

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

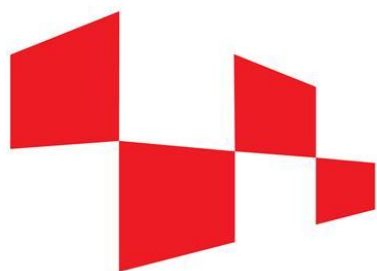
DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Ivana Hojka

**UTJECAJ ULTRAZVUKA I PULSIRAJUĆEG
ELEKTRIČNOG POLJA NA AKTIVNOST
LIPOKSIGENAZE U PLODU MASLINE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Klare Kraljić, te uz pomoć Katarine Filipan, mag. ing. aliment. techn.



HRZZ

Hrvatska zaklada
za znanost

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Klari Kraljić na mentorstvu i stručnim savjetima tijekom izrade mog diplomskog rada te na strpljenju i susretljivosti pri izradi. Također se zahvaljujem mag. ing. aliment. techn. Katarini Filipan na pomoći i savjetima za bolju i lakšu izradu rada. Isto tako zahvaljujem se prof. dr. sc. Dubravki Škevin i tehničkoj suradnici Melisi Trputec za pomoć, strpljenje i podršku pri radu.

Osobito se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene na svakom koraku mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ ULTRAZVUKA I PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA AKTIVNOST LIPOKSIGENAZE U PLODU MASLINE

Ivana Hojka, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058215077

Sažetak: Mogućnost inkorporacije inovativnih tehnologija, poput ultrazvuka (UZV) i pulsirajućeg električnog polja (PEP), u suvremenu proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja (DMU) predmet je brojnih istraživanja u posljednjem desetljeću. Navedene tehnologije, zbog svog djelovanja na staničnu strukturu, mogu povećati iskorištenje proizvodnje ulja, ali mogu djelovati i na kvalitetu, nutritivnu vrijednost i senzorska svojstva DMU. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj UZV i PEP na aktivnost lipoksigenaze u maslinama hrvatskih autohtonih sorti. Korištene su masline sorti rosulje, levantinke, oblice i istarske bjelice. Lipoksigenaza je izolirana iz tijesta tretiranog UZV-om (256 do 640 W, 3 do 17 min) ili PEP-om (1 do 8 kV/cm, 18 do 102 s), a njezina aktivnost određivana je mjerenjem količine hidroperoksida formiranih u reakciji enzima s linolenskom masnom kiselinom. Aktivnost lipoksigenaze u najvećoj je mjeri uvjetovana sortom masline. Od istraživanih sorti, rosulja posjeduje najveću aktivnost lipoksigenaze i njezina se aktivnost značajno smanjuje primjenom obje inovativne tehnike. Ostale istraživane sorte pokazuju različit odgovor na primijenjene tretmane a povećanje, odnosno smanjenje aktivnosti lipoksigenaze ovisi o primijenjenim parametrima.

Ključne riječi: lipoksigenaza, maslina, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, hrvatske autohtone sorte

Rad sadrži: 41 stranicu, 4 slike, 7 tablica, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnoškoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

Pomoć pri izradi: Katarina Filipan, mag. ing. aliment. techn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 20. prosinca 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

EFFECT OF ULTRASOUND AND PULSED ELECTRIC FIELD ON THE LIPOXYGENASE ACTIVITY OF OLIVE FRUITS

Ivana Hojka, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058215077

Abstract: The possibility of incorporating innovative technologies such as ultrasound (US) and pulsed electric field (PEF) in the modern production of virgin olive oil (VOO) has been the subject of numerous studies over the last decade. These technologies can increase oil yield due to their effect on cell structure, but they can also affect the quality, nutritional value and sensory properties of VOO. The aim of this study was to investigate the influence of US and PEF on lipoxygenase activity in olives from Croatian autochthonous varieties. The olive varieties used were Rosulje, Levantinka, Oblica and Istarska bjelica. Lipoxygenase was isolated from olive paste treated with US (256 to 640 W, 3 to 17 min) or PEF (1 to 8 kV/cm, 18 to 102 s) and its activity was determined by measuring the amount of hydroperoxides formed during the reaction of the enzyme with linolenic fatty acid. The results show that the lipoxygenase activity depends on the olive variety. Of the varieties studied, Rosulja variety has the highest lipoxygenase activity, which is significantly reduced by the two innovative techniques. Other varieties used in this study respond differently to the applied treatments, and the increase or decrease in lipoxygenase activity depends on the parameters applied.

Keywords: lipoxygenase, olives, ultrasound, pulsed electric field, Croatian autochthonous varieties

Thesis contains: 41 pages, 4 figures, 7 tables, 65 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Klara, Kraljić, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Katarina, Filipan, mag. ing. aliment. techn.

Reviewers:

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

Thesis defended: December 20th, 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ENDOGENI ENZIMI PLODA MASLINE	2
2.1.1. Lipaze.....	2
2.1.2. β -glukozidaza	2
2.1.3. Pektinaze.....	3
2.1.4. Polifenol oksidaza.....	3
2.1.5. Peroksidaza.....	4
2.1.6. Lipoksigenaza	4
2.2. SUVREMENA PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA	9
2.3. INOVATIVNE TEHNIKE U PROIZVODNJI DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA 10	
2.3.1. Ultrazvuk	11
2.3.2. Pulsirajuće električno polje (PEP).....	13
2.3.3. Utjecaj inovativnih tehnologija na kvalitetu i nutritivnu vrijednost djevičanskog maslinovog ulja	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Uzorci maslinovog tijesta	17
3.1.2. Tretman ultrazvukom	17
3.1.3. Tretman pulsirajućim električnim poljem	18
3.1.4. Popis kemikalija.....	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Priprema otopina	19
3.2.2. Određivanje enzimske aktivnosti lipoksigenaze	20
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	23
3.3. OBRADA PODATAKA	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. ULTRAZVUK	26
4.2. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE	29
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA	35

1. UVOD

Djevičansko maslinovo ulje je esencijalni sastojak mediteranske prehrane. Proizvod je velike komercijalne i nutritivne vrijednosti, zahvaljujući antioksidativnom djelovanju prisutnih bioaktivnih spojeva kao što su mono- i polinezasićene masne kiseline, fitosteroli, fenolni i hlapljivi spojevi. No njihova koncentracija varira ovisno o genetskom i geografskom podrijetlu sorte, agronomskim postupcima uzgoja i tehnološkim uvjetima proizvodnje ulja. Proizvođači djevičanskog maslinovog ulja susreću se sa problemima tijekom proizvodnje kao što je nisko iskorištenje procesa i slaba ekstrakcija bioaktivnih spojeva u ulje. U prošlom desetljeću počele su se istraživati inovativne tehnologije za unaprjeđenje procesa proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja. Inovativne tehnologije prvenstveno su usmjerene na povećanje iskorištenja procesa proizvodnje ulja ali i na poboljšanje kvalitete proizvoda. Koriste se kao alternativni sustavi miješenja kako bi se smanjilo vrijeme procesa i poboljšala radna učinkovitost bez negativnog utjecaja na parametre kvalitete. Inovativne tehnologije temelje se na razgradnji stanica ploda masline netermalnim tehnikama koji omogućuju stvaranje pora čime dolazi do povećanja propusnosti membrane s ukupnom posljedicom pucanja staničnih stijenki. To rezultira otpuštanjem mikro- i makrointracelularnih komponenti u vodenu fazu što posljedično dovodi do povećanja izdvajanja ulja iz masline. Neke od inovativnih tehnologija koje se istražuju su pulsirajuće električno polje i ultrazvuk. Dosadašnja istraživanja su pokazala kako ovi tretmani mogu utjecati na aktivnost endogenih enzima njihovom inaktivacijom ili aktivacijom. Lipoksigenaza je endogeni oksidoreduktivni enzim koji oksidira linolnu i linolensku masnu kiselinu do hidroperoksida. Njezina aktivnost neizmjenjivo je važna jer je lipoksigenaza jedan od prvih enzima lipoksigenaznog puta. Lipoksigenazni put predstavlja niz biokemijskih reakcija u kojima dolazi do sinteze hlapljivih komponenti koje su odgovorne za poželjne senzorske karakteristike djevičanskog maslinovog ulja. Povećanjem aktivnosti LOX dolazi do poboljšanja mirisa i okusa djevičanskog maslinovog ulja.

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj inovativnih tehnologija (ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja) na aktivnost enzima lipoksigenaze u maslinama hrvatskih autohtonih sorti. Tijekom proizvodnje maslinovo tijesto bilo je podvrgnuto tretmanu ultrazvukom ili pulsirajućim električnim poljem kao predtretman miješenju.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ENDOGENI ENZIMI PLODA MASLINE

Maslina ili uljika (*Olea europaea* L.) je drvo koje pripada porodici Oleaceae. Porijeklo su joj topla umjerena područja svijeta, a jedna je od najstarijih poznatih kultiviranih biljaka (Yahyaoui i sur., 2019). Plod maslina sam po sebi je složeni medij u kojem djeluje nekoliko endogenih enzima kao što su lipaze, glikozidaze, poligalakturonaze, celulaze, pektin-metilesteraze, lipoksigenaze, peroksidaze te polifenol oksidaze. Ovi enzimi su oslobođeni kada su tkiva ploda oštećena. Oštećenja mogu nastati mehanički tijekom berbe, napadom patogenih mikroorganizama i tijekom procesa skladištenja ili izdvajanja ulja (Hachicha Hbaieb i sur., 2015).

2.1.1. Lipaze

Lipaza je enzim koji razgrađuje pohranjene trigliceride. Hidrolizom triglicerida nastaju molekule mono- i digliceridi kao i alkohol glicerol te slobodne masne kiseline čija je prisutnost važan pokazatelj kvalitete djevičanskih maslinovih ulja (Panzanaro i sur., 2010). No slobodne masne kiseline biti će supstrat za lipoksigenazu i formiranje hidroperoksida (Clodoveo i sur., 2014). Lipaza se može naći u sjemenci i pulpi. Aktivnost lipaze se povećava tijekom razvoja masline, a opada u zrelosti masline (Panzanaro i sur., 2010). U istraživanju na plodovima masline Shodoshima (Japan) aktivnost lipaze se postupno smanjuje na temperaturama većim od 30 °C (Shimizu i sur., 2008), što sugerira da je lipaza nestabilna na visokim temperaturama. Postoje dva izoforma oblika lipaze s različitim biokemijskim karakteristikama, jednoj je optimalna aktivnost pri pH 5,0, dok drugoj pri pH 8,5. Lipaze se aktiviraju tijekom miješenja, a dugo razdoblje miješenja i visoke temperature tijekom miješenja donose ulja niže kvalitete (Panzanaro i sur., 2010; Clodoveo i sur., 2014).

2.1.2. β -glukozidaza

Mazzuca i sur. (2006) su u svom istraživanju locirali β -glukozidazu u plodovima maslina. U nezrelim plodovima vrlo je malo β -glukozidaze, a nalazi se u unutarnjoj zoni mezokarpa. U zelenim zrelim plodovima nalaze se raspoređeni po cijelom mezokarpu, dok u crnim

plodovima nalaze se samo u unutarnjem mezokarpu. Oleuropein, ligstrozid, demetiloleuropein, verbaskozid, glukozid elenolne kiseline, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, rutin i kvercetin-3-rutinozid čine glavne fenolne glikozide, koji se nalaze u plodovima masline. β -glukozidaza hidrolizira ove spojeve i prevodi fenolne spojeve koji nisu topljivi u ulju u topljivije i time povećava njihov udjel u ulju. Formirani aglikoni doprinose nutritivnoj vrijednosti i senzorskim karakteristikama djevičanskih maslinovih ulja (Hbaieb i sur., 2016; Mazzuca i sur., 2006). Jedan od glavnih supstrata β -glukozidazi je oleuropein, fenolni spoj koji daje gorki okus maslini (Ramírez i sur., 2016). Njegova uloga je obraniti plod od fitopatogena, konkretno kada su tkiva masline ozlijeđena patogenima ili imaju mehanička oštećenja (Mazzuca i sur., 2006). Hidrolizom oleuropeina nakon oštećenja masline proizvode se visoko reaktivne molekule s antioksidativnim i antimikrobnim djelovanjem (Clodoveo i sur., 2014). Brza kemijska hidroliza oleuropeina odvija se pri visokoj temperaturi od 40 °C te pri niskom pH 2,8 (Ramírez i sur., 2016).

2.1.3. Pektinaze

Pektinaze spadaju u skupinu hidrolitičkih enzima, sintetizira ih veliki broj biljaka i mikroorganizama a uključene su u razgradnju pektina. Pektin je složeni polisaharid prisutan u velikim količinama u staničnim stjenkama voća i povrća (Ortiz i sur., 2017). Pektinaze su prirodno prisutne u pulpi ploda masline i tijekom dozrijevanja cijepaju pektinski lanac u topljivije dijelove pektina što dovodi do mekšanja stanične stjenke ploda (Kashyap i sur., 2001). Zbog djelovanja na stanične stjenke, ovi enzimi se koriste u nekoliko industrijskih procesa za bistrenje voćnih sokova i vina, poboljšanje stabilnosti zamućenja u nektaru voća i povrća. Pektinaze su također uspješno korištene za povećanje iskorištenja procesa proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja i poboljšanje organoleptičkih svojstava ulja jer se njihovim djelovanjem posljedično povećao udjel fenola (Ortiz i sur., 2017).

