

**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Sandra Kupfer**  
0125170046

**UTJECAJ PREDTRETMANA INOVATIVNIM TEHNOLOGIJAMA NA AKTIVNOST  
POLIFENOL OKSIDAZE I PEROKSIDAZE U TIJESTU MASLINA SORTE  
LEVANTINKA  
ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog 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:** izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Utjecaj predtretmana inovativnim tehnologijama na aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze  
u tijestu maslina sorte levantinka**

**Sandra Kupfer, 0125170046**

### **Sažetak:**

Polifenol oksidaza i peroksidaza endogeni su enzimi ploda masline koji prilikom proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja kataliziraju nepoželjne reakcije oksidacijske degradacije fenolnih spojeva. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj inovativnih tehnologija (ubranog toplinskog tretmana, ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja i kombinacije ovih tehnologija) te miješenja na aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze. Aktivnost ova dva enzima određena je spektrofotometrijski, mjerenjem koncentracije nastalog *o*-kinona za polifenol oksidazu te nastalog tetragvajakola za peroksidazu. Pokazalo se kako je ubrzani toplinski tretman najefikasniji u inaktivaciji polifenol oksidaze, dok je aktivirao peroksidazu. Predtretman pulsirajućim električnim poljem doveo je također do smanjenja aktivnosti polifenol oksidaze, i povećanja aktivnosti peroksidaze. Ultrazvuk je povećao aktivnost oba enzima. U fazi miješenja značajno se smanjila aktivnosti oba enzima, ali to je smanjenje izraženije kod polifenol oksidaze. Statističkom obradom potvrđeno je kako i primijenjene tehnologije i faza miješenja imaju značajan utjecaj na aktivnost ova dva enzima.

**Glavne riječi:** peroksidaza, polifenol oksidaza, inovativne tehnologije, miješenje, djevičansko maslinovo ulje

**Rad sadrži:** 22 stranice, 5 slika, 6 tablica, 17 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić

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

**Datum obrane:** srpanj, 2024.

## 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

**The effect of pretreatment of olive paste with innovative technologies on the activity of polyphenol oxidase and peroxidase in Levantinka variety**  
**Sandra Kupfer, 0125170046**

### **Abstract:**

Polyphenol oxidase and peroxidase are endogenous enzymes in the olive fruit that are responsible for the undesirable reactions of oxidative degradation of phenolic compounds in the production of virgin olive oil. The aim of this study was to investigate the effect of innovative pretreatment technologies (flash thermal treatment, ultrasound, pulsed electric field and their combinations) and the effect of malaxation on the activity of polyphenol oxidase and peroxidase. The activity of these two enzymes was determined spectrophotometrically by measuring the amount of *o*-quinone for polyphenol oxidase and the amount of tetraguaiacol for peroxidase. The flash thermal treatment was most effective in inactivating the polyphenol oxidase, while it increased the activity of the peroxidase. Pretreatment with pulsed electric fields also decreased the activity of polyphenol oxidase and increased the activity of peroxidase. Ultrasound increased the activity of both enzymes. The malaxation process significantly decreased the activity of both enzymes, with the decrease being more pronounced for polyphenol oxidase.

**Keywords:** peroxidase, polyphenol oxidase, inovative technologies, malaxation process, virgin olive oil

**Thesis contains:** 22 pages, 5 figures, 6 tables, 17 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Klara Kraljić, PhD, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Katarina Filipan, mag. ing.

**Thesis defended:** July, 2024

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| 2.1. ENDOGENI ENZIMI PLODA MASLINE .....  | 2         |
| 2.2. PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA .....                               | 3         |
| 2.3. INOVATIVNE TEHNOLOGIJE .....   | 7         |
| 2.3.1. UBRZANI TOPLINSKI TRETMAN (UTT) .....                                      | 7         |
| 2.3.2. ULTRAZVUK (UZV) .....  | 7         |
| 2.3.3. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE (PEP) .....                                   | 8         |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>3.1. MATERIJALI</b> .....  | <b>9</b>  |
| 3.1.1. REAGENSI .....   | 9         |
| <b>3.2. METODE RADA</b> .....   | <b>10</b> |
| 3.2.1. PRIPREMA OTOPINA.....  | 10        |
| 3.2.2. EKSTRAKCIJA ENZIMA .....   | 11        |
| 3.2.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI POLIFENOL OKSIDAZE UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJOM ..... | 11        |
| 3.2.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI PEROKSIDAZE UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJOM .....        | 11        |
| 3.2.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA METODOM PO BRADFORDU .....              | 12        |
| 3.2.6. IZRAČUN AKTIVNOSTI ENZIMA .....  | 13        |
| 3.2.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....   | 13        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | <b>20</b> |
| <b>6. POPIS LITERATURE</b> .....  | <b>21</b> |

## 1. UVOD

Cilj proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja je iz zdravih i neoštećenih plodova dobiti kvalitetno ulje visoke nutritivne vrijednosti, karakterističnih senzorskih svojstava i blagotvornog učinka na zdravlje. Pritom su hlapljivi sastojci i fenoli najodgovorniji za specifičan okus i miris djevičanskog maslinovog ulja. Ovi spojevi su ili već prisutni u plodu masline, ili se razvijaju tijekom proizvodnje kao produkti reakcija endogenih enzima. Osim razvoja poželjnih tvari arome i mirisa, enzimске reakcije mogu dovesti i do nepoželjnih pojava. Jedna takva pojava je i oksidativna degradacija fenolnih spojeva djelovanjem endogenih enzima polifenol oksidaze i peroksidaze. Ovi enzimi najviše dolaze u doticaj s fenolima tijekom miješenja, pa je zato potrebno podesiti parametre miješenja tako da je negativno djelovanje navedenih enzima što manje, a pozitivni učinci miješenja što izraženiji.

Razvojem prehrambene industrije došlo je i do razvoja novih tehnologija obrade hrane minimalnim procesiranjem, a to su prvenstveno netoplinški procesi poput ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja. Ciljevi razvoja inovativnih tehnologija su bolja održivost, smanjenje troškova proizvodnje, povećanje iskorištenja procesa i povećanje kvalitete dobivenog proizvoda. Jedan od načina postizanja veće kvalitete proizvoda je inaktivacija enzima koji dovode do nepoželjnih reakcija tijekom prerade maslina u ulje.

Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka, ubrzanog toplinskog tretmana, pulsirajućeg električnog polja i njihovih kombinacija na aktivnost endogenih enzima ploda masline, polifenol oksidaze i peroksidaze.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Endogeni enzimi ploda masline

Endogeni enzimi u plodu masline imaju veliku ulogu u formiranju poželjnih i nepoželjnih senzorskih svojstava ulja. Enzimi dolaze u doticaj s ostalim tvarima kada se ošteti stanična membrana, do čega može doći prilikom berbe ili skladištenja, te tijekom procesa mljevenja maslina (Koprivnjak, 2006). U tablici 1 prikazani su endogeni enzimi ploda masline.

