varijabla signifikantna, a ako je $p \leq 0,05$ (*) tada je istraživačka varijabla signifikantna ali na nižem nivou. Kada su p-vrijednosti veće od 0,05 (°) tada te varijable nisu signifikantne.

Tablica 4. Prikaz obrade podataka za aktivnost lipoksigenaze provedena pomoću Two-Factor ANOVA-e

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F	P- vrijednost	
Temperatura	51907,740	5	10381,548	11,921	0,0001	***
S ili bez miješenja	148,436	1	148,436	0,170	0,682	°
Sorta	2376,132	1	2376,132	2,729	0,105	°
Temperatura*s ili bez miješenja	11401,376	5	2280,275	2,618	0,036	*
Temperatura*sorta	32881,638	5	6576,328	7,552	0,0001	***
S ili bez miješenja*sorta	39,014	1	39,014	0,045	0,833	°
Temperatura*s ili bez miješenja*sorta	12767,619	5	2553,524	2,932	0,022	*

Iz tablice 4. je vidljivo da temperatura te interakcija temperature sa sortom ima najveći učinak na aktivnost lipoksigenaze odnosno visoko su signifikantne. Nadalje interakcija temperature sa provedenim postupkom proizvodnje DMU (s ili bez miješenja) te interakcija temperature sa provedenim postupkom proizvodnje DMU (s ili bez miješenja) i sortom imaju signifikantan učinak na aktivnost lipoksigenaze ali na nižem nivou, dok sve ostale istraživačke varijable i njihove interakcije nemaju značajan učinak na poboljšanje aktivnosti lipoksigenaze. Upravo se ovom statističkom obradom potvrdilo da najveći učinak na aktivnost lipoksigenaze ima temperatura tijesta s ili bez miješenja.

Koprivnjak (2006.) u svojoj knjizi govori kako je optimalna temperatura djelovanja lipoksigenaze pri 25 °C, a da povećanjem temperature iznad 30 °C aktivnost lipoksigenaze značajno pada. U ovom radu pokazalo se suprotno. Najmanja aktivnost lipoksigenaze jest pri temperaturi od 25 °C i to kod obje sorte i sa i bez miješenja tijesta. Lipoksigenaza je maksimalnu aktivnost kod bjelice pokazala nakon miješenja tijesta koje nije prošlo ubrzani toplinski tretman (kontrolni uzorak), a kod levantinke u uzorku proizvedenom iz tijesta hlađenog na 15 °C i sa i bez miješenja. Ovaj suprotan efekt moguć je zbog velikog utjecaja interakcije temperature i sorte. Sličan zaključak izvela je Soldo (2016.) u doktorskom napomenuvši da na porast specifične aktivnosti lipoksigenaze utječe stupanj zrelosti ploda kao i sama sorta maslina. Budući da je bjelica iz Istre odnosno zapadnog dijela Hrvatske, a levantinka iz Dalmacije tj južnog dijela Hrvatske, uz sortu i stupanj zrelosti ploda utjecaj imaju i klimatski uvjeti u određenim dijelovima Hrvatske. Butula (2023.) u diplomskom radu ističe kako je indeks zrelosti maslina važan, odnosno, za levantinku je dobro da se bere kada joj je indeks zrelosti manji jer je tada aktivnost lipoksigenaze najveća. Pri sličnom indeksu zrelosti (IZ = 2,11) kolegica Butula u svome diplomskom radu odredila je aktivost lipoksigenaze kod bjelice od 270 μmol/mg proteina. U ovome radu indeks zrelosti bjelice iznosi 2,52 te maksimalna aktivnost lipoksigenaze iznosi 342,0 ± 14,4 μmol/mg proteina. Palmieri-Thiers i sur. (2009) zaključili su da se kod indeksa zrelosti 2,0-2,5 aktivnost lipoksigenaze povećava odnosno kada se boja ploda promijeni iz zelene u crveno-ljubičastu. Ujedno Butula je određivala i aktivnost lipoksigenaze kod levantinke ali njen prvi rok berbe premašuje indeks zrelosti koji je određen u ovome radu.