2.1.4. Polifenol oksidaza

Polifenol oksidaza je enzim koji sadrži bakar i odgovoran je za enzimatsku reakciju posmeđivanja. Ona se javlja prilikom oštećenja i nepravilnog rukovanja voćem i povrćem, što dovodi do modrica, kompresije ili udubljenja. U prisutnosti molekularnog kisika polifenol oksidaza katalizira *o*-hidroksilaciju monofenola u *o*-difenole (aktivnost monofenolaze) i oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone (aktivnost difenolaze) (Hbaieb i sur., 2016; Clodoveo i sur.,

2014). Dokazano je povećanje aktivnosti polifenol oksidaze sa sazrijevanjem plodova. Ovaj se enzim nalazi na unutarnjoj strani tilakoida i u mitohondrijima. Molekularna masa razlikuje se među vrstama, kreće se između 25 i 64 kDa (Ortega-García i sur., 2010). Maksimalna aktivnost ovog enzima je pri pH 6,0, a njegova aktivnost se povećava s temperaturom do 25 °C. Potpuno se inhibira pri vrijednostima pH ispod 3,0, dok kod pH iznad 9,0 inaktivacija ovisi o temperaturi (Clodoveo i sur., 2014). Što se tiče toplinske stabilnosti, najstabilnija je pri 20 °C, a visok stupanj inaktivacije ima pri 40 °C. Utvrđeno je da se polifenol oksidaza nalazi u mezokarpu ploda dok u sjemenci nije detektirana. Polifenol oksidaza najvažniji je enzim uključen u fenolnu oksidaciju tijekom mljevenja maslina (Peres i sur., 2017).

2.1.5. Peroksidaza

Peroksidaza je glikoprotein, prisutan u različitim staničnim organelama, koji katalizira oksidaciju fenolnih spojeva do visoko reaktivnih i lako polimerizirajućih intermedijera slobodnih radikala pomoću oksidacijskog sredstva, vodikovog peroksida (H_2O_2) ili organskih peroksida (Peres i sur., 2017; Hbaieb i sur., 2016; Clodoveo i sur., 2014). Otporna je na toplinu i može se regenerirati nakon inaktivacije toplinom. Uglavnom je hem-željezni enzim. Katalizira oksidaciju niza organskih i anorganskih donora vodika kao što su fenoli, aromatski amini, askorbati i slično. Može katalizirati i druge vrste reakcija kao oksidaciju i hidroksilaciju. U plodu masline peroksidaza se nalazi u pulpi. Može se nalaziti u topljivom obliku (u citoplazmi) ili u vezanom obliku (na staničnoj stjenci). Općenito je uključena u fiziološke procese kao metabolizam u staničnoj stjenci, stres, obrana, tolerancija, zaštita od napadaja itd. Što se tiče toplinske stabilnosti, enzim se inaktivira zagrijavanjem na 50 - 60 °C tijekom 5 minuta. Najveća aktivnost peroksidaze u maslinama je pri 30 °C (Clodoveo i sur., 2014; Peres i sur., 2017).

2.1.6. Lipoksigenaza

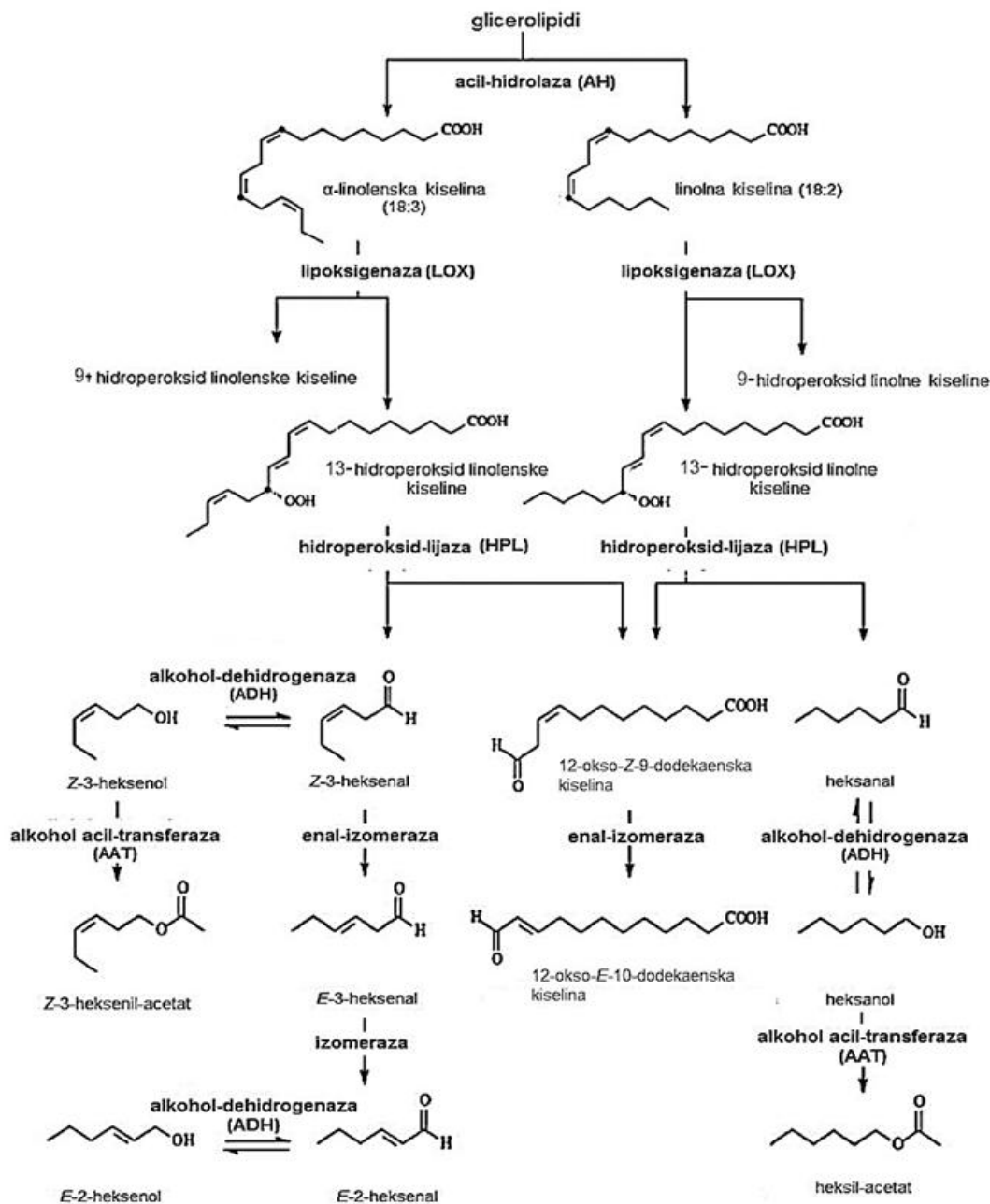
Lipoksigenaze (LOX) pripadaju skupini dioksigenaza koje sadrže nehemsko željezo, te su prisutne u životinjskim i biljnim stanicama. Kataliziraju hidroperoksidaciju 1,4-pentadienske sekvence u višestruko nezasićenim masnim kiselinama, npr. linolnoj (18:2), linolenskoj (18:3) i arahidonskoj (20:2), za proizvodnju njihovih odgovarajućih hidroperoksida (Lorenzi i sur., 2006; De Gregorio i sur., 2000; Salas i sur., 1999). LOX masline ima bolji afinitet za linolnu kiselinu nego za linolensku kiselinu (Clodoveo i sur., 2014). Hidroperoksidi koji su

proizvedeni LOX reakcijom brzo se pretvaraju u niz spojeva uključenih u razvoj biljaka (Lorenzi i sur., 2006). LOX se nalazi u biljkama i sisavcima, a prema novijim istraživanjima i u gljivama, koraljima i bakterijama (Soldo, 2016). Kod životinja najčešća uloga LOX-a je sinteza prekursora regulatornih molekula uključenih u upalne reakcije (De Gregorio i sur., 2000). Biljni LOX klasificiran je s obzirom na položajnu specifičnost oksidacija linolne kiseline na 9 (9-LOX) ili na 13 ugljiku (13-LOX) ugljikovodične okosnice masne kiseline. LOX također ima važnu ulogu u proizvodnji hlapljivih molekula koje utječu na okus i aromu biljnih proizvoda pa tako i djevičanskog maslinovog ulja (Lorenzi i sur., 2006). Budući da se djevičansko maslinovo ulje dobiva samo od maslina podvrgnutim mehaničkim postupcima (mljevenje, drobljenje, centrifugiranje), prirodni hlapljivi spojevi koji nastaju ugrađuju se u proizvedeno ulje, dajući njegovu aromu. Hlapljivi aldehidi i alkoholi sa šest ugljikovih atoma glavne su komponente arome djevičanskog maslinovog ulja. Najzastupljeniji među njima je 2(E)-heksenal, koji čini 50 do 70% ukupnih hlapljivih tvari i doprinosi pozitivnoj tipičnoj „zelenoj noti“ djevičanskih maslinovih ulja (Salas i sur., 1999).

LOX se najviše nalazi u pulpi maslina, njegov optimalni pH je u rasponu od 5,0 – 5,5 (Salas i sur., 1999), a njegova molekularna masa je 98 kDa (Clodoveo i sur., 2014). Što se tiče utjecaja temperature, uočeno je da je optimalna temperatura aktivnosti LOX enzima između 20 °C i 30 °C, pri višim temperaturama dolazi do njegove inhibicije (Clodoveo i sur., 2014).

2.1.6.1. Lipoksigenazni put

Postoje 4 oksidativna puta kojima živi organizmi mogu razgraditi sastojke masnih kiselina glicerolipida: α -oksidacija, β -oksidacija, ω -oksidacija i lipoksigenazni put. Od svih njih, samo LOX put relevantan je za stvaranje poželjnih hlapljivih tvari arome djevičanskog maslinovog ulja (Sánchez i Salas, 2000). Na slici 1. prikazane su reakcije LOX puta. Enzimi LOX puta oslobađaju se tijekom procesa prerade zbog oštećenja tkiva ploda masline. LOX put započinje acil-hidrolazom (AH) koja oslobađa kiseline iz glicerolipida, zatim LOX oksidira višestruko nezasićene masne kiseline do hidroperoksida. Hidroperokside cijepa hidroperoksid-liaza (HPL) čijim djelovanjem nastaju hlapljivi aldehidi. Aldehidi djelovanjem alkohol-dehidrogenaze (ADH) se reduciraju u alkohole, a acil-transferaza (ATT) ih prevodi u odgovarajuće estere (Soldo, 2016).



Slika 1. Lipoksigenazni put (LOX) nastanka tvari s poželjnim mirisnim svojstvima tijekom mljevenja i miješenja (Koprivnjak, 2006)

Oslobađanje masnih kiselina: lipolitička acilhidrolaza

Prvo je potrebno višestruko nezasićene masne kiseline osloboditi iz molekula glicerolipida djelovanjem lipolitičkih acilhidrolaza, skupine enzima koji uključuju lipaze, fosfolipaze i galaktolipaze (Sánchez i Salas, 2000). AH hidrolizira trigliceride i fosfolipide te se oslobađaju masne kiseline (Soldo, 2016). Zrele masline sadrže između 5 % i 20 %

višestruko nezasićenih masnih kiselina uglavnom linolne (18:2) i više od 2 % membranskih glicerolipida bogatih linolenskom (18:3) kiselinom (Sánchez i Salas, 2000) koje su preteče poželjnih hlapljivih C6 spojeva (Soldo, 2016).

Oksidacija polinezasićenih masnih kiselina: lipoksigenaza

LOX enzim djeluje pri uvjetima regiospecifičnosti i specifičnosti supstrata gdje nastaju odgovarajući hidroperoksidi masnih kiselina (Soldo, 2016). Molekula kisika može se uvesti u bilo koju od dvostrukih veza pentadienske sekvence čime nastaje hidroperoksid, a dvostruka veza se pomiče prema drugoj dvostrukoj vezi kako bi postala konjugirana (Sánchez i Salas, 2000). Iz ploda masline su izolirane 4 izoforme LOX enzima, LOX-1 i LOX-2, s 2 predstavnika iz svake. LOX-1 izoforme imaju veći afinitet prema linolnoj masnoj kiselini. Njihovi dominantni produkti su 9- i 13-Z,E-HPOD u omjeru 2:1, odnosno 4:1. Za razliku od LOX-1 LOX-2 izoforme pokazuju veći afinitet prema linolenskoj masnoj kiselini, a njihov produkt je 13-hidroperoksid masnih kiselina. LOX enzim, osim njegovog glavnog djelovanja, može i cijepati hidroperokside masnih kiselina, gdje se oslobađaju alkoksi radikali koji sudjeluju u reakcijama čiji produkti su C5 hlapljive tvari. Neke od C5 hlapljivih tvari su pentanal, E-2-pental, 1-penten-2-ol, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, Z-2-penten-1-ol i E-2-penten-1-ol. 1-penten-3-on je spoj koji može samostalno doprinijeti poželjnim mirisnim svojstvima, dok ostali spojevi mogu doprinijeti jedino kroz sinergijski učinak s drugim hlapljivim spojevima (Soldo, 2016).

Reakcija cijepanja: hidroperoksid liaza

Hidroperoksid liaza (HPL) katalizira cijepanje hidroperoksida masnih kiselina time se dobivaju hlapljivi aldehidi od 6 ili 9 ugljikovih atoma i okso kiseline od 9 ili 12 ugljikovih atoma. Broj ugljikovih atoma ovisi o korištenom supstratu, 13-hidroperoksidu linolne ili linolenske masne kiseline ili pak 9-hidroperoksidu istih masnih kiselina (Sánchez i Salas, 2000; Soldo, 2016). Najzastupljenija izoforma HPL kod biljaka ima supstratnu specifičnost prema 13-hidroperoksidima masnih kiselina. Ona je zaslužna za poželjne "zelene" mirise djevičanskog maslinovog ulja. Specifično, cijepanjem 13-hidroperoksida oslobađaju se C6 aldehidi, zasićeni heksanal iz linolne i nezasićeni Z-3-heksenal iz linolenske kiseline. Z-3-heksenal nestabilan je i brzo izomerizira u stabilniji E-2-heksenal. Aktivnost HPL je najviša kod pH 6,0 i pri temperaturi od 15 °C dok se povećanjem temperature iznad 35 °C snižava enzimska aktivnost, a inaktivira na temperaturi od 60 °C (Soldo, 2016). HPL je prvi put izolirana iz lubenice nakon čega se neprestano izolira i iz drugih vrsta biljnih tkiva. Razna istraživanja su pokazala da je HPL enzim homotrimer koji posjeduje hem skupinu (Sánchez i Salas, 2000).