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

| Vrsta enzima    | Endogeni enzim   | Glavni izvor     | Posljedice djelovanja   |
|-----------------|--|------------------|---|
| hidrolaze       | lipaze   | pulpa i sjemenka | hidroliza triacil glicerola i oslobađanje masnih kiselina   |
|                 | glikozidaze (GLI)  | pulpa            | odvajanje šećera iz fenolnih glukozida pri čemu nastaju fenolni aglikoni koji su topljiviji u ulju    |
|                 | celulaze (CEL)<br>poligalakturonaze (PG)<br>pektin-metilesteraze (PME) | pulpa            | razgradnja celuloze, hemiceluloze i pektina   |
| oksidoreduktaze | Polifenol oksidaze (PFO)   | pulpa            | razgradnja (degradacija) fenolnih tvari   |
|                 | peroksidaze (PER)  | sjemenka         |   |
|                 | lipoksigenaze (LOX)  | pulpa i sjemenka | oksidacija slobodnih masnih kiselina – početak niza reakcija kojima nastaju poželjne tvari arome ulja |

Hidrolaze su enzimi koji koriste vodu kako bi pocijepali veze u molekulama. Lipaze hidroliziraju triacilglicerole, čime se oslobađaju slobodne masne kiseline, zbog čega ulje brže podliježe kvarenju. Glikozidaze prilikom mljevenja iz fenolnih glukozida odvajaju šećer te nastaju fenolni aglikoni, čime je smanjen broj hidroksilnih skupina. Zbog toga fenolni aglikoni imaju

sposobnost otapanja ne samo u vodi, već i u ulju. Celulaze, poligalakturonaze i pektin-metilesteraze razgrađuju tvari koloidnog karaktera, te tako pridonose lakšem izdvajanju ulja tijekom prerade maslina. Lipoksigenaza oksidira slobodne masne kiseline, te je ključni enzim u procesima nastajanja tvari arome ulja.

Peroksidaze su oksidoreduktaze, enzimi koji kataliziraju oksidaciju raznih supstrata, između ostalog i fenolnih tvari, tako što reduciraju vodikov peroksid do vode. Uslijed djelovanja peroksidaza, fenolne tvari degradiraju i tako se narušava kvaliteta maslinovog ulja. Budući da 50% aktivnosti peroksidaza dolazi iz sjemena, uklanjanjem koštice ili izbjegavanjem drobljenja sjemena smanjuje se rizik od oksidacijske degradacije fenolnih tvari i nezasićenih masnih kiselina tijekom miješenja. Ipak, potpuno uklanjanje koštica smanjuje viskoznost tijesta masline, a izostaje i drenažni efekt, čime je otežano izdvajanje ulja iz tijesta. Također, istraživanja su pokazala kako na sastav fenolnih tvari više utječu sorta i stupanj zrelosti plodova. Zato se može zaključiti kako otkoštavanje nije postupak kojim se pouzdano mogu zaštititi fenolne tvari, a mogu se javiti i efekti suprotni od očekivanih (Koprivnjak, 2006).

Polifenol oksidaza je enzim koji u nizu reakcija prevodi fenolne tvari do *o*-kinona. *o*-kinoni se u daljnjim reakcijama prevode u melanine. Kada se voće i povrće mehanički ošteti, ono brzo potamni u dodiru sa zrakom uslijed formacije melanina, a ta se pojava naziva enzimsko posmeđivanje. Osim polifenol oksidaze, u enzimskom posmeđivanju može sudjelovati i peroksidaza (Jiang i sur., 2016). Enzimsko posmeđivanje ima negativan utjecaj na boju, okus i nutritivnu vrijednost proizvoda, i zato ga se nastoji spriječiti inaktivacijom polifenol oksidaze (Holderbaum i sur., 2010).

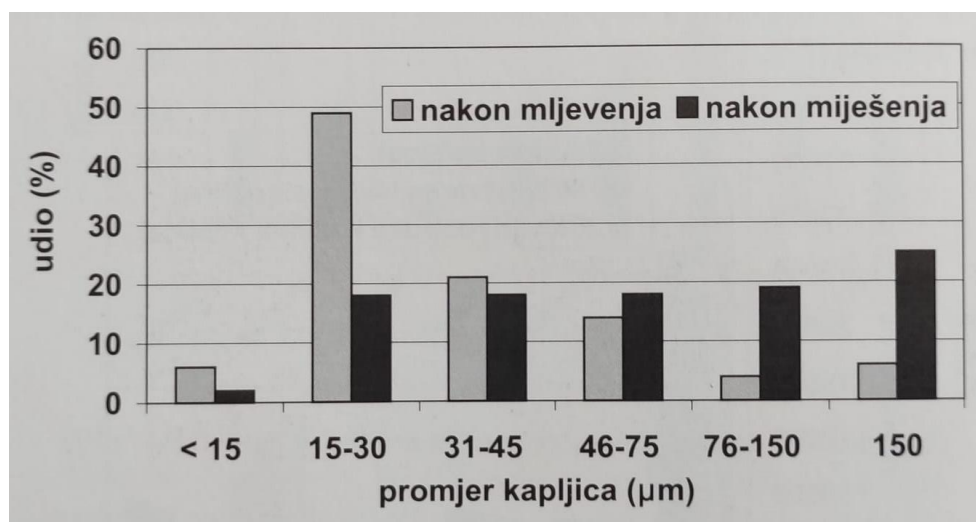
## **2.2. Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja**

Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja odvija se u nekoliko koraka, od kojih je prvi sama berba ploda masline. Berba maslina obično se odvija u studenom i prosincu (Vischiot, 2004), iako ne postoji točno predodređeno vrijeme za berbu plodova, već se oni ubiru pri tehnološkoj zrelosti. Ubranje plodova najčešće se obavlja ručno ili uz pomoć ručnih alata u obliku grabljica (Bakarić i sur., 2007). Tijekom berbe je također moguće provoditi i druge postupke, kao što su mlaćenje i protresanje stabala te postavljanje mreže ispod svakog stabla s kojih se prikupljaju plodovi. Bez obzira na način berbe, važno ju je provesti tako da ne dođe do oštećenja plodova, a samim time i narušavanja kvalitete gotovog ulja. Nakon berbe najbolje je svježere plodove masline odmah preraditi, a ukoliko to nije moguće plodove treba skladištiti u tankim slojevima kako bi se izbjeglo gnječenje i omogućilo provjetranje plodova, te ih preraditi u što kraćem

vremenu (Vischiot, 2004).

Nakon berbe, potrebno je ukloniti nečistoće poput zaostalog lišća i grančica te oprati plodove. Nečistoće je potrebno ukloniti jer narušavaju kvalitetu proizvedenog ulja i smanjuju efikasnost ekstrakcije, a također mogu dovesti i do oštećenja strojeva. Prvo se uklanjaju krupnije grančice propuštanjem maslina u prijemni koš kroz rešetku, a zatim se lišće i sitnije grančice uklanjaju u struji zraka. Ostale nečistoće na površini ploda uklanjaju se kratkotrajnim namakanjem i ispiranjem vodom (Koprivnjak, 2006).

Većina ulja se u stanicama masline nalazi u vakuolama, te je potrebno razoriti stanične strukture kako bi se ono izdvojilo. To se postiže mljevenjem i drobljenjem. Uslijed razaranja staničnih struktura, tijekom mljevenja dolazi do interakcije ulja iz vakuola i specifičnih tvari koje se nalaze u pokožici, pulpi i koštici masline. Tako dolazi do početka raznih kemijskih i biokemijskih reakcija te otapanja specifičnih tvari u ulju. Tijekom mljevenja također može doći i do stvaranja emulzije, odnosno raspršivanja ulja u sitnije kapljice okružene biljnom vodom, što je nepoželjna pojava jer otežava spajanje ulja u veće kapljice ulja koje su prikladnije za izdvajanje. Za mljevenje i drobljenje koriste mlinovi, a najčešći su kameni mlinovi, te razne izvedbe metalnih mlinova (mlinovi čekićari, konsusni mlinovi, mlinovi s diskovima) (Škevin, 2016). Na slici 1 prikazana je raspodjela kapljica ulja s obzirom na njihovu veličinu nakon mljevenja maslina i nakon miješenja tijesta.