5 ZAKLJUČCI

1. U tijestu sorte bjelica ubrzani toplinski tretman nije imao utjecaj na povećanje aktivnosti lipoksigenaze. Lipoksigenaza ove sorte najveću aktivnost imala je u kontrolnome uzorku.
2. U tijestu sorte levantinka ubrzani toplinski tretman imao je utjecaj na aktivnost lipoksigenaze. Njezina maksimalna vrijednost zabilježena je u tijestu ohlađenom na 15 °C.
3. Statistička obrada podataka pokazala je visoko signifikantan učinak temperature te interakcije temperatura i sorte na aktivnost lipoksigenaze.
4. Uz temperaturu i njene interakcije veliki utjecaj na aktivnost ima sorta maslina i stupanj zrelosti plodova.

6 POPIS LITERATURE

Agroportal.hr (2019) Levantinka, sorta koja redovito i obilno rađa. <https://www.agroportal.hr/maslinarstvo/25801> Pristupljeno 24. svibnja 2023.

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)

Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G. (2004) Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J Chromatogr A* **1054**:17-31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.093>

Butula N (2023) Utjecaj indeksa zrelosti na aktivnost endogenih enzima hrvatskih autohtonih sorti maslina (Diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Clodoveo ML (2013) New advances in the development of innovative virgin olive oil extraction plants: Looking back to see the future, *Food Res Int* **54**, 726–729 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.020>

Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D (2002) Influence of olive processing on virgin olive oil quality, *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 587–601. [https://doi.org/10.1002/14389312\(200210\)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/14389312(200210)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M)

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

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 (2006) Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, MIH, Poreč, str. 33-39, 77-110.

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

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. doi :[10.1016/j.foodchem.2004.03.035](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.035)

Maslinar (2022) Istarska bjelica kasno rađa. Maslinar, časopis za maslinare i uljare, <https://www.maslinar.com/istarska-bjelica-kasno-rada/> Pristupljeno 23. svibnja 2023.

Palmieri-Thiers C, Brunini- Bronzini de Caraffa V, Lorenzi V, Gambotti C, Giannettini J, Berti L i sur. (2009) Biochemical and molecular aspects of olive lipoxygenase U: Berti L, Maury JU (ured.) *Advances in Olive Resources*, 2. izd. 1–22. Transworld Research Network, Kerala, Indija

Peres F, Martins L, Mourato M, Conceição V, Antunes P (2016) Phenolic compounds of ‘Galega Vulgar’ and ‘Cobrançosa’ olive oils along early ripening stages. *Food Chem* **211**, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.022>

Salas JJ, (2004) Characterization of Alcohol Acyltransferase from Olive Fruit *J. Agric. Food Chem* **52** 3155–3158. <https://doi.org/10.1021/jf035433a>

Salas JJ, Sánchez J. (1999) The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of hydroperoxide lyase. *J Agric Food Chem.* **47** (3):809-12. doi: [10.1021/jf981261j](https://doi.org/10.1021/jf981261j). PMID: 10552370.

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

Škarica B, Žužić I, Bonifačić M (1996) Maslina i maslinovo ulje visoke kakvoće u Hrvatskoj, 1.izd., Punat, str. 135.

Škevin D (2016) Proces prerade maslina i kontrola kvalitete proizvoda (interna skripta), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 14-32

Veneziani G, Esposito S, Taticchi A, Urbani S, Selvaggini R, Sordini B, Servili M (2017) Characterization of phenolic and volatile composition of extra virgin olive oil extracted from six Italian cultivars using a cooling treatment of olive paste. *LWT - Food Sci. Technol* **87**, 523-528. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.034>

Izjava o izvornosti

Ja Mia Tokić 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.



Vlastoručni potpis