Enalna izomerizacija

Djelovanje LOX i HPL na višestruko nezasićene masne kiseline rezultira proizvodnjom (Z)-3-enala od 6 ili 9 ugljikovih atoma, ovisno o regiospecifičnosti i supstratnoj specifičnosti. Spontanom izomerizacijom dolazi do stvaranja (E)-2-enala od kojih je najistaknutiji (E)-2-heksenal koji čini više od 50 % količine hlapljivih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju. Ovaj dio lipoksigenaznog puta je najmanje proučavan zbog poteškoća u pripremi vrlo nestabilnih supstrata (Sánchez i Salas, 2000).

Stvaranje hlapljivih alkohola: alkohol dehidrogenaza

Alkohol dehidrogenaza (ADH) katalizira reakciju alifatskih aldehida u njihove odgovarajuće alkohole. Njihove reakcije su reverzibilne. Rasprostranjene su u živim bićima gdje igraju važnu ulogu u procesima fermentacije i razgradnje etanola. Također, odgovorni su za stvaranje hlapljivih alkohola prisutnih u aromi biljnih proizvoda. Aktivnost ADH ovisi o nikotinamid adenin dinukleotid (reducirani oblik) (NADH), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP⁺), nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺). Također, otkriveno je da postoje 3 ADH u maslinama u razvoju (Sánchez i Salas, 2000).

Stvaranje estera: alkohol acil transferaza

Acil-transferaza (AAT) katalizira reakciju sinteze acetatnih estera uz pomoć derivata acetil-CoA. AAT ima niske vrijednosti aktivnosti što može biti razlog manjeg udjela hlapljivih estera u usporedbi s hlapljivim aldehydima i alkoholima. S obzirom da ostali enzimi LOX puta stvaraju velike količine C6 hlapljivih alkohola, AAT predstavlja usko grlo i dolazi do nakupljanja tih spojeva. Njihovo nakupljanje se smatra odgovorno za izražene travnate ali i za nepoželjne užegle note djevičanskog maslinovog ulja. AAT ploda masline ima supstrat specifičnost prema heksanolu i Z-3 heksenolu. Također ne pokazuje aktivnost prema metanolu i etanolu, pokazuje jako malu aktivnost prema butanolu i 3-metilbutanolu. Voćna i mirisna svojstva djevičanskom maslinovom ulju daju etil-propionat i heksil-acetat. Maksimalnu aktivnost AAT pokazuje pri temperaturi od 35 °C i optimalnom pH od 7,5 (Sánchez i Salas, 2000; Soldo, 2016).

2.2. SUVREMENA PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Masline se mogu brati ručno ili strojno. Tijekom berbe mogu se koristiti i drugi postupci kao protresanje stabala te u tim slučajevima treba postaviti mreže ispod stabala. Kako bi dobili visokokvalitetno ulje plod masline se treba brati bez kidanja pokožice i treba biti neoštećen. Zatim se masline transportiraju u uljaru, gdje se obrađuju u roku od 12 do 24 h (Di Giovacchino i sur., 2002; Vossen, 2007). Masline ulaze u uljaru pune lišća, grančica, prašine i drugih nečistoća koje treba ukloniti. Nečistoće se uklanjaju strujom zraka dok prolaze preko vibrirajućeg sita. Na rešetki zaostaju krupnije grane a plodovi se usisavaju u koš. Lišće i sitnije grančice uklanjaju se strujom zraka. Nečistoće mogu stvoriti probleme u proizvodnji kod rada strojeva, a i mogu negativno utjecati na senzorske karakteristike i mikrobiološku stabilnost ulja. Ostale nečistoće koje se nalaze na površini ploda uklanjaju se vodom, kratko se moče i ispiru mlazom vode (Škevin, 2016).

Mljevenjem ploda masline dolazi do razaranja stanične stijenke i posljedično do lakšeg izdvajanja ulja. Tijekom mljevenja ulje i specifične tvari koje se nalaze u kožici, sjemenci i pulpi, dolaze u međusobni kontakt i počinje niz kemijskih i biokemijskih reakcija koji određuju sastav i svojstva djevičanskog maslinovog ulja. Tijekom mljevenja i drobljenja može doći do stvaranja emulzija. Emulzija nastaje tako što male kapljice ulja okružuju tvari bipolarnog karaktera, nepolarni dio okreće se u kapljicu dok polarni se okreće prema vodi. Na taj način se smanjuje privlačna sila za spajanje kapljica i stvara se stabilna emulzija. Emulzija se može spriječiti manjim raspršivanjem ulja u sitne kapljice (Škevin, 2016). Dvije osnovne vrste strojeva za mljevenje maslina su kameni i metalni mlin. Većina maslina se drobi s košticom (Vossen, 2007). Usitnjavanje maslina može povećati temperaturu maslinovog tijesta jer se dio kinetičke energije mlinova pretvara u toplinsku energiju trenja (Di Giovacchino i sur., 2002). Sporo kretanje kamenih mlinova ne zagrijava maslinovo tijesto u tolikoj mjeri što rezultira manjim stvaranjem emulzija i lakšim odvajanjem ulja. Nedostatci kamenih mlinova su glomaznost stroja, visoka cijena, sporo mljevenje i nemogućnost kontinuiranog rada. Metalni mlinovi imaju veću brzinu, kompaktne su veličine i mogu kontinuirano raditi, iz tih razloga imaju veliki učinak i nisku cijenu. No, brzo mljevenje stvara emulziju i dolazi do većeg zagrijavanja maslinovog tijesta (Vossen, 2007).

Miješenje je priprema maslinovog tijesta za izdvajanje ulja. Ovim postupkom se postiže razbijanje emulzije. Miješenjem se također povećava količina izdvojenog ulja stvaranjem većih kapljica ulja. Maslinovo tijesto se miješa polako 30 do 60 minuta, a temperatura se drži na 26,6 do 30 °C. Time se poboljšava viskoznost ulja i samo izdvajanje ulja. Temperature više od 30 °C mogu stvarati probleme tako može doći do gubitka voćnog okusa, povećanja

gorčine i povećanja trpkosti (Vossen, 2007). Povećanjem temperature povećavaju se koncentracije (Z)-2-heksenala, heksan-1-ola i (Z)-2-heksen-1-ola te se smanjuju koncentracije C6 estera i (E)-3-heksen-1-ola. Varijacija vremena i temperature miješenja maslinovog tijesta ne utječe na sastav masnih kiselina, sterola, alifatskih i triterpenskih alkohola, triterpenskih di-alkohola, voskova, diglicerida i triglicerida u djevičanskom maslinovom ulju. Međutim, ako je temperatura viša od 50 ili 60 °C tvari poput voskova, alifatskih alkohola i triterpenskih di-alkohola mogu postati topljivije u uljnoj fazi čime se povećava njihova koncentracija u ulju. Tada je moguće da sadržaj tih tvari prelazi zakonom propisane granične vrijednosti (Di Giovacchino i sur., 2002).

Nakon miješenja slijedi izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta. Ulje se može izdvojiti prešanjem, centrifugalnom ekstrakcijom ili procjeđivanjem. Prešanje je starija metoda proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja, a ona uključuje primjenu pritiska na naslagane filtrirajuće slojnice prekrivene maslinovim tijestom koje se izmjenjuju s metalnim diskovima. Nedostatak ovakve proizvodnje je diskontinuiranost procesa a i filtrirajuće slojnice se mogu lako onečistiti i začepiti što može dovesti do prenošenja neugodnih mirisa i okusa, oksidacije i fermentacije. U procesu procjeđivanja oštrice od nehrđajućeg čelika uranjaju se u maslinovo tijesto. Ulje kaplje s oštrica u zasebnu posudu dok voda i krutine zaostaju. Izdvajanje ulja se zaustavlja kada se plod ili voda pojave u ulju. Centrifugalna ekstrakcija provodi se u dekanterima. To su vodoravne centrifuge koje odvajaju ulje od krutog i vodenog dijela. Postoje dvofazni i trofazni dekanteri. Trofazni dekanteri pomiču teže tvari prema van, u sredinu ide vodeni sloj, a u unutarnjoj strani se nalazi ulje kao najlakši sloj. Za visoku učinkovitost ovog postupka potrebno je dodati vodu, no time se ispiru antioksidansi, posebno fenoli. Dvofazni dekanteri odvajaju ulje od krutog dijela i vode s time da oni izlaze zajedno van. Dvofazno ekstrahirana ulja obično pokazuju više voćnih i zelenih okusa te više gorčine i pikantnosti (Vossen, 2007).

Nakon prerade ulje se mora izbistriti, bilo taloženjem (od 1 do 3 mjeseca) ili filtracijom. Tako se eliminira kontakt s vodom i talogom i smanjuje mogućnost pojave hidrolitičkog kvarenja ili formiranja nepoželjnih senzorskih karakteristika (Vossen, 2007).

2.3. INOVATIVNE TEHNIKE U PROIZVODNJI DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

Posljednjih godina se u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja istražuju nove tehnike poput ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja. Istražuju se zbog svojih pozitivnih učinaka

koji uključuju povećanu učinkovitost izdvajanja ulja, smanjeno vrijeme procesa proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja, nisku potrošnju energije i poboljšanje učinkovitosti postrojenja. Također, koriste se za poboljšanje nutritivnih vrijednosti i senzorske kvalitete djevičanskog maslinovog ulja (Yüksel Aydar, 2019; Veneziani i sur., 2019; Manganiello i sur., 2021). Međutim, većina napora usmjerena je na prevladavanje ograničenja tradicionalnog procesa miješenja. Ovaj korak je usko grlo u procesu proizvodnje i jedini korak koji blokira razvoj potpuno kontinuiranog procesa (Caponio i sur., 2019). Usprkos tome miješenje je ključni korak u jamčenju kvalitete gotovog proizvoda (Grillo i sur., 2022; Caponio i sur., 2019). Težnja za visokim profitom i većim iskorištenjem procesa tjera proizvođače na intenzivnije uvijete miješenja (vrijeme i temperaturu) što može imati negativan učinak na nutritivnu i senzorsku kvalitetu proizvoda (Grillo i sur., 2022). Općenito, inovativni procesi usmjereni su na miješenje, budući da je to temeljna faza u kojoj se odvijaju glavne transformacije, te je stoga odgovorna ne samo za konačni sastav odnosno okus ulja, već i za moguću degradaciju biološki aktivnih tvari (Boffa i sur., 2024). Nedostatak razvoja brzog procesa bi mogao biti smanjenje enzimske aktivnosti. Nakon mljevenja dolazi do pokretanja enzimske aktivnosti što dovodi do oslobađanja i/ili transformacije i hlapljivih i fenolnih spojeva. Imajući na umu da je trajanje procesa jedan od temeljnih parametara koji utječu na senzorske karakteristike, smanjenje trajanja procesa pomoću inovativnih tehnika bi moglo dovesti do smanjenja enzimske aktivnosti (Caponio i sur., 2019).

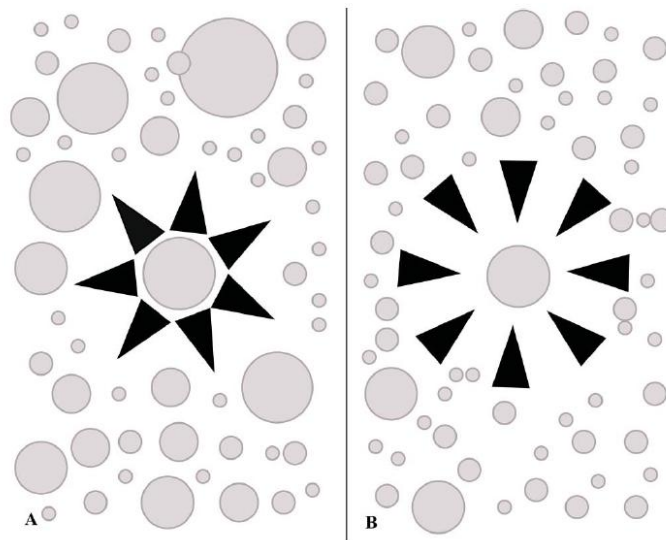
2.3.1. Ultrazvuk

Ultrazvuk je zvučni val frekvencija između 20 kHz i 100 MHz. Prema intenzitetu dijeli se na ultrazvuk niskog intenziteta (od 1 do 10 MHz) i ultrazvuk visokog intenziteta (od 20 do 100 kHz). Ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje kavitaciju, a posljedično i razaranje stanične membrane u biljnim tkivima (Nardella i sur., 2021).

Ultrazvuk se smatra jednom od obećavajućih nekonvencionalnih tehnika korištenih u proizvodnji hrane. Ova lako primjenjiva tehnologija nudi bolju učinkovitost procesa, smanjenje vremena i troškova (Grillo i sur., 2022). Najviše se koristi u prehrambenoj industriji za uništavanje stanica i izdvajanje unutarstaničnog materijala (Servili i sur., 2019).

Ultrazvuk može imati mehaničke i toplinske učinke. Do mehaničkog učinka dolazi tijekom procesa nastajanja uzdužnih valova. Zvučni val susreće tekući medij stvarajući područja naizmjenične kompresije i ekspanzije. Ta područja promjene tlaka uzrokuju fenomen kavitacije (slika 2.). Kavitacija se može definirati kao stvaranje, rast i kolaps mjehurića

ispunjenih parom i/ili plinom u tekućini. Energija koju mjehurić dobiva tijekom svog rasta oslobađa se tijekom naknadnog implozivnog kolapsa u trajanju od nekoliko mikrosekundi. Implozija stvara makroturbulencije, sudare među česticama velike brzine i poremećaje u mikroporoznim česticama biomase što ubrzava difuziju staničnog sadržaja (Servili i sur., 2019; Clodoveo, 2013). Kavitacija na površini proizvoda uzrokuje udarce mikromlaznice što donosi površinsko ljuštenje. Kavitacija u blizini tekućine – krutine šalje brzim tokom tekućinu na površinu. U većini slučajeva se kavitacija treba izbjegavati, međutim u procesu izdvajanja djevičanskog maslinovog ulja može biti korisna (Servili i sur., 2019). Toplinski učinak nastaje kada medij apsorbira kinetičku energiju ultrazvučnih valova. Kad je apsorbiraju tkiva, kinetička energija ultrazvuka također može se pretvoriti u toplinu. Kada se ultrazvučna energija širi u biljno tkivo, amplituda vala opada s udaljenošću. Budući da biljno tkivo može apsorbirati energiju za proizvodnju topline, može doći do porasta temperature (Clodoveo, 2013).