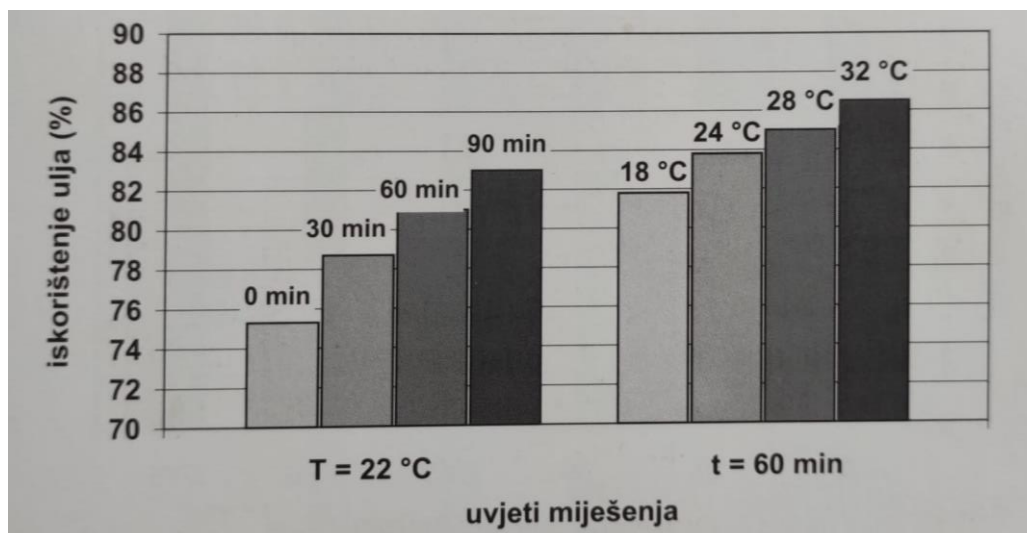


**Slika 1.** Udio kapljica s obzirom na promjer, nakon mljevenja maslina i miješenja tijesta (Koprivnjak, 2006)

Uvođenjem metalnih mlinova u proizvodnju maslinovog ulja pojavila se potreba za miješenjem, čiji je cilj u što većoj mjeri razbiti nastale emulzije i ujediniti kapljice ulja u veće

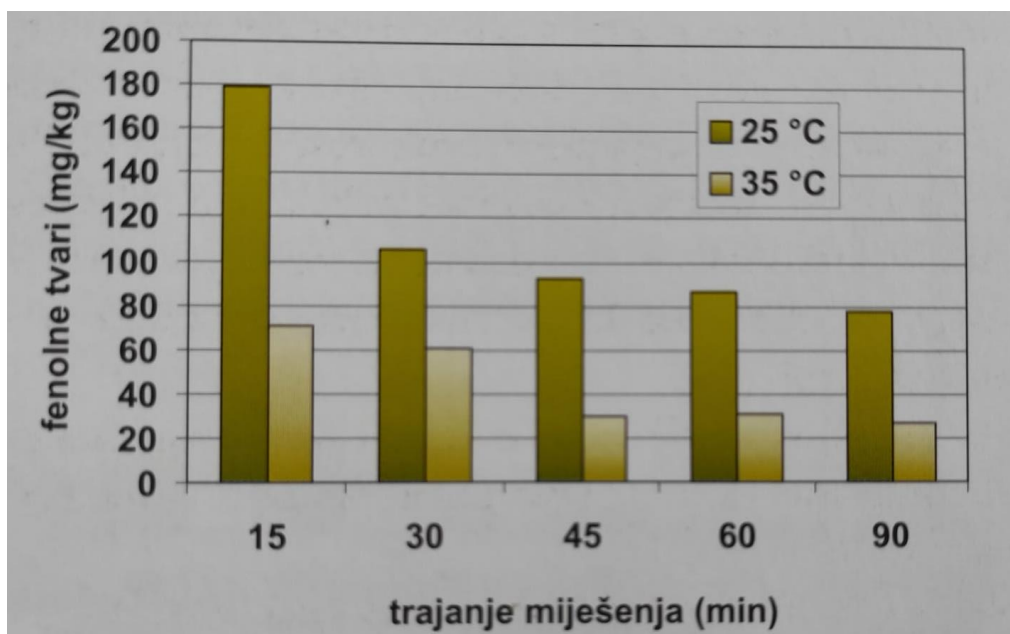


kapljice, čiji je promjer dovoljno velik kako bi ih bilo moguće što lakše izdvojiti u daljnjim postupcima. Ono se obično odvija u seriji od 2-3 korita napravljenih od inoksa koja sadrže metalne mješače te plašt kroz koji struji topla voda. Temperatura vode u plaštu je otprilike 5-6 °C veća od željene temperature tijesta. Optimalni uvjeti za proizvodnju ulja visoke kvalitete su temperatura tijesta ne viša od 28 °C te vrijeme miješenja do 60 minuta. Na slici 2 prikazan je utjecaj temperature i vremena miješenja na iskorištenje procesa proizvodnje ulja.



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

Miješenje se često naziva i ključnim korakom u proizvodnji ulja, jer se tijekom ove operacije najviše razvijaju poželjne i nepoželjne karakteristike ulja. Tijekom ovog procesa tvari oslobođene prilikom mljevenja se preraspodjeljuju između uljne i vodene faze te međusobno reagiraju. Također dolazi do raznih enzimskih reakcija. Tako pektolitički i hemicelulotički enzimi razgrađuju stanične stijenke i ovojnice vakuola, lipaze potiču nastanak slobodnih masnih kiselina, lipoksigenaza potiče stvaranje arome ulja itd.. Temperatura miješenja od oko 30 °C najpogodnija je za prelazak fenolnih tvari iz vodene u uljnu fazu. Međutim, takva temperatura potiče i rad endogenih enzima peroksidaze i polifenol oksidaze koji oksidiraju fenolne tvari. Tako se fenolne tvari degradiraju te gube senzorska i antioksidacijska svojstva (Koprivnjak, 2006). Na slici 3 prikazana je ovisnost masenog udjela fenolnih tvari u ulju o temperaturi i trajanju miješenja.



**Slika 3.** Maseni udio fenolnih tvari u ulju ovisno o temperaturi i trajanju miješenja (Koprivnjak, 2006)

Iz slike 3. vidljivo je kako kraće vrijeme miješenja pri nižim temperaturama pogoduje nakupljanju fenolnih tvari, jer se u takvim uvjetima smanjuje oksidacijska degradacija pod djelovanjem enzima.

Nakon miješenja ulje se izdvaja iz pripremljenog tijesta. Ulje je moguće izdvojiti prešanjem, centrifugiranjem, ili procjeđivanjem. Prešanje se provodi na otvorenim hidrauličkim prešama, te se temelji na principu primjene sile pritiska. Prilikom prešanja iz tijesta se izdvaja uljni mošt – tekuća smjesa ulja i vegetabilne vode, a zaostali kruti materijal se naziva komina. Tekuća faza zatim odlazi na vertikalni separator, čime se dobije djevičansko ulje i vegetabilna voda. Kontinuiranom centrifugalnom ekstrakcijom u dekanterima (horizontalnim separatorima) dobivaju se komina, djevičansko ulje i vegetabilna voda, a princip izdvajanja ulja ovim postupkom je razlika u gustoći te tri komponente. Postoje izvedbe dekantera u dvije ili tri faze (izlaza). Kod dekantera s tri faze dodaje se topla voda u vrijednosti 50 do 100% u odnosu na masu tijesta maslina. Prvu fazu čini ulje, drugu fazu vegetabilna voda, a treću fazu komina. Prilikom korištenja dekantera s dvije faze ne dodaje se voda. Prva faza je ulje, a druga je faza smjesa vode i komine. Procjeđivanje je proces koji se zasniva na principu različite površinske napetosti maslinovog tijesta, ulja i vegetabilne vode. Postupak je namijenjen tijestima s malim udjelom vode, a u praksi se rijetko koristi jer se ulje izlaže oksidacijskom kvarenju, a cijena opreme je visoka (Škevin, 2016).

## 2.3. Inovativne tehnologije

Razvojem prehrambene industrije pojavilo se zanimanje za razvojem novih postupaka obrade hrane, koji bi omogućili minimalno procesiranje hrane, a ujedno i zamijenili standardne metode konzerviranja. Uz to, netoplinskim postupcima tretiranja hrane, poput ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja, materijal se tretira pri sobnoj temperaturi, uz neznatno povišenje temperature uslijed procesiranja, te sam proces traje kratko vrijeme, od 1 do 10 minuta, zbog čega se dobivaju proizvodi visoke kakvoće, štedi se energija, te se skraćuje vrijeme trajanja tehnološkog procesa (Herceg i sur., 2009).

### 2.3.1. Ubrzani toplinski tretman (UTT)

Tijekom miješenja, tijesto maslina se istovremeno miješa i zagrijava. Učinkovitost prijenosa topline ovog procesa relativno je niska, zbog čega vrijeme kondicioniranja traje dulje od optimalnog. Pri povišenim temperaturama povisuje se i aktivnost enzima ploda masline, pa tako i enzima koji utječu na sastav polifenolnih tvari i hlapivih komponenti u ulju, kao što su peroksidaza, polifenol oksidaza i lipoksigenaza. Primjenom ubrzanog toplinskog tretmana nakon mljevenja i drobljenja maslina može se značajno smanjiti vrijeme miješenja, što može utjecati na iskorištenje procesa i kvalitetu proizvedenog djevičanskog maslinovog ulja (Esposito i sur., 2013).

### 2.3.2. Ultrazvuk (UZV)

Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji dijeli se na dvije glavne kategorije: praćenje procesa ili proizvoda (čišćenja, odzračivanje tekućina i homogenizacija) i utjecaj na proces ili proizvode (postoje ozbiljne naznake o mogućnostima korištenja ultrazvuka visokog intenziteta u razne svrhe, kao što su ubrzanje kemijskih reakcija, olakšavanje ekstrakcije i emulgiranja, uništavanje mikroorganizama i inaktivacija enzima).

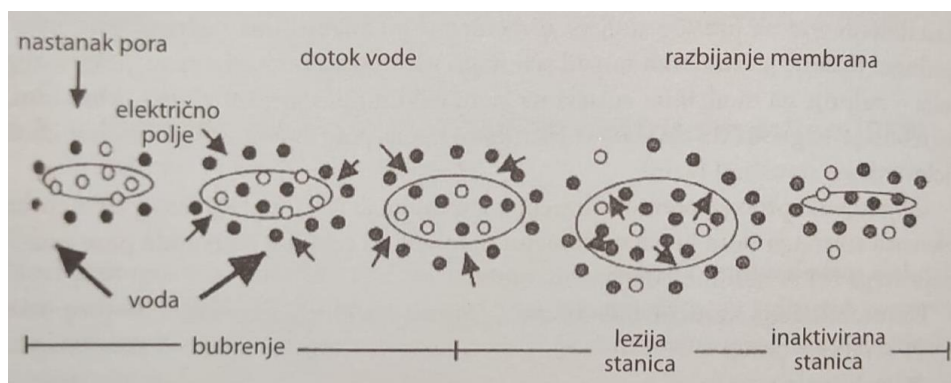
Ultrazvuk se često primjenjuje u laboratorijskim uvjetima, dok se u industriji rabi za širok spektar postupaka, između ostalog i za inaktivaciju mikroorganizama i enzima. Budući da je tretiranjem hrane ultrazvukom moguće smanjiti ukupno vrijeme procesiranja i smanjiti potrošnju energije, za tretiranje hrane ultrazvukom postoji veliko zanimanje. U te bi se svrhe mogao koristiti ultrazvuk visokog intenziteta i niske frekvencije. Ultrazvučni valovi visokog intenziteta, frekvencije od 20 do 100 kHz te visoke razine snage, u rasponu od 10 do 1000 W/cm<sup>2</sup>, zbog velike snage kojom djeluju na materijal mogu uzrokovati fizička oštećenja tkiva te određene

kemijske reakcije. Ultrazvuk visokog intenziteta prolaskom kroz materijal uzrokuje ubrzanje kemijskih reakcija i uništenje mikroorganizama i enzima (Herceg i sur., 2009).

### 2.3.3. Pulsirajuće električno polje (PEP)

Pulsirajuće električno polje je netoplinska metoda obrade hrane. Prilikom procesiranja hrane pulsirajućim električnim poljem na prehrambeni proizvod koji je smješten između dvije elektrode primjenjuje se električno polje napona između 10 i 80 kV/cm u pulsevima koji traju od 1 do 100  $\mu$ s. Trajanje procesa je manje od jedne sekunde i provodi se pri sobnoj temperaturi, a tijekom procesiranja dolazi do minimalnog porasta temperature namirnice. Prije tretmana moguće je korištenje izmjenjivača topline kako bi se medij predgrijao, a nakon tretmana temperatura se mora smanjiti prije punjenja u ambalažu.

Primjenom pulsirajućeg električnog polja dolazi do elektroplazmolize staničnih materijala, što rezultira povećanom permeabilnosti stanične stijenke. Do razaranja stanične stijenke dolazi zbog izlaganja pulsevima električnog polja visokog napona, što destabilizira lipoproteinski međusloj staničnih stijenki. One tako postaju propusne za male molekule te dolazi do bubrenja i naknadnog razaranja stanične strukture, što je prikazano na slici 4 (Herceg i sur., 2009).



**Slika 4.** Elektroporacija stanične membrane (Herceg i sur., 2009)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

Kao materijal u ovom završnom radu korišten je acetonski ekstrakt dobiven iz tijesta ploda masline sorte levantinka pripremljen prema metodi opisanoj u diplomskom radu Butula (2023). Sviježe samljeveni uzorci tijesta su tretirani ubrzanim toplinskim tretmanom pri temperaturi 19,5 °C, ultrazvukom u vremenu od 5 minuta i snagom ultrazvučne kupelji od 576 W, pulsirajućim električnim poljem u vremenu od 90 sekundi, jakosti električnog polja od 2 kV/cm, frekvencije 150 Hz i trajanja jednog pulsa 2  $\mu$ s te kombinacijama ovih tehnologija. Nakon tretmana inovativnim tehnologijama, provedeno je miješenje tijesta na 27 °C kroz 40 min. Tijesto je nakon miješenja izuzeto za pripremu acetonskih ekstrakta. Kod primjene kombinacija predtretmana (ubranog toplinskog tretmana, ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja) ispitana je i mogućnost izostavljanja faze miješenja pa je tijesto izuzeto odmah nakon tretmana i nakon provedenog miješenja.

##### 3.1.1. Reagensi i oprema

- Bezvodni dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika)
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika)
- Kalijev fosfat (Kemika)
- Kalijev klorid (Kemika)
- Katehol (Sigma Aldrich)
- Gvajakol (Thermo Scientific)
- Vodikov peroksid (T.T.T.)
- Kollidon (Sigma Aldrich)
- Commasie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich)
- Fosfatna kiselina (Fluka)
- Ultrazvučna kupelj Sonorex Digiplus (BANDELIN Electronic, Berlin, Njemačka)
- Uređaj za ubrzano hlađenje (Blastchiller ATT05 ATTILA ABB, TECNODOM, Paodva, Italija)
- HVG60/1 PEP (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- pH metar (3510 pH Meter, Jenway, Milton Keynes, UK)
- Magnetska miješalica (RT 5, IKA Werke, Staufen, Njemačka)
- Centrifuga (Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Njemačka)
- Spektrofotometar (T70, PG Instruments, Leicestershire, UK)

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema otopina

- Natrij-fosfatni pufer; pH – 6,2; c – 50 mmol/L

Za pripremu jedne litre pufera potrebno je na analitičkoj vagi izvagati 1,6041 g dinatrijeva hidrogenfosfata i 6,03721 g natrijeva dihidrogenfosfata dihidrata. Izvagane kemikalije se prebace u laboratorijsku čašu i otope u 950 mL destilirane vode. Otopini se izmjeri pH, te se dodatkom klorovodične kiseline (c=3 mol/L) pH podesi na 6,2. Pripremljen pufer se prebaci u odmjernu tikvicu od 1 L i tikvica se nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalij-fosfatni pufer; pH – 6,2; c – 1,05 mol/L

Za pripremu jedne litre pufera potrebno je na analitičkoj vagi izvagati 10,6135 g kalijeva fosfata i 74,5500 g kalijeva klorida. Izvagane kemikalije se prenesu u laboratorijsku čašu i otope se u 950 mL destilirane vode. Otopini se pomoću pH-metra odredi pH, te se dodatkom NaOH (c=1 mol/L) pH podesi na vrijednost 6,2. Pripremljen pufer se prebaci u odmjernu tikvicu od 1 L i tikvica se nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Otopina katehola; c – 30 mmol/L

Za pripremu 250 mL otopine potrebno je na analitičkoj vagi odvagati 0,82575 g katehola, koji se zatim kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu te otopi u pripremljenom natrij-fosfatnom puferu čiji pH iznosi 6,2.