Slika 2. Stvaranje kavitacijskog mjehurića: (A) Kavitacijski rast mjehurića u negativnom tlaku; (B) kolaps mjehurića uslijed implozije (Islam i sur., 2014)

Korištenje ultrazvuka je zanimljiva inovacija jer ne utječe na kvalitetu, sastav i toplinska svojstva ulja a olakšava njegovo izdvajanje. Primjenom visokotlačnih ultrazvučnih valova na maslinovo tijesto između faza drobljenja i miješenja postiže se povećanje iskorištenja procesa izdvajanja ulja u usporedbi s tradicionalnom metodom. Svojim djelovanjem omogućuje veće oslobađanje aktivnih spojeva iz maslinovog tijesta, s pozitivnim utjecajem na sadržaj fenola. Ultrazvučnim valovima se mogu dobiti djevičanska maslinova ulja obogaćena ovim bioaktivnim spojevima (Manganiello i sur., 2021). Osim toga, ultrazvuk inaktivira patogene i mikroorganizme kvarenja hrane te pojačava ili inhibira enzimsku

aktivnost ovisno o parametrima obrade i vrsti enzima. Stoga tretman treba biti pažljivo osmišljen kako bi se proizvela ulja sa željenim karakteristikama. Naime prevelika snaga i/ili predugo vrijeme tretmana mogu štetno utjecati na stabilnost komponenti djevičanskog maslinovog ulja (Nardella i sur., 2021). Ultrazvuk je poznat po ubrzanju raznih procesa u prehrambenoj industriji. U proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja ultrazvuk skraćuje trajanje miješenja i omogućuje brzo zagrijavanje maslinovog tijesta. Ova tehnika se može lako prenijeti na industrijsku razinu što predstavlja prvi korak prema kontinuiranosti procesa. Kontinuirani proces ima razne prednosti kao što su manji operativni troškovi, manja ograničenja kapaciteta, brži povrat ulaganja, niži energetske troškovi i troškovi proizvodnje, brže i lakše čišćenje i kontrola kvalitete u stvarnom vremenu (Clodoveo i sur., 2013b).

2.3.2. Pulsirajuće električno polje (PEP)

PEP tretman uključuje primjenu kratkih impulsa visokog napona kako bi se poremetila ravnoteža stanica. Izlaganje stanične membrane električnom polju uzrokuje povećanje transmembranskog potencijala što dovodi do stvaranja pora, taj postupak se zove elektroporacija (Tamborrino i sur., 2019). Ovisno o intenzitetu tretmana (jakost električnog polja, broj i trajanje električnog impulsa) i svojstvima stanica (veličina, oblik, orijentacija, vodljivost) stvaranje pora može biti trajno ili privremeno (Clodoveo, 2013). Tretman se sastoji od vrlo kratkih električnih impulsa (od 1 do 100 s) pri intenzitetu električnog polja u rasponu od 0,1 do 1 kV/cm (reverzibilna permeabilizacija), od 0,5 do 3 kV/cm (nepovratna permeabilizacija) i od 15 do 40 kV/cm (ireverzibilna permeabilizacija). Kod reverzibilne permeabilizacije dolazi do stvaranja vodljivih kanala preko stanične membrane, ali se stanica može oporaviti unutar nekoliko sekundi. Kod ireverzibilne elektroporacije dolazi do gubitka turgora i istjecanja citoplazmatskog sadržaja (Clodoveo, 2013).

Kao i kod ultrazvuka PEP ima mehanički i toplinski učinak. Njegov mehanički učinak označava djelovanje na staničnu membranu odnosno na barijeru između vanjskog i unutarnjeg dijela stanice čime dolazi do njezinog pucanja i oslobađanja unutarstaničnih tvari (voda, ulje i antioksidansi) u vanjski medij. Primjenom PEP-a visokog intenziteta dolazi do trajnog pucanja stanične membrane. Kao rezultat PEP tretmana procesi kao prešanje ili izdvajanje ulja su učinkovitiji. Zbog ovog razloga koristiti se kao zamjena za tehnike koje troše energiju i vrijeme (konvencionalne ili mehaničke tehnike). Iako je PEP tretman definiran kao netermalna tehnologija postoji značajan porast temperature tijekom tretmana visokog intenziteta. Dolazi do lokalnih porasta temperatura zbog nehomogene raspodjele električnog polja, ograničene brzine protoka i recirkulacije tekućine. Taj porast temperature, ako

usporedimo s konvencionalnom termičkom metodom, je nizak (od 30 do 80 °C) i ne utječe na funkcijsku i hranjivu vrijednost proizvoda (Clodoveo, 2013).

PEP tretman se koristi u preradi hrane kao sredstvo za sterilizaciju i konzerviranje (Clodoveo, 2013) kao i u ekstrakciji voćnih sokova, ali i za zamrzavanje i sušenje hrane poboljšavanjem procesa prijenosa topline i mase (Tamborrino i sur., 2019). U proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja olakšava oslobađanje malih kapljica ulja iz stanice što omogućuje izvođenje miješenja pri nižim temperaturama bez smanjenja prinosa. Ima potencijala povećati sadržaj nutrijenata (polifenola, fitosterola i tokoferola), poboljšati dobrobiti za zdravlje potrošača i rok trajanja djevičanskog maslinovog ulja. Istovremeno omogućuje uštedu energije i vremena (Tamborrino i sur., 2019; Veneziani i sur., 2019; Clodoveo, 2013).

2.3.3. Utjecaj inovativnih tehnologija na kvalitetu i nutritivnu vrijednost djevičanskog maslinovog ulja

Djevičansko maslinovo ulje se sastoji od zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Neke od zasićenih masnih kiselina su laurinska, miristinska i palmitinska, dok nezasićene su oleinska palmitoleinska kiselina i gadoleinska kiselina (Šarolić i sur., 2014). Još jedna od važnih komponenti djevičanskog maslinovog ulja su fenoli. Najzastupljeniji su hidrofilni fenoli, kao prirodni antioksidansi, fenolni alkoholi, fenolne kiseline, flavonoidi, lignani i serkoiridoidi. Najčešći fenolni antioksidansi prisutni u plodu masline su sekoiridoidi, koji uključuju derivate oleuropeina, demetiloleuropeina i ligstrozida (Servili i Montedoro, 2002). Tu je još bitno reći da su hlapljivi spojevi važan dio djevičanskog maslinovog ulja. Hlapljivi spojevi nastaju već spomenutim lipoksigenaznim putem tijekom procesa izdvajanja ulja endogenim enzimima ali i auto- i fotooksidacijom masnih kiselina za vrijeme skladištenja (Cecchi i sur., 2021). To su spojevi male molekulske mase (do 300 Da) koji isparavaju na sobnoj temperaturi i odgovorni su za senzorske karakteristike (pozitivne i negativne) djevičanskog maslinovog ulja (Angerosa i sur., 2000).

Inaktivacija enzima ultrazvukom rezultat je sila smicanja koje nastaju stvaranjem i kolapsom kavitirajućih mjehurića ili slobodnih radikala nastalih tijekom sonolize molekula vode. Ultrazvukom, kako je već navedeno u radu, nastaju kavitacijski mjehurići. Implozijom mjehurići stvaraju snažnu cirkulaciju i snažna vrtložna strujanja u tekućini. Mikrostrujanje i implozija mjehurića dovode do ozbiljnog smičnog naprezanja i lokalno stvaraju visoke temperature (> 5000 K) i visoke tlakove. To uzrokuje denaturaciju enzima, odnosno njihovu

inaktivaciju. Osim denaturacije enzima u tim uvjetima dolazi i do stvaranja slobodnih radikala kao posljedica kemijskih promjena. Kemijski učinci su izraženiji na srednjim frekvencijama, dok su na višim frekvencijama manje vjerojatni. Inaktivacija enzima stvaranjem slobodnih radikala može se mjeriti brzinom stvaranja vodikovog peroksida. Proizvedeni slobodni radikali stupaju u interakciju s aminokiselinskim ostatcima enzima. Upravo aminokiselinski ostaci pomažu u stabilnosti strukture i vezanju supstrata a utjecajem na njihovu strukturu utječe se i na aktivnost enzima. Slobodni hidroksilni radikal (OH[•]) je najreaktivniji a njegova prisutnost smanjuje antioksidativna svojstva hrane, a može uzrokovati i loš okus. Mehanizmi djelovanja ultrazvuka na enzimске aktivnosti specifični su za one enzime koji ovise o sastavu aminokiselina i stabilnosti njihove konformacijske strukture. Promjene u konformaciji tercijarne strukture dovode do promjene trodimenzionalne strukture aktivnog mjesta što posljedično utječe na interakciju enzim - supstrat i dovodi do promjene aktivnosti enzima. Aktivnost enzima jako ovisi o intenzitetu ultrazvuka. Pokazalo se da se pod blagim ultrazvučnim zračenjem povećava aktivnost enzima. Blagi ultrazvuk potiče raspršivanje glomaznih agregata enzima. Takvi ultrazvučni tretmani mogu učiniti aktivno mjesto enzima dostupnijim za supstrat potencijalno povećavajući aktivnost enzima. Stoga je potrebno dobro odabrati odgovarajuće parametre ultrazvučnog tretmana (Islam i sur., 2014).

Taticchi i sur. (2019) u radu su opisali kako ultrazvuk visoke snage utječe na kakvoću djevičanskog maslinovog ulja. Nisu primijećeni nikakvi učinci na osnovne parametre kvalitete ulja. Koncentracije hidrofилnih fenola i α -tokoferola bile su povećane. Uočeno je da se utjecaj ultrazvučne tehnologije progresivno smanjuje s povećanjem indeksa zrelosti, time poništava pozitivan učinak na izdvajanje ulja i poboljšanje parametara kvalitete. Također uočeno je da se koncentracija hlapljivih spojeva nakon tretmana ultrazvukom smanjila. Bejaoui i sur. (2018) su pak objavili kako tretman ultrazvukom nije imao velikih učinaka na hlapljive komponente osim na (E)-2-heksenal čija se koncentracija mijenjala s jačinom ultrazvuka. Što se tiče senzorskih karakteristika primijetili su da su poboljšana pozitivna svojstva proizvedenog ulja. Isto tako nisu primijećeni okusi po zagorjelom ili užeglom. U drugom radu isti su autori (Bejaoui i sur., 2016) objavili kako tretman ultrazvukom nije uzrokovao promjenu indeksa kvalitete i sastava djevičanskog maslinovog ulja, ali ima tendenciju smanjenja fenolnih spojeva. Međutim u istraživanju Nardella i sur. (2021) utvrđeno je da prevelika snaga ultrazvuka i/ili predugi tretman može negativno utjecati na stabilnost komponenti djevičanskog maslinovog ulja.

Ulja proizvedena ultrazvukom su dobro prihvaćena kod potrošača. Ulja su značajno manje gorka, voćnija su, zelenija i trpkija. Razlog tome je manja količina polifenola što daje okus gorčine dok se hlapljivi spojevi povezani s negativnim senzorskim svojstvima nisu razvili

(Pérez i sur., 2021). Ultrazvučni tretman nije promijenio pokazatelje kvalitete kao udjel slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj i K232 i K270 (koji se odnose na primarnu i sekundarnu lipidnu oksidaciju). Povećani su tokoferoli, karotenoidi i klorofili, a smanjeni polifenoli. Utječe na voćne note, ali smanjuje gorak i opor okus što je posljedica smanjenja polifenola (Clodoveo i sur., 2013a). Endogeni enzimi se jako različito ponašaju nakon tretmana pa tako je aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze smanjena ili čak inaktivirana s povećanjem snage ultrazvuka, dok je aktivnost β -glukozidaze povećana nakon tretmana. Aktivnost LOX povećava se ultrazvučnim tretmanom na neko vrijeme a zatim se smanjuje (Nardella i sur., 2023).

PEP tretman se u prehrambenoj industriji koristi za inaktivaciju enzima. Istraživanja su pokazala da su enzimi peroksidaza, polifenol oksidaza, pektin metilesteraza i hidroperoksid liaza osjetljive na PEP tretman s 85 % do 100 % inaktivacije. Poligalakturonaza, LOX i β -glukozidaza su relativno otporni na tretman sa smanjenjem aktivnosti do 50 %. Najbolje vidljivo djelovanje je na primjeru jaja gdje dolazi do blage promjene proteina. U hrani dolazi do promjena u strukturi nakon tretmana što može dovesti do inaktivacije enzima. Kada se primjenjuje PEP visokog intenziteta dolazi do većeg deformiranja proteina. Promjene na proteinima se događaju zbog promjena sekundarnih i tercijarnih struktura (Zhao i sur., 2012). U istraživanju Veneziani i sur. (2019) primijećeno je da nakon tretmana PEP-om nije došlo do promjene u osnovnim parametrima kvalitete ulja. No pokazao se značajan porast fenolnih spojeva, dok je koncentracija hlapljivih tvari ostala ista. Slični rezultati su bili i u istraživanju Tamborrino i sur. (2019) s razlikom u smanjenoj koncentraciji nekih derivata oleuropeina, ligstrozida i u ukupnoj količini formiranih alkohola. Time se dobiva proizvod s jednakim intenzitetom cvjetnog mirisa i mirisa po pokošenoj travi, no smanjenog voćnog mirisa. Osim toga, PEP tretman ne uzrokuje stvaranje negativnih senzorskih karakteristika djevičanskog maslinovog ulja (Pérez i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci maslinovog tijesta

Kao materijal u ovom diplomskom radu korišteno je samljeveno maslinovo tijesto 4 autohtone hrvatske sorte maslina oblice, rosulje, levantinke, i istarske bjelice. Samljeveno maslinovo tijesto tretirano je ultrazvukom ili PEP-om. Nakon provedenih tretmana, maslinovo tijesto podvrgnuto je procesu miješenja na 27 °C u trajanju od 40 minuta. Oko 25 g tijesta izuzetog nakon miješenja brzo je zamrznuto kratkim uranjanjem u tekući dušik i skladišteno u zamrzivaču na - 20 °C do analiza.