- Otopina gvajakola; c – 30 mmol/L

Za pripremu 250 mL otopine potrebno je na analitičkoj vagi izvagati 0,9311 g gvajakola, koji se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu te se otopi u pripremljenom natrij-fosfatnom puferu (pH 6,2).

- Otopina vodikova peroksida; c – 4 mmol/L

Za pripremu 100 mL otopine 40,8  $\mu$ L otopine vodikova peroksida stavi se u odmjernu tikvicu te se ona nadopuni do oznake pripremljenim natrij-fosfatnim puferom čiji pH iznosi 6,2.

### 3.2.2. Ekstrakcija enzima

Ekstrakcija polifenol oksidaze/peroksidaze provodila se prema modificiranoj metodi Peres i sur. (2016). 3 g acetonskog ekstrakta i 0,3 g kollidona izvaže se u tikvicu od 50 mL, doda se 12 mL otopine za ekstrakciju (kalij-fosfatni pufer) i jedan magnet za miješanje. Tikvica se postavi na magnetnu miješalicu te se sadržaj tikvice miješa u ledenoj kupelji tijekom jednog sata. Nakon jednog sata sadržaj tikvice se centrifugira na centrifugi Rotina 420R kroz 30 minuta na 27000 g i pri temperaturi od 4 °C. Dobiveni bistri supernatant odvoji se u epruvetu te se koristi kao enzimski ekstrakt za određivanje aktivnosti polifenol oksidaze i peroksidaze.

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze UV/VIS spektrofotometrijom

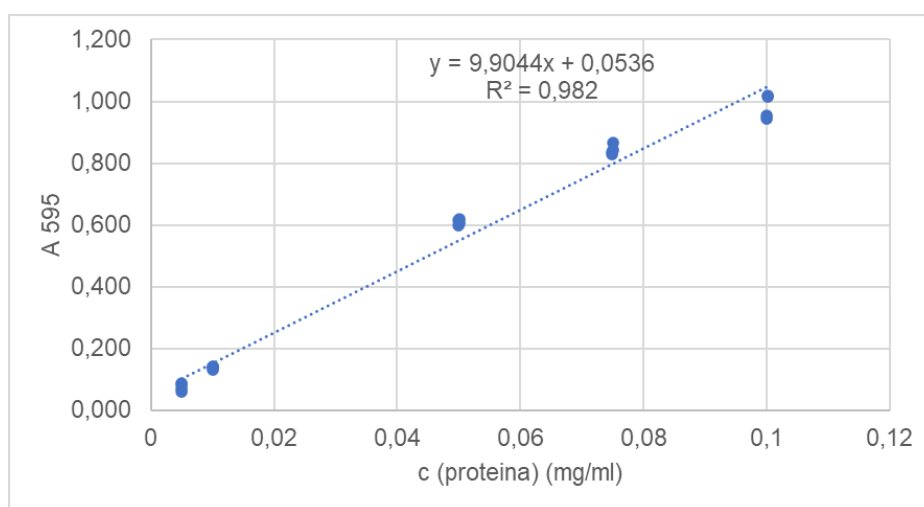
Za određivanje aktivnosti polifenol oksidaze korištena je metoda iz rada Peres i sur. (2016). Najprije se enzimski preparat, natrij-fosfatni pufer i otopina katehola temperiraju u vodenoj kupelji na temperaturi od 25 °C u trajanju od 15 minuta. Za provođenje reakcije se u epruvetu doda 2,5 mL otopine katehola i 500 µL enzimskog ekstrakta, te se smjesa homogenizira na Vortex miješalici 10 sekundi. Smjesa se prebaci u kivetu te se nakon jedne minute od početka reakcije mjeri apsorbancija nastalog produkta, *o*-kinona, na 420 nm na spektrofotometru (T70, PG Instruments, Leicestershire, UK). Na isti se način izmjere i apsorbancije slijepih proba, pri čemu jedna slijepa proba sadrži 2,5 mL natrij-fosfatnog pufera i 500 µL enzimskog ekstrakta, a druga proba sadrži 2,5 mL supstrata katehola i 500 µL kalij-fosfatnog pufera.

### 3.2.4. Određivanje aktivnosti peroksidaze UV/VIS spektrofotometrijom

Za određivanje aktivnosti peroksidaze korištena je metoda iz rada Peres i sur. (2016). U vodenoj se kupelji na 25 °C tijekom 15 minuta temperiraju enzimski preparat, natrij-fosfatni pufer, gvajakol i vodikov peroksid. U epruvetu se doda 2 mL otopine gvajakola, 1 mL vodikovog peroksida te 500 µL enzimskog ekstrakta. Smjesa se zatim homogenizira na Vortex miješalici 10 sekundi. Nakon 10 minuta reakcije smjesa se prebaci u kivetu, nakon čega se u spektrofotometru izmjeri apsorbancija nastalog produkta, tetragvajakola, na 470 nm. Na isti se način izmjere i apsorbancije slijepih proba, pri čemu jedna slijepa proba sadrži 3 mL natrij-fosfatnog pufera i 500 µL enzimskog preparata, a druga slijepa proba sadrži 2 mL otopine gvajakola, 500 µL kalij-fosfatnog pufera i 1 mL otopine vodikova peroksida.

### 3.2.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Prije početka provođenja analiza potrebno je pripremiti baždarnu krivulju ovisnosti koncentracije proteina o apsorbanciji. Za izradu baždarne krivulje korištene su otopine albumina goveđeg seruma u rasponu koncentracija od 0,005 do 0,5 mg/mL. Za svaku koncentraciju proteina pripremljene su po dvije paralelne otopine, te jedna slijepa proba za cijelu seriju mjerenja. U kivetu se otpipetira 0,6 mL otopine proteina i 2,4 mL Bradfordovog reagensa. Smjesa se poklopi i kratko promiješa. Reakcija se odvija 5 minuta pri sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija na 595 nm na spektrofotometru (T70, PG Instruments, Leicestershire, UK). Slijepa proba priprema se na isti način no umjesto otopine proteina sadrži 0,6 mL destilirane vode. Iz dobivenih apsorbancija izradi se baždarna krivulja prikazana na slici 1.



**Slika 5.** Baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije  $A_{595}$  o koncentraciji proteina

Za određivanje koncentracije proteina u enzimskim ekstraktima u kivetu se otpipetira 40  $\mu$ L uzorka i 560  $\mu$ L kalij-fosfatnog pufera. Reakcija se pokrene dodatkom 2,4 mL Bradfordovog reagensa, kiveta se poklopi i sadržaj se kratko promiješa. Reakcija se provodi 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se izmjeri apsorbancija na 595 nm uz slijepu probu. Slijepa proba sadrži 0,6 mL kalij-fosfatnog pufera i 2,4 mL Bradfordovog reagensa.

Za svaki se uzorak pripreme dvije paralele, i za cijelu seriju mjerenja jedna slijepa proba. Koncentracija proteina u uzorku odredi se prema formuli [1].

$$c = \frac{A - 0,0536}{9,9044} * 15 \quad [1]$$

Pri čemu je:

$c$  – masena koncentracija proteina u enzimskom ekstraktu izražena u mg/ml

$A$  – izmjerena apsorbancija na 595 nm

15 – faktor razrjeđenja enzimskih ekstrakata



### 3.2.6. Izračun aktivnosti enzima

Razlika u apsorbanciji uzorka i slijepih proba ( $\Delta A$ ), tj. vrijednost apsorbancije produkta enzimske reakcije izračunata je prema formuli [2].

$$\Delta A = A_1 - A_2 - A_3 \quad [2]$$

Pri čemu je:

A1 – izmjerena apsorbancija supstrata i enzima nakon reakcije

A2 – izmjerena apsorbancija natrij-fosfatnog pufera i enzima nakon reakcije

A3 – izmjerena apsorbancija supstrata i kalij-fosfatnog pufera nakon reakcije

Aktivnost enzima polifenol oksidaze i peroksidaze, izražena kao  $\mu\text{mol/mg}$  proteina, računa se prema formuli [3].

$$AE = \frac{\Delta A * V(\text{reakcijske smjese})}{\epsilon * d * \gamma(\text{proteina}) * V(\text{enzimski ekstrakt})} \quad [3]$$

Pri čemu je:

$\Delta A$  – promjena apsorbancije izračunata prema formuli [2]

d – duljina puta izmjerene zrake, odnosno debljina kivete (1 cm)

$\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent, koji za o-kinon iznosi  $1623 \text{ l/M*cm}$  i za tetragvajakol  $26,6 \text{ l/mM*cm}$

$\gamma(\text{proteina})$  – masena koncentracija proteina u enzimskom ekstraktu izračunata prema formuli [1] izražena u  $\text{mg/mL}$

### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Dobiveni su podatci statistički obrađeni dvosmjernom analizom varijance s vjerojatnošću od 95% ( $p \leq 0,05$ ). Statistička je analiza provedena koristeći program Microsoft Office Excel.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Suvremena proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja nailazi na nekoliko problema, od kojih su najvažniji nisko iskorištenje procesa i gubitak polifenola u vegetabilnoj vodi. Iskorištenje procesa može se poboljšati povišenjem temperature tijekom miješenja, ali ono pogoduje nepoželjnom djelovanju polifenol oksidaze i peroksidaze. Ovaj problem se pokušava riješiti uvođenjem inovativnih tehnologija, poput ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja i mikrovalova u proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja. Osim što bi trebale riješiti problem slabog iskorištenja, primijenjene tehnologije ujedno ne smiju utjecati na kvalitetu, senzorska svojstva i nutritivnu vrijednost proizvedenog ulja. Ključnu ulogu u razvoju poželjnih, ali i nepoželjnih svojstava djevičanskog maslinovog ulja imaju enzimi, zbog čega je potrebno pronaći optimalne uvjete proizvodnje, koji će pogodovati aktivaciji enzima odgovornih za razvoj poželjnih svojstava, a ujedno smanjiti aktivnost ili potpuno inaktivirati enzime s nepoželjnim djelovanjem.

Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj inovativnih tehnologija ultrazvuka, ubrzanog toplinskog tretmana i pulsirajućeg električnog polja te njihovih kombinacija na aktivnost endogenih enzima polifenol oksidaze i peroksidaze u tijestu maslina sorte levantinke. Osim toga, ovim radom želio se ispitati utjecaj faze miješenja nakon tretmana kombinacijama inovativnih tehnika na aktivnost navedenih enzima, kako bi se utvrdila mogućnost izostavljanja te vremenski i energetski zahtjevne faze proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja.

Polifenol oksidaza je oksidoreduktaza koja se nalazi u pulpi masline i sudjeluje u procesu enzimskog posmeđivanja hrane. Ovaj enzim oksidira fenole uz prisustvo kisika do o-kinona, koji se u daljnjim reakcijama prevodi u melanine. Peroksidaza je također oksidoreduktaza, a u maslinama se nalazi u koštici. Peroksidaze kataliziraju reakciju redukcije vodikova peroksida, pri čemu dolazi do oksidacije različitih organskih tvari, kao na primjer fenola i masnih kiselina. Reakcije u kojima se degradiraju fenolne tvari su nepoželjne prilikom proizvodnje maslinovog ulja, te je poželjno umanjiti aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze.

U tablici 2. prikazani su rezultati aktivnosti endogenih enzima polifenol oksidaze i peroksidaze u ovisnosti o primijenjenim tehnologijama kao predtretmana miješenju izuzetih nakon miješenja.

Pokazalo se kako je primjena svih inovativnih tehnologija i njihovih kombinacija kao predtretmana miješenju, uz iznimku primjene ultrazvuka, dovela do smanjenja aktivnosti polifenol oksidaze. Pritom su se kao najuspješnije pokazale tehnologije ubrzanog toplinskog tretmana te kombinacija sve tri tehnologije, jer u ta dva slučaja nije detektirana aktivnost polifenol oksidaze. Iz rezultata je vidljivo kako je najveća aktivnost polifenol oksidaze zabilježena u tijestu tretiranom ultrazvukom.

**Tablica 2.** Aktivnost enzima, polifenol oksidaze (PPO) i peroksidaze (POD) u tijestu levantinke u ovisnosti o primijenjenoj tehnologiji kao predtretmana miješenju izražena u  $\mu\text{mol}$  nastalog produkta/mg proteina

| Predtretman inovativnim tehnologijama | PPO<br>$\mu\text{mol o-kinona/mg proteina}$ | POD<br>$\mu\text{mol tetragvajakola/mg proteina}$ |
|---------------------------------------|---|---|
| Kontrola                              | $0,357 \pm 0,122$                           | $0,031 \pm 0,003$                                 |
| UTT                                   | nd*   | $0,143 \pm 0,004$                                 |
| UZV                                   | $0,480 \pm 0,154$                           | $0,101 \pm 0,003$                                 |
| PEP                                   | $0,056 \pm 0,092$                           | $0,124 \pm 0,015$                                 |
| UTT UZV                               | $0,026 \pm 0,035$                           | $0,222 \pm 0,019$                                 |
| UZV PEP                               | $0,051 \pm 0,102$                           | $0,101 \pm 0,008$                                 |
| UTT PEP                               | $0,034 \pm 0,039$                           | $0,114 \pm 0,019$                                 |
| UTT UZV PEP                           | nd*   | $0,085 \pm 0,005$                                 |

\* nije detektirana aktivnost enzima

Za razliku od polifenol oksidaze, primjena svih tehnologija i njihovih kombinacija kao predtretmana miješenju je u slučaju peroksidaze dovela do povećane aktivnosti tog enzima. Pritom je kombinacija ubrzanog toplinskog tretmana i ultrazvuka dovela do najvećeg povećanja aktivnosti, dok je kombinacije sve tri tehnologije dovela do najmanjeg povećanja aktivnosti peroksidaze.

Statistička obrada podataka provedena je jednosmjernom analizom varijance – One Way ANOVA analizom. Ukoliko je za promatranu varijablu  $p \leq 0,001$  (\*\*\*), onda je učinak te varijable na aktivnost endogenih enzima vrlo visoko značajna. Ukoliko je  $p \leq 0,01$  (\*\*), tada promatrana varijabla visoko značajan učinak, a ukoliko je  $p \leq 0,05$  (\*), varijabla ima značajan ujecaj. Varijable kojima je  $p > 0,05$  (°) nemaju značajan učinak na aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze.