3.1.2. Tretman ultrazvukom

Tretman ultrazvukom proveden je prema metodi opisanoj u diplomskom radu Brezjan (2023). Ukratko, plodovi masline (800 g) su podvrgnuti čišćenju i pranju nakon čega su samljeveni na mlinu čekićaru koji je dio laboratorijske pilot-uljare Abencor (MC2 Ingeniería y Sistemas S.L., Sevilla, Španjolska). Dobiveno maslinovo tijesto potom se tretiralo ultrazvukom pomoću ultrazvučne kupelji Sonorex Digiplus (BANDELIN electronic, Berlin, Njemačka), maksimalne snage od 640 W, napona od 120 do 240 V i frekvencije od 20 kHz. Tretman ultrazvukom proveden je prema centralnom kompozitnom planu, varirajući snagu ultrazvučne kupelji od 256 do 640 W te vrijeme trajanja tretmana od 3 do 17 min. Korišteni parametri za svaki tretman prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Uvjeti tretmana maslinovog tijesta ultrazvukom

Uzorak	Vrijeme tretmana (min)	Snaga ultrazvučne kupelji (W)
1	-	-
2	10	256
3	5	320
4	15	320
5	3	448
6	10	448
7	17	448
8	5	576
9	15	576
10	10	640

3.1.3. Tretman pulsirajućim električnim poljem

Kao i kod tretmana ultrazvukom, plodovi su prvo podvrgnuti čišćenju i pranju. Čisti plodovi su samljeveni na mlinu čekićaru iz poluindustrijske uljare OLEUM 30 COMPACT (Enotecnica Pillan, Camisano Vicentino, Italija). Tretman PEP-om proveden je na uređaju HVG60/1 PEP (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) prije miješenja. PEP tretman provodi se prema metodi opisanoj u završnom radu Makovac (2023) varirajući snagu električnog polja od 1 do 8 kV/cm te vrijeme trajanja tretmana od 18 do 102 s (prema centralnom kompozitnom planu prikazanom u tablici 2).

Tablica 2. Uvjeti tretmana maslinovog tijesta pulsirajućim električnim poljem

Uzorak	Vrijeme tretmana (s)	Jakost električnog polja (kV/cm)
1	-	-
2	60	1
3	30	2
4	90	2
5	18	4,5
6	60	4,5
7	102	4,5
8	30	7
9	90	7
10	60	8

3.1.4. Popis kemikalija

- Acetonitril (>99,8 %)
- Benzamid (>95,0 %, Sigma- Aldrich, Zagreb, Hrvatska)
- Butilhidroksitoluen (Sigma- Aldrich, Zagreb, Hrvatska)
- Coomassie Brilliant blue G 250 (Sigma- Aldrich, Zagreb, Hrvatska)
- D-(-)-Norleucin (99 %, Alfa Aesar, Waltham, SAD)
- di-natrij-hidrogenfosfat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (96 %, Lach-Ner, Zagreb, Hrvatska)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (>98,5 %, Sigma- Aldrich, Zagreb, Hrvatska)
- Fenil metilsulfonilfluorid (>98,5 %, Sigma- Aldrich, Zagreb, Hrvatska)
- Fosforna kiselina
- Klorovodična kiselina

- Izopropanol (Honeywell, Riedel- de Haen, Charlotte, North Carolina, SAD)
- Natrijev hidroksid
- Natrij-dihidrogenfosfat-2- hidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- n-Heksan (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina (>99,8 %, Honeywell Fluka, Charlotte, North Carolina, SAD)
- Triton X-100 (Sigma- Aldrich, Zagreb, Hrvatska)
- Tween-40 (Honeywell Fluka, Charlotte, North Carolina, SAD)
- α - Linolenska kiselina (>99 %, Sigma- Aldrich, Zagreb, Hrvatska)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema otopina

Fosfatni pufer pH 6,7 (c=0,1 mol/L): 6,374 g natrij dihidrogen fosfata dihidrata i 8,1300 g bezvodnog dinatrij hidrogen fosfata otopi se u 800 mL destilirane vode. Željena pH vrijednost se uspostavi pomoću pH-metra dodavanjem 3 mol/L klorovodične kiseline. Nakon podešene pH vrijednosti sadržaj se prebaci u odmjernu tikvicu od 1 L koja se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Fosfatni pufer pH 6,0 (c=0,1 mol/L): 6,7322 g natrij dihidrogen fosfata dihidrata i 0,82184 g bezvodnog dinatrij hidrogen fosfata otopi se u 400 mL destilirane vode. pH vrijednost podesi se dodavanjem 4 mol/L natrijeva hidroksida nakon čega se sadržaj kvantitativno prebaci u odmjernu tikvicu od 0,5 L i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Otopina za izolaciju lipoksigenaze: u tikvicu od 500 mL se izvaže 0,53 g Tritona, 0,1461 g etilendiamintetraoctene kiseline, 0,00878 g fenil metilsulfonilfluorida, 0,00601 g benzamida i 0,3279 g D-norleucina. Tikvica se do oznake nadopuni fosfatnim puferom (c= 0,1 mol/L; pH 6,7). Kako bi se pospješilo otapanje kemikalija, tikvicu je potrebno barem pola sata staviti u ultrazvučnu kupelj.

Supstrat (otopina α -linolenske masne kiseline; c=25 mmol/L): pripremljen je kako su opisali Axelrod i sur. (1981). U tikvicu od 25 mL doda se 192 μ L α - linolenske kiseline i 256 μ L Tween-405 mL i otopi u 5 mL deionizirane vode propuhane dušikom. Sadržaj tikvice se pažljivo miješa kako ne bi došlo do pjenjenja. Dodaje se još 600 μ L 1 mol/L NaOH kako bi se pospješilo otapanje masne kiseline. Tikvica se nadopuni vodom propuhanom dušikom. Otopina supstrata se razdjeli na alikvote i skladišti u zamrzivač na -80 °C do korištenja.

Bradford-ov reagens: u odmjernu tikvicu od 500 mL se izvaže 50 g Coomassie Brilliant Blue G-250. Doda se 25 mL 95 % etanola i 50 mL 85 % fosforne kiseline. Tikvica se dobro promiješa i nadopuni destiliranom vodom.

3.2.2. Određivanje enzimске aktivnosti lipoksigenaze

Izolacija lipoksigenaze

Izolacija enzima lipoksigenaze provodila se prema modificiranoj metodi opisanoj u radu Luaces i sur. (2005). U plastičnu kivetu od 50 mL izvaže 5 g smrznutog maslinovog tijesta. U kivetu se zatim dodaje 20 mL otopine za izolaciju lipoksigenaze. Ekstrakcija se provodi na homogenizatoru (GLH850, Omni International, Kennesow, SAD) pri brzini 11000 o/min u dva ciklusa od jedne minute s minutom pauze između ciklusa. Kivete moraju biti uronjene u ledenu kupelj kroz cijeli postupak ekstrakcije enzima. Uzorak se filtrira u plastičnu kivetu, koja je također uronjena u ledenu kupelj, preko Buchnerovog lijevka kroz dva sloja Miracloth filtera (EMD Milipore Corp, Burlington, SAD). Dobiveni filtrat se centrifugira pri temperaturi od 4 °C na 27 000 o/min kroz 30 minuta (Rotina 22 380, Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Supernatant se odvoji u staklenu epruvetu i dalje koristi kao sirovi enzimski ekstrakt. Pripremljena otopina se stavi temperirati u vodenu kupelj na 25 °C 30 minuta zajedno sa supstratom i fosfatnim puferom (0,1 mol/L; pH 6,0).

Određivanje aktivnosti lipoksigenaze

Određivanje aktivnosti lipoksigenaze provedeno je prema modificiranoj metodi opisanoj u doktorskoj disertaciji Soldo (2016). U vijalicu od 20 mL u koju je stavljen magnetički za miješanje dodaje se 4 mL fosfatnog pufera (0,1 mol/L, pH=6,0), 500 µL supstrata (α -linolenske masne kiseline) i 500 µL enzimskog ekstrakta. Enzimska reakcija sinteze hidroperoksida oktadekatrienske kiseline (HPOT) provodi se na magnetskoj miješalici (Ika Werke RTS- power, Staufen, Njemačka) 30 minuta pri temperaturi od 25 °C. Reakcija se zaustavlja zakiseljavanjem reakcijske smjese do pH=2 dodavanjem 3 mol/L klorovodične kiseline.

U reakcijsku smjesu se zatim dodaje 1 mL internog standarda, 0,25 mmol/L butilhidroksitoluena (BHT), otopljenog u heksanu. Slijedi izolacija HPOT otopinom heksan:izopropanol u omjeru (95:5; V:V). U reakcijsku smjesu doda se 10 mL otopine za izolaciju HPOT i promiješa na Vortex-u 30 sekundi (LLG Labaware uniTexer, Njemačka, Meckenheim). Nakon odvajanja faza, gornji sloj se odvoji, a izolacija HPOT iz smjese se

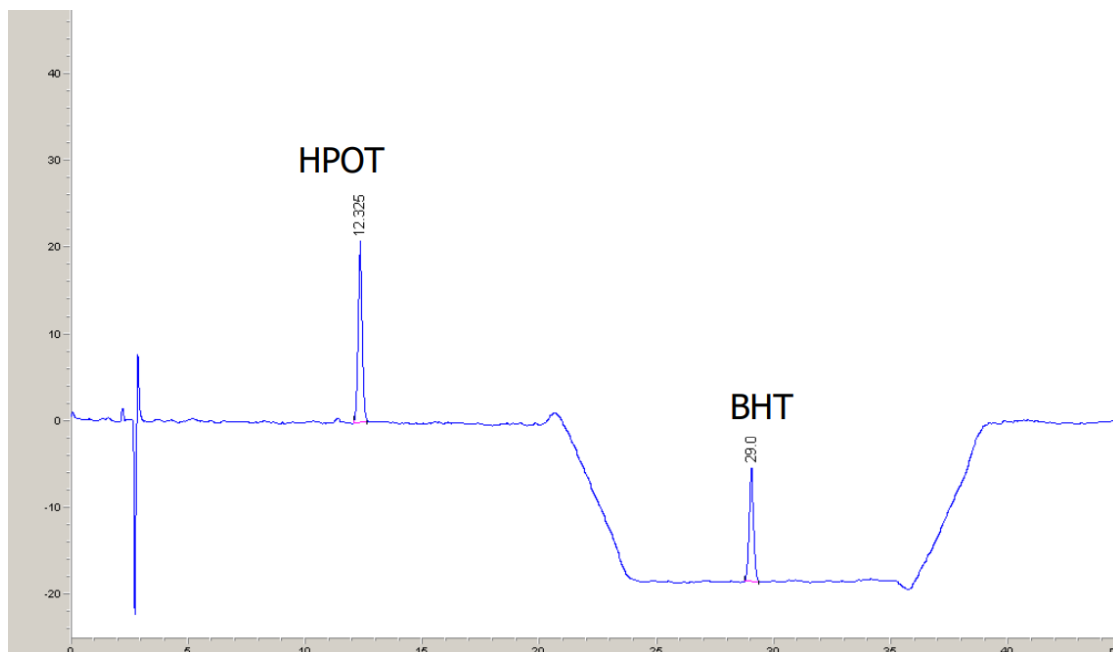
ponovi još 2 puta. Nakon treće ekstrakcije smjesa se, prije odvajanja faza, centrifugira 10 minuta na 5000 o/min (Rotina 380, Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Sva 3 ekstrakta se spoje a otapalo se upari do suha pomoću rotacionog uparivača (Heidolph, Njemačka, Schwabach). Uparavanje se provodi na temperaturi od 40 °C i tlaku od 200 mbara. Suhi ekstrakt se otopi u 1,5 mL otopine acetonitril:voda u omjeru (67:33; V:V). Otapanje se pospješuje kratkim uranjanjem tikvice sa otopinom u ultrazvučnu kupelj Bandelin sonorex digiplus (Bandelin electronic, Berlin, Germany). Tako pripremljen uzorak injektira se u HPLC.

Izolirani hidroperoksidi analizirani su pomoću Agilent Technologies LC 1200 HPLC sustava (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. Mobilne faze korištene za razdvajanje hidroperoksida su 0,25 % otopina octene kiseline u vodi (mobilna faza A) i acetonitril (mobilna faza B) ukupnog protoka 1 mL/min kroz čitavo vrijeme trajanja analize. Korišteni gradijent prikazan je u tablici 3. 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 duljini od 350 nm, bandwidth 50 nm. Kroz cijelo vrijeme analize snimani su i UV spektri od 190 do 400 nm.

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

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

Za identifikaciju hidroperoksida korišten je komercijalno dostupan standard 13(S)-hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienske kiseline (HPOT) koji je injektiran u HPLC uz BHT kao interni standard pod jednakim uvjetima kao i uzorci. Kromatogram injektiranih standarada prikazan je na slici 3.