U tablici 3 prikazani su rezultati statističke obrade utjecaja primijenjenih inovativnih tehnologija, samostalno i u kombinacijama, na aktivnost enzima polifenol oksidaze i peroksidaze u tijestima nakon faze miješenja. Iz rezultata u prikazanih u tablici 3 vidljivo je kako je primijenjene tehnologije imaju vrlo visoko značajan utjecaj na aktivnost istraživanih enzima u tijestu maslina.

Miješenje je dugotrajna faza koja zahtjeva veliku količinu energije, što povećava troškove proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja. Budući da procesi tretiranja hrane inovativnim tehnologijama traju kratko i doprinose održivosti proizvodnje, u ovom je radu ispitano mogu li te tehnologije zamijeniti miješenje.

**Tablica 3.** Prikaz rezultata statističke obrade podataka za utjecaj primjenjenog predtretmana na aktivnost polifenol oksidaze (PPO) i peroksidaze (POD) provedena pomoću One Way ANOVA analizom

| Enzim | DF    | SS    | MS    | F      | p-vrijednost      | Značajnost |
|-------|-------|-------|-------|--------|-------------------|------------|
| PPO   | 7,000 | 0,958 | 0,137 | 18,223 | <b>&lt;0.0001</b> | ***        |
| POD   | 7,000 | 0,083 | 0,012 | 87,561 | <b>&lt;0.0001</b> | ***        |

**Tablica 4.** Aktivnost enzima polifenol oksidaze (PPO) i peroksidaze (POD) u tijestu levantinke u ovisnosti o kombinaciji tehnologija sa i bez primijenjenog miješenja (BM) izražena u  $\mu\text{mol}$  nastalog produkta/mg proteina

| Predtretman inovativnim tehnologijama | PPO<br>$\mu\text{mol o-kinona/mg proteina}$ | POD<br>$\mu\text{mol tetragvajakola/mg proteina}$ |
|---------------------------------------|---|---|
| UTT UZV – BM                          | 0,643 $\pm$ 0,060                           | 0,272 $\pm$ 0,016                                 |
| UTT UZV                               | 0,026 $\pm$ 0,035                           | 0,222 $\pm$ 0,019                                 |
| UZV PEP – BM                          | 0,530 $\pm$ 0,093                           | 0,121 $\pm$ 0,004                                 |
| UZV PEP                               | 0,051 $\pm$ 0,102                           | 0,101 $\pm$ 0,008                                 |
| UTT PEP – BM                          | 0,482 $\pm$ 0,107                           | 0,159 $\pm$ 0,006                                 |
| UTT PEP                               | 0,034 $\pm$ 0,039                           | 0,114 $\pm$ 0,019                                 |
| UTT UZV PEP – BM                      | 0,397 $\pm$ 0,178                           | 0,031 $\pm$ 0,004                                 |
| UTT UZV PEP                           | nd*   | 0,085 $\pm$ 0,005                                 |

\* - nije detektirana aktivnost enzima

U tablici 4 prikazana je aktivnost enzima polifenol oksidaze i peroksidaze u ovisnosti o kombinacijama inovativnih tehnologija prije i nakon faze miješenja. Iz rezultata je vidljivo kako je aktivnost polifenol oksidaze u svim tijestima pala nakon miješenja. Najveće smanjenje enzimske aktivnosti može se uočiti kod tijesta koje je bilo tretirano kombinacijom sva tri predtretmana, jer u tom slučaju nakon miješenja nije detektirana aktivnost polifenol oksidaze.

Aktivnost peroksidaze je u većini slučajeva pala nakon miješenja, ali taj pad je puno manji nego kod polifenol oksidaze. Iznimka je tijesto koje je tretirano svim trima tehnologijama, u kojem je aktivnost peroksidaze manja prije miješenja.

U tablici 5 prikazani su rezultati statističke obrade podataka za aktivnost polifenol oksidaze.

**Tablica 5.** Prikaz rezultata statističke obrade podataka za aktivnost polifenol oksidaze (PPO) provedena pomoću Two Factor ANOVA-e

| Izvor varijabilnosti                                 | df    | SS    | MS    | F       | p-vrijednost      | Značajnost |
|--|-------|-------|-------|---------|-------------------|------------|
| kombinacija tehnologija                              | 3,000 | 0,079 | 0,026 | 3,078   | <b>0,047</b>      | *          |
| faza miješenja                                       | 1,000 | 1,883 | 1,883 | 219,661 | <b>&lt;0.0001</b> | ***        |
| Interakcija kombinacije tehnologija i faze miješenja | 3,000 | 0,053 | 0,018 | 2,065   | 0,132             | °          |

Iz tablice 5 vidljivo je kako najveći utjecaj na aktivnost polifenol oksidaze ima miješenje, odnosno je li ono ili nije bilo prisutno tijekom proizvodnje ispitivanog tijesta. Nadalje, kombinacija tehnologija kojima je tijesto tretirano je također značajna, ali na nižem nivou od prisutnosti miješenja. Interakcija kombinacije tehnologija kojima je tijesto tretirano i faze miješenja nije imalo statistički značaj za aktivnost polifenol oksidaze.

**Tablica 6.** Prikaz rezultata statističke obrade podataka za aktivnost peroksidaze (POD) provedene pomoću Two Factor ANOVA-e

| Izvor varijabilnosti                   | df    | SS    | MS    | F       | p-vrijednost      | Značajnost |
|--|-------|-------|-------|---------|-------------------|------------|
| kombinacija tehnologija                | 3,000 | 0,152 | 0,051 | 350,330 | <b>&lt;0.0001</b> | ***        |
| faza miješenja                         | 1,000 | 0,002 | 0,002 | 12,760  | <b>0,002</b>      | **         |
| kombinacija tehnologija*faza miješenja | 3,000 | 0,014 | 0,005 | 31,759  | <b>&lt;0.0001</b> | ***        |

U tablici 6 prikazani su rezultati statističke obrade podataka za aktivnost peroksidaze. Iz tablice je vidljivo kako obje promatrane varijable te njihova interakcija imaju značajan utjecaj na aktivnost peroksidaze. Pritom najznačajniji utjecaj imaju vrsta primijenjenih tehnologija te interakcija vrste primijenjenih tehnologija i miješenja. Prisutnost faze miješenja u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja također statistički visoko značajno utječe na aktivnost peroksidaze, ali u nešto manjoj mjeri od ostale dvije varijable.

Budući da je utjecaj inovativnih tehnologija na aktivnost pojedinih enzima relativno neistražen, dostupna literatura često je ograničena i ponekad daje kontradiktorne informacije.

Koprivnjak (2006) navodi kako temperatura na kojoj je djelovanje polifenol oksidaze i peroksidaze izraženo iznosi 30 °C. Zato je moguće zaključiti kako će pri temperaturi ubrzanog toplinskog tretmana, koja je niža od optimalne temperature, aktivnost oba endogena enzima biti snižena. U svom radu Khali i Selselet-Attou (2007) su zaključili kako se aktivnost polifenol

oksidaze i peroksidaze značajno smanjuje ukoliko su ispitivani plodovi datulja skladišteni na temperaturama od 10 °C u odnosu na plodove koji su skladišteni na sobnoj temperaturi. Xu (2005) navodi kako se aktivnost polifenol oksidaze smanjuje s 1180 U/mg pri sobnoj temperaturi na 340 U/mg pri 4 °C, te naposljetku na 300 U/mg pri -20 °C. Ovo sniženje aktivnosti također je djelomično objašnjeno i smanjenjem dostupnih fenolnih tvari pri nižim temperaturama. Rezultati ovog rada samo se djelomično poklapaju s rezultatima iz literature, budući da aktivnost polifenol oksidaze nije detektirana u tijestu koje je tretirano ubrzanim toplinskim tretmanom s miješenjem, dok je aktivnost peroksidaze porasla. Također, u kombinacijama tehnologija u kojima je jedna od korištenih tehnologija ubrzan toplinski tretman, aktivnost polifenol oksidaze je niža nego u drugim pojedinim tehnologijama i ostalim kombinacijama tehnologija. Utjecaj u kombinacijama na aktivnost peroksidaze suprotan od utjecaja na polifenol oksidazu, tj. dolazi do porasta enzimске aktivnosti.