Slika 3. Kromatogram 13(S)- hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienske kiseline (HPOT) za identifikaciju hidroperoksida i BHT interni standard

Množine formiranih hidroperoksida izražene u μmol izračunate su iz površina ispod pikova detektiranih hidroperoksida prema formulama [2] do [5], a AE izražena u mg proteina/ μmol HPOT izračunata je po formuli [6].

$$n(\text{HPOT}) = \frac{\Sigma A \cdot n_{\text{BHT}} \cdot \text{RRF}_{\text{BHT/HPOT}}}{A_{\text{BHT}}} \quad [2]$$

Gdje je:

$n(\text{HPOT})$ – množina formiranih hidroperoksida (μmol)

ΣA – suma površina ispod pikova hidroperoksida

A_{BHT} – površina ispod pika BHT-a

n_{BHT} – množina BHT-a (μmol) dodanog u uzorak dodatkom 1 mL otopine internog standarda

$\text{RRF}_{\text{BHT/HPOT}}$ – korekcijski faktor za izražavanje rezultata preko hidroperoksida α -linolenske masne kiseline (HPOT) (formula [3])

$$\text{RRF}_{\text{BHT/HPOT}} = \frac{\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT})}{\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{HPOT})} \quad [3]$$

Gdje je:

$\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT})$ – faktor odziva BHT-a koji se računa po formuli [4]

$$\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT}) = \frac{\text{površina pika BHT}}{\mu\text{mol injektiranog BHT}} \quad [4]$$

RF_{1μmol} (HPOT) - faktor odziva HPOT koji se računa po formuli [5]

$$RF_{1\mu\text{mol}}(\text{HPOT}) = \frac{\text{površina pika HPOT}}{\mu\text{mol injektiranog HPOT}} \quad [5]$$

$$AE = \frac{\gamma(\text{proteina}) * V}{n(\text{HPOT})} \quad [6]$$

Gdje je:

AE – aktivnost enzima (mg/μmol)

n(HPOT) – koncentracija nastalih hidroperoksida (μmol)

γ(proteina) – koncentracija proteina u otopini enzima (mg/mL)

V – volumen enzimskog ekstrakta korišten u reakciji (mL)

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Određivanje koncentracije proteina u pripremljenim enzimskim ekstraktima provodi se metodom po Bradfordu koja je opisana u radu Bonjoch i Tamayo (2001). U polimernu mikrokivetu doda se 280 μL otopine za izolaciju lipoksigenaze, 20 μL pripremljenog enzimskog ekstrakta i 1,2 mL Bradford-ovog reagensa nakon čega se mikrokiveta poklopi i dobro protrese. Nakon 5 minuta reakcije na sobnoj temperaturi, izmjeri se apsorbancija na 595 nm uz slijepu probu (0,3 mL otopine za izolaciju lipoksigenaze i 1,2 mL Bradford-ovog reagensa). Očitane vrijednosti apsorbancija trebaju biti u rasponu od 0,2 do 0,8.

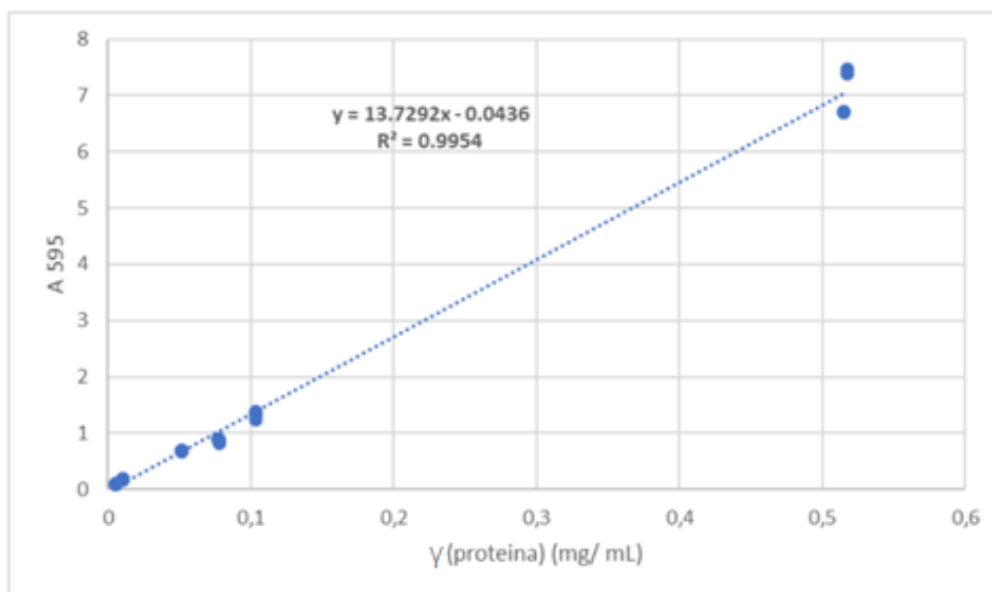
Koncentracija proteina u enzimskim ekstraktima izračuna se iz baždarne krivulje [formula 7] pripremljene pomoću standardne otopine proteina albumina goveđeg seruma u rasponu koncentracija od 0,005 do 0,5 mg/mL (slika 4).

$$c(\text{proteina}) = \frac{A + 0,0436}{13,7292} \quad [7]$$

gdje je:

A - apsorbancija pri 595 nm

γ(proteina) - koncentracija proteina iskazana u mg/mL enzimskog ekstrakta.



Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije na 595 nm o koncentraciji proteina (γ)

3.3. OBRADA PODATAKA

Kako bi se odredio utjecaj sorte, snage ultrazvučne kupelji (kod tretmana ultrazvukom), jakosti električnog polja (kod PEP tretmana) i vremena tretmana provedena je analiza varijance (ANOVA *Two Factor With Replication*). Dodatno je proveden i Tukey-ev test višestruke usporedbe kako bi se utvrdile razlike između primijenjenih parametara tretmana u aktivnosti lipoksigenaze unutar pojedine sorte. Oba korištena statistička testa provedena su s razinom vjerojatnosti od 95 % ($p \leq 0,05$) koristeći program XLSTAT-u (Lumivero, Denver, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Većina hlapljivih spojeva koji karakteriziraju djevičanska maslinova ulja nastaju tijekom faze miješenja u nizu biokemijskih reakcija koje se nazivaju lipoksigenazni put. (Nardella i sur., 2021). Lipoksigenaza (LOX) drugi je enzim lipoksigenaznog puta. Katalizira oksidaciju nezasićenih masnih kiselina, linolne i linolenske kiseline i time proizvodi njihove odgovarajuće hidroperoksidi. Hidroperoksidi su prekursori važnih hlapljivih spojeva. Biosinteza hlapljivih spojeva uglavnom ovisi o dostupnosti supstrata tijekom procesa ekstrakcije i o enzimskoj aktivnosti (Peres i sur., 2017).

Inovativne tehnike obrade hrane u posljednje vrijeme sve se više istražuju zbog svojih prednosti u odnosu na konvencionalne tehnike. One teže boljem zadržavanju nutritivnih i senzorskih svojstava prehrambenih proizvoda (Khan i sur., 2018). Implementacija inovativnih tehnologija u proizvodnju DMU istražuju se s ciljem povećanja iskorištenja procesa proizvodnje ulja uz poboljšavanje kvalitete ulja. Njihova primarna uloga je dodatno narušavanje stanične strukture čime se oslobađa unutarstanični sadržaj. Svaka tehnologija različito djeluje na staničnu strukturu ploda masline. Djelovanje inovativnih tehnologija povezano je s brzim promjenama temperature, tlaka, energije, električnog potencijala ili neke od kombinacija (Taticchi i sur., 2019). Kod obje inovativne tehnike korištene u ovom radu (ultrazvuk - UZV i pulsirajuće električno polje - PEP) primijećeno je da utječu na enzimsku aktivnost (Taticchi i sur., 2019; Nardella i sur., 2021).

Aktivacijom LOX dolazi do povećane sinteze hlapljivih spojeva LOX puta što je poželjno u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja. Dosadašnja istraživanja aktivnosti LOX su pokazala kako ona ovisi o sorti, indeksu zrelosti, vremenu izlaganja tretmanu i jačini tretmana. Cilj ovoga rada bio je odrediti kako korištenje UZV i PEP-a u proizvodnji DMU utječe na aktivnost LOX u maslinama iz 4 hrvatske autohtone sorte (rosulja, levantinka, oblica i istarska bjelica). Tijekom proizvodnje DMU, svježe samljeveno maslinovo tijesto tretirano je UZV ili PEP prije faze miješenja. Aktivnost LOX određivala se iz tijesta izuzetog nakon miješenja koje je bilo brzo smrznuto i skladišteno na -20 °C. Rezultati aktivnosti LOX prikazani su u tablicama kao srednje vrijednosti 4 paralelna određivanja uz pripadajuće standardne devijacije. Važno je napomenuti da najviša vrijednost označava najmanju enzimsku aktivnost.

4.1. ULTRAZVUK

UZV se sastoji od zvučnih valova koji imaju frekvenciju iznad 16 kHz, njih ljudsko uho ne može detektirati. To je tehnologija koja osigurava kvalitetu i očuvanje hrane kroz minimalnu obradu. Obično se koristi na sobnoj ili nižoj temperaturi (Nunes i sur., 2023).

Utjecaj UZV na aktivnost enzima ovisi o primijenjenim parametrima, kao što su frekvencija i snaga, i čimbenicima povezanim s enzimima, kao što su tip enzima, koncentracija, pH medija i temperatura. Mehanizam inaktivacije enzima razlikuje se ovisno o vrsti enzima. Opći trendovi inaktivacije monomernih enzima su ili stvaranje agregata ili razgradnja molekule enzima na fragmente. Polimerni enzimi općenito se fragmentiraju u monomerne oblike tijekom ultrazvučne inaktivacije (Mawson i sur., 2010). S druge strane, struktura i funkcija bioloških molekula može se promijeniti ultrazvučnim djelovanjem, a procesi katalizirani enzimima mogu se aktivirati (Yahyaoui i sur., 2019). Povećanje aktivnosti enzima se dobiva korištenjem UZV tretmana na odgovarajućim frekvencijama i razinama intenziteta zbog različitih učinaka. Ti se učinci mogu podijeliti na fizičke i (bio-)kemijske učinke. Fizički učinci su poboljšanje prijenosa mase zbog mikromiješanja, što rezultira povećanjem dostupnosti supstrata i otpuštanjem enzima zbog raspada stanica. Može doći do povećanja biokemijskih reakcija unutar staničnih tkiva radi povećanja proizvodnje specifičnih enzima (Mawson i sur., 2010).

Rezultati aktivnosti LOX u tijestu maslina tretiranih UZV izraženih u mg proteina potrebnih za sintezu 1 μ mol hidroperoksida oktadekatrienske kiseline (HPOT) prikazani su u tablici 4. Može se primijetiti da se aktivnost LOX značajno razlikuje između istraživanih sorata pa tako rosulja ima najveću aktivnost LOX, a aktivnost pada redom u tijestu sorti levantinka, oblica i istarska bjelica. U prijašnjim je istraživanjima dokazano da sorta značajno utječe na sastav hlapljivih tvari djevičanskog maslinovog ulja. To se događa zbog nasljednih enzima povezanih s njihovim genetskim karakteristikama (Cecchi i sur., 2021). U radu Butula (2023) promatrali su se endogeni enzimi autohtonih plodova maslina u 3 stupnja zrelosti kako bi se definirao utjecaj indeksa zrelosti i sorte na aktivnost enzima. Aktivnost LOX pokazala se kao sortna karakteristika. Također, u istom je radu dokazano kako postoji statistički značajan utjecaj indeksa zrelosti na aktivnost enzima.

Tablica 4. Aktivnost lipoksigenaze (mg proteina/ μ mol hidroperoksida oktadekatrienske kiseline (HPOT)) u tijestu hrvatskih autohtonih sorti masline tretiranih ultrazvukom

Parametri tretmana		Sorta			
Vrijeme tretmana (min)	Snaga ultrazvučne kupelji (W)	Rosulja	Levantinka	Oblica	Istarska bjelica
0	0	0,020 \pm 0,001 c	0,176 \pm 0,015 d	0,253 \pm 0,007 b	0,293 \pm 0,010 a
10	256	0,133 \pm 0,004 b	1,098 \pm 0,121 a	0,289 \pm 0,018 ab	0,038 \pm 0,003 c
5	320	0,106 \pm 0,003 b	0,782 \pm 0,136 a	0,313 \pm 0,005 a	0,056 \pm 0,012 c
15	320	0,119 \pm 0,004 b	0,339 \pm 0,027 b	0,137 \pm 0,005 d	0,054 \pm 0,004 c
3	448	0,115 \pm 0,007 b	0,102 \pm 0,019 e	0,193 \pm 0,009 c	0,258 \pm 0,025 b
10	448	0,109 \pm 0,004 b	0,184 \pm 0,004 d	0,179 \pm 0,011 c	0,054 \pm 0,001 c
17	448	0,362 \pm 0,063 a	0,282 \pm 0,018 bc	0,256 \pm 0,011 b	0,041 \pm 0,011 c
5	576	0,146 \pm 0,010 b	0,087 \pm 0,003 e	0,292 \pm 0,020 ab	0,246 \pm 0,012 b
15	576	0,119 \pm 0,007 b	0,267 \pm 0,034 bc	0,249 \pm 0,018 b	0,242 \pm 0,014 b
10	640	0,119 \pm 0,002 b	0,251 \pm 0,017 c	0,179 \pm 0,020 c	0,050 \pm 0,001 c

vrijednosti označene različitim slovima unutar pojedine sorte su statistički različite ($p \leq 0,005$) prema Tukey-evom testu višestruke usporedbe.

Prema Tukey-evom testu višestruke usporedbe može se uočiti da sorte pokazuju različit odgovor na primijenjene tretmane UZV. Kod rosulje je vidljivo smanjenje LOX aktivnosti kod svih tretmana s obzirom na kontrolu, a pogotovo pri 17 min 448 W gdje je najniža. I aktivnost LOX u tijestu sorte levantinka se većinom smanjuje UZV tretmanom u usporedbi sa kontrolom. Najmanju aktivnost pokazuje pri 10 min i 256 W, a najveću pri 5 min i 576 W. Na oblicu je UZV tretman podjednako pozitivno i negativno utjecao s obzirom na kontrolu. Najviši porast aktivnosti LOX dobiven je pri nižoj snazi UZV kupelji najduže vrijeme (15 min i 320 W), ali joj od odgovaraju i srednje snage (448 W) uz kraće vrijeme trajanja tretmana (3 i 10 min). Istarskoj bjelici pokazuje potpuno suprotan trend od rosulje te se aktivnost LOX povećava sa svim primijenjenim tretmanima.

Daljnjom analizom može se opaziti da produljenjem vremena tretmana dolazi do podjednakog smanjenja aktivnost LOX u plodovima iz sorti rosulja i levantinka dok istarska bjelica i oblica pokazuju veću ili jednaku aktivnost produljenjem vremena tretmana. Snaga UZV kupelji također ima značajan utjecaj. Generalno gledajući, u svim sortama, osim istarske bjelice, dolazi do smanjenja LOX aktivnosti i pri niskim i visokim snagama UZV. Stoga bi se za istraživane sorte mogla, kao univerzalna preporuka, preporučiti srednja snaga UZV.

Iz statističke obrade rezultata (ANOVA - tablica 5.) primjećuje se da aktivnost LOX statistički visokoznačajno ovisi i o sorti i o tretmanu. Kombinacijom utjecaja sorte i tretmana dolazi do još većeg smanjenja *p*-vrijednosti što upućuje da je aktivnost LOX ovisna o sorti i tretmanu zajedno.

Tablica 5. Rezultati statističke obrade podataka za aktivnost lipoksigenaze određeni pomoću Two-Factor ANOVA-e

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-vrijednost</i>	<i>F crit</i>
Tretman	0,933613	9	0,103735	94,4096	$3,71 \cdot 10^{-50}$	1,958763
Sorta	1,345937	3	0,448646	408,315	$8,97 \cdot 10^{-63}$	2,680168
Interakcija	3,716397	27	0,137644	125,2709	$2,94 \cdot 10^{-75}$	1,578924

Postoje razna istraživanja kojima se mogu potvrditi aktivacije i inaktivacije enzima, jedan od njih je rad Kraljić i sur. (2023a), gdje je gledan utjecaj UZV na LOX i β -glukozidazu. UZV tretman na modelnim otopinama proveden je pri 128, 320 i 640 W u trajanju od 1, 5 i 12 minuta. Zaključeno je da je duže trajanje i niža snaga UZV tretmana pozitivno utjecalo na LOX aktivnost. Konkretno najviša LOX aktivnost bila ostvarena nakon 12 min sa 128 i 320 W

snage. Ovaj trend aktivnosti LOX u ovom radu može se vidjeti kod oblice. Yahyaoui i sur. (2019) u svojem su radu proučavali utjecaj UZV na senzorske karakteristike DMU. Eksperiment se sastojao od tretmana UZV na maslinovo tijesto tri puta po 4, 8 i 10 min 150 W. LOX enzim detektiran je u niskim koncentracijama, ali je ostao jednako aktivan ili je pokazao jedva zamjetno povećanje aktivnosti povećanjem vremena tretmana.

S obzirom na to da je LOX prisutna u velikom broju biljaka, brojna istraživanja o utjecaju UZV na LOX provedena su na lijeski, soji i sojinim proizvodima. Tako su Ghanati i sur. (2015) izlagali stanice lijeske UZV niskog intenziteta. Ispitivanje se vršilo pri kontinuiranoj frekvenciji od 29 kHz pri intenzitetu od 4 mW/cm² tijekom 8 do 40 min. Ovo je istraživanje pokušao razjasniti odnos između proizvodnje H₂O₂ UZV i aktivacije LOX, što rezultira povećanjem proizvodnje paklitaksela u stanicama lješnjaka. Izloženost UZV, posebno tijekom 20 min, je značajno povećao aktivnost LOX, čak do 7 puta više od kontrole. No u istraživanju Yang i sur. (2015), sjeme soje je tretirano različitim snagama UZV (0 W do 300 W) kroz 30 min, zatim je klijalo 5 dana u mraku. Bitno je naglasiti kako je kod soje LOX potrebno inaktivirati zbog stvaranja mirisa i okusa koji negativno utječu na konačni proizvod. LOX je pokazala smanjenje aktivnosti s povećanjem snage UZV kojoj je sjeme bilo izloženo. Smanjenje je bilo vidljivo već pri 100 W, a potpuna inaktivacija je uslijedila pri 300 W. Smanjenje aktivnosti je uočeno vjerojatno zbog jačine ultrazvučnih valova koja uzrokuju jaki kolaps malih mjehurića u stanicama i jakih posmičnih sila koje mogu utjecati na aktivnost LOX. Thakur i Nelson (1997) napravili su istraživanje na sojinom brašnu. Izložili su sojino brašno kavitacijskom UZV od 20 kHz pri pH > 5,0. LOX nije bila inaktivirana ni nakon 3 sata izlaganja. Međutim kada su LOX stavili u kisele uvjete s istim izlaganjem UZV, 70 % - 85 % aktivnosti je izgubljeno. Izlaganje uzoraka na 30 kHz 60 min također nije imalo nikakvog učinka, ali se LOX aktivnost smanjila na frekvencijama višima od 30 kHz pri pH 5. Zaključeno je da inaktivacija LOX ovisi o vremenu izlaganja, pH mediju i frekvenciji UZV. Tolerancija enzima na UZV može ovisiti o fiziološkim svojstvima enzima, kao i o radnim parametrima UZV, kao što su snaga, intenzitet i frekvencija, koji izravno utječu na katalitičku aktivnost enzima (Nadar i Rathod, 2017).

4.2. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE

PEP tretman primjenjuje električno polje visokog intenziteta generirano između dvije elektrode u tekućini koja se tretira, time se omogućuje prolaz električne struje kroz hranu. Netoplinska obrada može se postići upotrebom vrlo kratkog pulsa (mikrosekunda ili milisekunda). PEP tretman produljuje rok trajanja proizvoda, a istovremeno smanjuje gubitak

okusa, boje i hranjivih tvari. Potencijal ove tehnologije stoga je privukao značajnu pozornost istraživača i industrije. Iako je PEP tretman zadnjih godina vrlo intenzivno proučavan dostupno je relativno malo informacija o njegovom učinku na aktivnost enzima (Luo i sur., 2010). Neki enzimi su potpuno inaktivirani (polifenol oksidaza, lipaza, amilaza), dok na druge tretman nije utjecao ili je čak doveo do povećanja aktivnosti (Martín-Belloso i Elez-Martínez, 2005).

Enzimi su proteini čija se katalitička aktivnost oslanja na nativnu konfiguraciju njihovog aktivnog mjesta i konformaciju okolnih proteina. Skupina aminokiselina prisutna u enzimskim proteinima stvara visoko asimetričnu prostornu distribuciju naboja koja dovodi do jako polarnih i nabijenih područja u molekularnoj strukturi proteina. Zbog složene mreže nekovalentnih (elektrostatske sile, ionsko uparivanje, Van der Waalsove sile, vodikova veza) kao i kovalentnih interakcija (disulfidne veze), održavaju se strukturna stabilnost i katalitičke funkcije enzima. Pomakom interakcija, mogu se pojaviti promjene u aktivnosti enzima zbog utjecaja na trodimenzionalnu molekularnu strukturu. Čini se da električna polja mogu, odvajanjem naboja, uzrokovati denaturaciju proteina, raspad kovalentnih veza i oksidacijsko – redukcijske reakcije, poput onih između sulfidnih skupina i disulfidnih veza. Dakle, električna polja utječu na konformacijsko stanje proteina putem naboja, dipola ili induciranih dipolnih kemijskih reakcija. Nabijene skupine i strukture vrlo su osjetljive na različite vrste poremećaja električnog polja i te promjene uzrokuju modifikacije njegove strukture i posljedično gubitak aktivnosti zbog teškoće spajanja supstrata s aktivnim mjestom (Martín-Belloso i Elez-Martínez, 2005).

I u ovom istraživanju, kako se može vidjeti iz tablice 6., LOX aktivnosti sorti se dosta razlikuju. Najveću aktivnost ponovno pokazuje rosulja zatim istarska bjelica, oblica i na kraju levantinka. Istraživanjem aktivnosti LOX enzima tijekom razvoja i zrenja ploda masline, provedenog na četiri sorte, sabina (Korzika), germaine (Korzika), leccino (Italija) i arbequina (Španjolska) bilježene su bitne razlike u aktivnosti u pojedinim sortama (Palmieri-Thiers i sur., 2009) što se poklapa i sa ovim istraživanjem.

Sa Tukey-evim testom opaža se da se LOX aktivnost rosulje smanjuje sa svim tretmanima uspoređujući ih sa kontrolom, najmanja aktivnost je pri 102 s i 4,5 kV/cm. Levantinka pak ima najnižu aktivnost bez tretmana ali se ona povećava s primijenjenom jakosti električnog polja. Zanimljivo je kako su bolji rezultati pri nižim jačinama električnog polja (2 i 4,5 kV/cm) dobiveni dužim tretmanom, dok kod viših vrijednosti električnog polja (7 i 8 kV/cm) dolazi do smanjenja LOX aktivnosti dužim vremenom tretmana. Njezina najveća aktivnost zabilježena je pri 30 s i 7 kV/cm. Iz rezultata je vidljivo kako je primijenjeni PEP tretman imao puno manji utjecaj na aktivnost enzima u tijestu sorti oblica i istarska bjelica.

Tablica 6. Aktivnost lipoksigenaze (mg proteina/ μ mol hidroperoksida oktadekatrienske kiseline (HPOT)) u tijestu hrvatskih autohtonih sorti masline tretiranih pulsirajućim električnim poljem

Parametri tretmana		Sorta			
Vrijeme tretmana (s)	Jakost električnog polja (kV/cm)	Rosulja	Levantinka	Oblica	Istarska bjelica
0	0	0,043 \pm 0,001 f	0,418 \pm 0,052 a	0,102 \pm 0,004 abc	0,064 \pm 0,002 e
60	1	0,086 \pm 0,003 de	0,385 \pm 0,043 ab	0,096 \pm 0,002 bcd	0,085 \pm 0,004 bc
30	2	0,269 \pm 0,008 b	0,241 \pm 0,025 cd	0,081 \pm 0,002 f	0,066 \pm 0,002 de
90	2	0,068 \pm 0,002 ef	0,192 \pm 0,009 def	0,088 \pm 0,004 ef	0,088 \pm 0,003 ab
18	4,5	0,285 \pm 0,019 b	0,223 \pm 0,016 cde	0,094 \pm 0,002 cde	0,051 \pm 0,000 f
60	4,5	0,263 \pm 0,032 b	0,301 \pm 0,078 bc	0,105 \pm 0,002 a	0,075 \pm 0,001 cd
102	4,5	0,327 \pm 0,010 a	0,154 \pm 0,002 ef	0,106 \pm 0,005 a	0,066 \pm 0,002 de
30	7	0,284 \pm 0,010 b	0,110 \pm 0,004 f	0,104 \pm 0,005 ab	0,075 \pm 0,011 cd
90	7	0,112 \pm 0,03 d	0,174 \pm 0,004 def	0,093 \pm 0,002 de	0,067 \pm 0,003 de
60	8	0,156 \pm 0,021 c	0,335 \pm 0,021 ab	0,065 \pm 0,003 g	0,097 \pm 0,001 a

vrijednosti označene različitim slovima unutar pojedine sorte su statistički različite ($p \leq 0,005$) prema Tukey-evom testu višestruke usporedbe.

Vrijednosti aktivnosti LOX unutar te dvije sorte pokazuju najmanje varijacija. Kod oblice dolazi do blagog porasta aktivnosti pri jačinama od 2 i 8 kV/cm a kod istarske bjelice samo kod uzorka tretiranog s 4,5 kV/cm kroz 18 s. Razlike u aktivnosti LOX među sortama i njihov različiti odgovor na PEP tretman mogle bi biti posljedica utjecaja genetskog materijala masline (Tamborrino i sur., 2019). Na kvalitetu i sortnu diferencijaciju utječu mnogi čimbenici, posebno klimatski i agronomski uvjeti prilikom razvoja ploda, indeks zrelosti i uvjeti skladištenja ploda (Clodoveo i sur., 2014; Manganiello i sur., 2021).

Statistička obrada rezultata (tablica 7.) pokazuje kako aktivnost LOX najviše ovisi o sorti. Tretman također ima statistički vrlo visoko značajan utjecaj, ali manje od sorte. Interakcijom sorte i tretmana dolazi do smanjenja p -vrijednosti s obzirom na samo tretman.

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

ANOVA						
<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-vrijednost</i>	<i>F crit</i>
Tretman	0,08659	9	0,009621	26,63457	$1,01 \cdot 10^{-24}$	1,958763
Sorta	0,850266	3	0,283422	784,607	$1,21 \cdot 10^{-78}$	2,680168
Interakcija	0,717826	27	0,026586	73,59935	$3,81 \cdot 10^{-62}$	1,578924

Tretmani PEP-om u istraživanju Kraljić i sur. (2023b) provedeni su s jakostima električnog polja 2,67 i 13,33 kV/cm na frekvencijama od 25 i 125 Hz tijekom 1, 2 i 5 minuta na modelnim otopinama LOX. Rezultati su pokazali pozitivnu korelaciju aktivnosti LOX s vremenom trajanja tretmana, odnosno povećanjem vremena tretmana povećavala se i aktivnost. Rezultati istraživanja navode kako se LOX aktivnost može povećati i slabim električnim poljem. U ovom radu se to može vidjeti kod levantinke.

Min i sur. (2003) inaktivacijom LOX enzima u soku od rajčice PEP tretmanom pokazali su da jakost električnog polja, vrijeme tretmana i temperatura tretmana PEP-om značajno utječu na učinkovitost inaktivacije enzima. Međutim, tu je bitno napomenuti da LOX soka od rajčice može uništiti esencijalne masne kiseline i razviti neugodan okus u soku od rajčice tijekom skladištenja. Također, hidroperoksidi i slobodni radikali proizvedeni LOX enzimom mogu razgraditi vitamine i proteine u soku od rajčice. Stoga je poželjno da je aktivnost LOX u konačnom soku od rajčice vrlo niska. Primijenjen je PEP jakosti električnog polja 0, 10, 15, 20, 30, 35 kV/cm, vrijeme tretmana 20, 30, 50, 60, 70 μ s i temperaturi tretmana 10, 20, 30, 40, 50 °C. 90% inaktivacija soka od rajčice LOX očekivana je nakon PEP tretmana na 35 kV/cm 74,8 μ s. Ove rezultate potvrđuju Luo i sur. (2010) koji su dokazali kako PEP tretman

djeluje na inaktivaciju polifenol oksidaze i LOX. PEP tretman je postavljen na 8, 12, 16, 20 i 24 kV/cm. Zaključili su da se ovi enzimi mogu inaktivirati PEP tretmanom. Aktivnost im je smanjena nakon tretmana na 24 kV/cm 320 μ s za polifenol oksidazu, 962 μ s za LOX. Dakle LOX je manje osjetljiva na PEP tretmane. Ovaj rad ukazuje na konformacijske promjene koje se događaju u sekundarnoj strukturi i pojavu lokalnih promjena tercijarne strukture u LOX enzimu. U radu Li i sur. (2008), proučavana je inaktivacija LOX enzima soje pomoću PEP-a kako bi se smanjila njezina aktivnost zbog stvaranja neugodnog mirisa i okusa. Aktivnost LOX-a smanjivala se s povećanjem vremena tretmana, jačine pulsa, frekvencije i širine pulsa. Maksimalna inaktivacija sojinog LOX enzima pomoću PEP-a postigla je 88% pri 42 kV/cm za 1036 μ s s 400 Hz frekvencije pulsa i 2 μ s širine pulsa na 25 °C. Što dovodi do zaključka da je prekomjerno vrijeme izloženosti tretmanu uzrokovalo smanjenje aktivnosti enzima.