Utjecaj ultrazvuka na aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze može imati i pozitivan i negativan učinak, što ovisi ponajviše o intenzitetu primijenjenog ultrazvuka, ali i o vremenu tretiranja uzoraka. Tsikrika i sur. (2017) su zaključili kako se aktivnost peroksidaze smanjuje pri određenim kombinacijama intenziteta i vremena tretiranja ultrazvukom, a Zhang i sur. (2024) su zaključili isto za aktivnost polifenol oksidaze. Autori nadalje objašnjavaju kako je snižena aktivnost polifenol oksidaze pri danim parametrima rezultat razaranja sekundarne strukture i aktivnih mjesta tog enzima (Zhang i sur., 2024). S druge strane, Bi i sur. (2015) navode kako se aktivnost polifenol oksidaze povećava primjenom ultrazvuka, što je objašnjeno činjenicom da ultrazvuk razara stanične membrane i ostale stanične strukture, čime je povećana interakcija supstrata i enzima, čime je povišena aktivnost ovog enzima. U ovom radu primjena samog ultrazvuka dovela je do porasta aktivnosti oba enzima u odnosu na kontrolni uzorak, a u kombinacijama tehnologija dovela je do veće aktivnosti od kombinacija u kojima nije korišten ultrazvuk. Aktivnost peroksidaze je također rasla korištenjem ultrazvuka. Moguće je da je prilikom proizvodnje korištena pogrešna kombinacija intenziteta ultrazvuka i vremena tretiranja uzorka.

U literaturi se spominje kako pulsirajuće električno polje u većem ili manjem stupnju uspješno smanjuje aktivnost i polifenol oksidaze i peroksidaze. Yang i sur. (2004) navode kako korištenje pulsirajućeg električnog polja jakosti 33,6 kV/cm tijekom 126  $\mu$ s za polifenol oksidazu i 34,9 kV/cm tijekom 126  $\mu$ s za peroksidazu smanjuje aktivnost polifenol oksidaze za 38,2 %, a peroksidaze za 18,1 %. Inaktivacija enzima objašnjena je razaranjem sekundarne, tercijarne i kvarterne strukture enzima uslijed korištenja pulsirajućeg električnog polja, te topline generirane njegovom primjenom. Riener i sur. (2008) navode kako je kombinacija blagog zagrijavanja i primjene pulsirajućeg električnog polja snage 40 kV/cm u

vremenu od 100  $\mu$ s dovela do smanjenja aktivnosti polifenol oksidaze za 71% te peroksidaze za 68%. Slični rezultati dobiveni su i u ovom radu. Aktivnost polifenol oksidaze značajno je snižena kada je pulsirajuće električno polje korišteno kao predtretman miješenju, samo i u kombinacijama. U uzorcima koji nisu podvrgnuti miješenju aktivnost polifenol oksidaze je niža kada je kao jedna od tehnologija korišteno pulsirajuće električno polje. Sličan trend uočen je i kod peroksidaze.

Usporedbom rezultata iz tablice 4 vidljivo je kako miješenje ima značajan utjecaj na aktivnost oba enzima. Aktivnost oba enzima nakon miješenja je manja, a u nekim slučajevima aktivnost polifenol oksidaze nije ni detektirana.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Implementacija inovativnih tehnologija, ubrzanog toplinskog tretmana, ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja te njihovih kombinacija, značajno je smanjila aktivnost polifenol oksidaze a povećala aktivnost peroksidaze u tijestu maslina sorte levantinka.
2. Ubrzani toplinski tretman pokazao se kao najefikasniji u inaktivaciji polifenol oksidaze, i kad je korišten kao jedini tretman i u kombinacijama s ostalim inovativnim tehnikama, dok je na aktivnost peroksidaze imao suprotan učinak.
3. Primjena ultrazvuka povećala je aktivnost oba enzima.
4. Uvođenjem pulsirajućeg električnog polja u proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja kao predtretmana miješenju došlo je do smanjenja aktivnosti polifenol oksidaze a povećanja aktivnosti peroksidaze.
5. Značajan utjecaj na aktivnost oba enzima imala je faza miješenja. U fazi miješenja došlo je do značajnog smanjenja njihove aktivnosti, no to je smanjenje izraženije kod polifenol oksidaze.



## 6. POPIS LITERATURE

Bakarić P, Bjeliš M, Brekalo B, Bulimbašić-Botteri M, Duić-Pribičević V, Džidić L i sur. (2007) Maslina i maslinovo ulje od A do Ž, Naklada Zadro, Zagreb, str. 49-51.

Bi X, Hemar Y, Balaban MO, Liao X (2015) The effect of ultrasound on particle size, color, viscosity and polyphenol oxidase activity of diluted avocado puree. *Ultrason Sonochem* **27**, 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.011>

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

Esposito S, Veneziani G, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S, DiMaio I i sur. (2013) Flash Thermal Conditioning of Olive Pastes during the Olive Oil Mechanical Extraction Process: Impact on the Structural Modifications of Pastes and Oil Quality. *J Agric Food Chem* **61**, 4953–4960. <https://doi.org/10.1021/jf400037v>

Herceg Z, Krešić G, Režek Jambrak A, Rimac Brnčić S (2009) Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-74.

Holderbaum DF, Kon T, Kudo T, Guerra MP (2010) Enzymatic Browning, Polyphenol Oxidase Activity, and Polyphenols in Four Apple Cultivars: Dynamics during Fruit Development. *Hort Sci* **45**, 1150-1154. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.8.1150>

Jiang Y, Duan X, Qu H, Zheng S, Caballero B, Finglas PM i sur. (2016) Browning: Enzymatic Browning. U: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F (ured.) *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, str. 508–514. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00090-8>

Khali M, Selselet-Attou G (2007) Effect of heat treatment on polyphenol oxidase and peroxidase activities in Algerian stored dates. *Afr J Biotechnol* **6**, 790-794. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/56904>

Koprivnjak O (2006) Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, MIH, Poreč, str. 10-103

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>

Riener J, Noci F, Cronin DA, Morgan DJ, Lyng JG (2008) Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. *Food Chem* **109**, 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.059>

Škevin D (2016) Procesi prerade maslina i kontrola kvalitete proizvoda (interna skripta), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 20-33.

Tsikrika K, Chu BS, Bremner DH, Lemos MA (2017) The effect of different frequencies of ultrasound on the activity of horseradish peroxidase. *LWT - Food Sci Technol* **89**, 591–595. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.021>

Vischiot S (2004) Maslinarstvo: U vrtu i voćnjaku, 1. izd. (preveo Lukić B) Leo-commerce d.o.o., Rijeka, str. 32-36.

Xu J (2005) The effect of low-temperature storage on the activity of polyphenol oxidase in *Castanea henryi* chestnuts. *Postharvest Biol Technol* **38**, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.05.011>

Yang RJ, Li SQ, Zhang QH (2004) Effects of Pulsed Electric Fields on the Activity of Enzymes in Aqueous Solution. *J Food Sci* **69**, FCT241–FCT248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb06323.x>

Zhang S, Jiao W, Ni C, Hao G, Huang M, Bi X (2024) Effect of ultrasound on the activity and structure of polyphenol oxidase purified from mango (*Mangifera indica* cv. “Xiaotainong”). *LWT - Food Sci Technol* **203**, 116412. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116412>

## Izjava o izvornosti

Ja Sandra Kupfer 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