5. ZAKLJUČCI

1. Sorta masline ima značajan utjecaj na aktivnost lipoksigenaze. U oba pokusa najveća aktivnost lipoksigenaze uočena je u maslinama sorte rosulja.
2. Svaka od analiziranih sorti pokazuje drugačiji odgovor na primijenjene tretmane inovativnim tehnikama.
3. Tretman ultrazvukom generalno smanjuje aktivnost lipoksigenaze. Do smanjenja dolazi kod rosulje i levantinke, dok u tijestu sorte oblice dolazi i do pozitivnog i negativnog učinka, ovisno o tretmanu. Jedino kod istarske bjelice, koja pokazuje najmanju aktivnost lipoksigenaze, dolazi do povećavanja njezine aktivnosti ultrazvučnim tretmanom.
4. Pulsirajuće električno polje jednako povećava i smanjuje aktivnost lipoksigenaze. Do smanjenja aktivnosti lipoksigenaze dolazi u istarskim sortama (rosulji i istarskoj bjelici) dok u dalmatinskim sortama (levantinki i oblici), koje u ovom istraživanju pokazuju nižu aktivnost lipoksigenaze, dolazi do njezine aktivacije pulsirajućim električnim poljem.
5. U konačnici, može se zaključiti da je istraživanim inovativnim tehnikama, i ultrazvukom i pulsirajućim električnim poljem, moguće povećati aktivnost lipoksigenaze u maslinama koje posjeduju nisku aktivnost istraživanog enzima.

6. LITERATURA

Angerosa F, Mostallino R, Basti C, Vito R (2000) Virgin Olive Oil Odour Notes: Their Relationships with Volatile Compounds from the Lipoxygenase Pathway and Secoiridoid Compounds. *Food Chem* **68**, 283-287. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00189-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00189-2)

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)

Bejaoui MA, Beltran G, Aguilera MP, Jimenez A (2016) Continuous conditioning of olive paste by high power ultrasounds: Response surface methodology to predict temperature and its effect on oil yield and virgin olive oil characteristics. *LWT-Food Sci Technol* **69**, 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.048>

Bejaoui MA, Sánchez-Ortiz A, Aguilera MP, Ruiz-Moreno MJ, Sánchez S, Jiménez A i sur. (2018) High power ultrasound frequency for olive paste conditioning: Effect on the virgin olive oil bioactive compounds and sensorial characteristics. *Innov Food Sci Emerg Technol* **47**, 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.002>

Boffa L, Calcio Gaudino E, Grillo G, Binello A, Capaldi G, Rego D i sur. (2024) Industrial Production of Bioactive Nutrient-Enhanced Extra Virgin Olive Oil under Continuous-Flow Ultrasound and Pulsed Electric Field Treatment. *Foods* **13**, 2613. <https://doi.org/10.3390/foods13162613>

Bonjoch NP, Tamayo PR (2001) Protein Content Quantification by Bradford Method. U: Reigosa Roger MJ (ured.) Handbook of Plant Ecophysiology Techniques, Springer, Dodrecht, str. 283-295

Brezjan P (2023) Utjecaj ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja na sastav polifenola hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Caponio F, Leone A, Squeo G, Tamborrino A, Summo C (2019) Innovative technologies in virgin olive oil extraction process: Influence on volatile compounds and organoleptic characteristics. *J Sci Food Agric* **99**, 5594-5600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9856>

Cecchi L, Migliorini M, Mulinacci N (2021) Virgin olive oil volatile compounds: Composition, sensory characteristics, analytical approaches, quality control, and authentication. *J Agric Food Chem* **69**, 2013-2040. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07744>

Clodoveo ML (2013) An overview of emerging techniques in virgin olive oil extraction process: Strategies in the development of innovative plants. *J Agr Eng* **44**, e 60. <https://doi.org/10.4081/jae.2013.302>

Clodoveo ML, Durante V, La Notte D (2013b) Working towards the development of innovative ultrasound equipment for the extraction of virgin olive oil. *Ultrason Sonochem* **20**, 1261-1270. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.001>

Clodoveo ML, Durante V, La Notte D, Punzi R, Gambacorta G (2013a) Ultrasound-assisted extraction of virgin olive oil to improve the process efficiency. *Eur J Lipid Sci Tech* **115**, 1062-1069. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200426>

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

De Gregorio A, Dugo G, Arena N, Patumi M (2000) Lipoxygenase activities in ripening olive fruit tissue. *J Food Biochem* **24**, 417-426. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2000.tb00710.x>

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/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M)

Ghanati F, Safari M, Hajnorouzi A (2015) Partial clarification of signaling pathway of taxanes increase biosynthesis by low intensity ultrasound treatment in hazel (*Corylus avellana*) cells. *S Afr J Bot* **96**, 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.10.012>

Grillo G, Boffa L, Calcio Gaudino E, Binello A, Rego D, Pereira M i sur. (2022) Combined ultrasound and pulsed electric fields in continuous-flow industrial olive-oil production. *Foods* **11**, 3419. <https://doi.org/10.3390/foods11213419>

Hachicha Hbaieb R, Kotti F, García-Rodríguez R, Gargouri M, Sanz C, Pérez AG (2015) Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: Correlation with virgin olive oil phenolic profiles. *Food Chem* **174**, 240–247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.033>

Hbaieb RH, Kotti F, Cortes-Francisco N, Caixach J, Gargouri M, Vichi S (2016) Ripening and storage conditions of Chétoui and Arbequina olives: Part II. Effect on olive endogenous enzymes and virgin olive oil secoiridoid profile determined by high resolution mass spectrometry. *Food Chem* **210**, 631-639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.026>

Islam MN, Zhang M, Adhikari B (2014) The inactivation of enzymes by ultrasound—a review of potential mechanisms. *Food Rev Int* **30**, 1-21. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.853772>

Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* **77**, 215-227. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)

Khan MK, Ahmad K, Hassan S, Imran M, Ahmad N, Xu C (2018) Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innov Food Sci Emerg Technol* **45**, 361-381. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.006>

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

Kraljić K, Balbino S, Filipan K, Herceg Z, Ivanov M, Vukušić Pavičić T, Škevin D i sur. (2023a) Innovative Approaches to Enhance Activity of Endogenous Olive Enzymes—A Model System Experiment: Part I—Thermal Techniques. *Processes* **11**, 1194. <https://doi.org/10.3390/pr11041194>

Kraljić K, Balbino S, Filipan K, Herceg Z, Stuparević I, Ivanov M, Škevin D i sur. (2023b) Innovative Approaches to Enhance Activity of Endogenous Olive Enzymes—A Model System Experiment: Part II—Non-Thermal Technique. *Processes* **11**, 3283. <https://doi.org/10.3390/pr11123283>

Li YQ, Chen Q, Liu XH, Chen ZX (2008) Inactivation of soybean lipoxygenase in soymilk by pulsed electric fields. *Food Chem* **109**, 408-414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.001>

Lorenzi V, Maury J, Casanova J, Berti L (2006) Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol Biochem* **44**, 450-454. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.09.001>

Luaces P, Pérez AG, Sanz C (2005) Effect of cold storage of olive fruits on the lipoxygenase pathway and volatile composition of virgin olive oil. *Acta Hort* **682**, 993-998. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.682.129>.

Lukić I, Lukić M, Žanetić M, Krapac M, Godena S, Brkić Bubola K (2019) Inter-varietal diversity of typical volatile and phenolic profiles of Croatian extra virgin olive oils as revealed by GC-IT-MS and UPLC-DAD analysis. *Foods* **8**, 565. <https://doi.org/10.3390/foods8110565>

Luo W, Zhang RB, Wang LM, Chen J, Guan ZC (2010) Conformation changes of polyphenol oxidase and lipoxygenase induced by PEF treatment. *J Appl Electrochem* **40**, 295-301. <https://doi.org/10.1007/s10800-009-9973-4>

Makovac E (2023) Utjecaj pulsirajućeg električnog polja na antioksidacijski kapacitet hrvatskih djevičanskih maslinovih ulja (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Manganiello R, Pagano M, Nucciarelli D, Ciccoritti R, Tomasone R, Di Serio MG i sur. (2021) Effects of ultrasound technology on the qualitative properties of Italian extra virgin olive oil. *Foods* **10**, 2884. <https://doi.org/10.3390/foods10112884>

Martín-Belloso O, Elez-Martínez P (2005) Enzymatic inactivation by pulsed electric fields. U: Sun D (ured.) *Emerging technologies for food processing*, Academic Press, Cambridge, str. 155-181.

Mawson R, Gamage M, Terefe NS, Knoerzer K (2010) Ultrasound in enzyme activation and inactivation. U: Feng H, Barbosa-Canovas G, Weiss J (ured.) *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*, Springer, New York, str. 369-404.

Mazucca S, Spadafora A, Innocenti AM (2006) Cell and tissue localization of β -glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. *Plant Sci* **171**, 726-733. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.07.006>

Min S, Min SK, Zhang QH (2003) Inactivation kinetics of tomato juice lipoxygenase by pulsed electric fields. *J Food Sci* **68**, 1995-2001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07008.x>

Nadar SS, Rathod VK (2017) Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review. *World J Microbiol Biotechnol* **33**, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2322-6>

Nardella M, Moschetti R, Bedini G, Bandiera A, Chakravartula SSN, Massantini R (2023) Impact of traditional and innovative malaxation techniques and technologies on nutritional and sensory quality of virgin olive oil—A review. *Food Chem Adv* **2**, 100163. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100163>

Nardella M, Moschetti R, Nallan Chakravartula SS, Bedini G, Massantini R (2021) A review on high-power ultrasound-assisted extraction of olive oils: Effect on oil yield, quality, chemical composition and consumer perception. *Foods* **10**, 2743. <https://doi.org/10.3390/foods10112743>

Nunes BV, da Silva CN, Neves ICO, Silva SH, Veríssimo LAA, de Souza VR (2023) Evaluation of thermosonication in the inactivation of lipoxygenase in hydrosoluble soy extract. *Afr J Food Sci* **17**, 207-216. <https://doi.org/10.5897/ajfs2023.2262>

Ortega-García F, Blanco S, Peinado MÁ, Peragón J (2010) Polyphenol Oxidase and Oleuropein in Olives and their Changes During Olive Ripening. U: Preedy VR, Watson RR (ured.) *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 1. izd., 233–238.

Ortiz GE, Ponce-Mora MC, Nosedá DG, Cazabat G, Saravalli C, López MC i sur. (2017) Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *J Ind Microbiol Biotechnol* **44**, 197-211. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1873-0>

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

Panzanaro S, Nutricati E, Miceli A, De Bellis L (2010) Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol Biochem* **48**, 741-745. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.05.004>

Peres F, Martins LL, Ferreira-Dias S (2017) Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**, 3104-3126. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1092107>

Pérez M, López-Yerena A, Lozano-Castellón J, Olmo-Cunillera A, Lamuela-Raventós RM, Martín-Belloso O i sur. (2021) Impact of emerging technologies on virgin olive oil processing, consumer acceptance, and the valorization of olive mill wastes. *Antioxidants* **10**, 417. <https://doi.org/10.3390/antiox10030417>

Ramírez E, Brenes M, García P, Medina E, Romero C (2016) Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes. *Food Chem* **206**, 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.061>

Salas JJ, Willams M, Harwood JL, Sánchez J (1999) Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *J Am Oil Chem Soc* **76**, 1163-1168. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0090-7>

Sánchez J, Salas JJ (2000) Biogenesis of Olive Oil Aroma. U: Aparicio R, Harwood J (ured.) Handbook of Olive Oil, Springer, Berlin, str. 79–99.

Servili M, Montedoro G (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 602-613. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X)

Servili M, Veneziani G, Taticchi A, Romaniello R, Tamborrino A, Leone A (2019) Low-frequency, high-power ultrasound treatment at different pressures for olive paste: Effects on olive oil yield and quality. *Ultrason Sonochem* **59**, 104747. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104747>

Shimizu M, Kudo N, Nakajima Y, Matsuo N, Katsuragi Y, Tokimitsu I i sur. (2008) Effect of lipase activity and specificity on the DAG content of olive oil from the Shodoshima-produced olive fruits. *J Am Oil Chem Soc* **85**, 629-633. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1243-9>

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

Šarolić M, Gugić M, Marijanović Z, Šuste M (2014) Virgin olive oil and nutrition. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **3**, 38-43.

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

Tamborrino A, Urbani S, Servili M, Romaniello R, Perone C, Leone A (2019) Pulsed electric fields for the treatment of olive pastes in the oil extraction process. *Appl Sci* **10**, 114. <https://doi.org/10.3390/app10010114>

Taticchi A, Selvaggini R, Esposto S, Sordini B, Veneziani G, Servili M (2019) Physicochemical characterization of virgin olive oil obtained using an ultrasound-assisted

extraction at an industrial scale: Influence of olive maturity index and malaxation time. *Food Chem* **289**, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.041>

Thakur BR, Nelson PE (1997) Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation. *Food/Nahrung* **41**, 299-301. <https://doi.org/10.1002/food.19970410510>

Veneziani G, Esposito S, Taticchi A, Selvaggini R, Sordini B, Loreface A i sur. (2019) Extra-virgin olive oil extracted using pulsed electric field technology: Cultivar impact on oil yield and quality. *Front Nutr* **6**, 134. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00134>

Vossen P (2007) Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *Hort Sci* **42**, 1093-1100. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.5.1093>

Yahyaoui A, Rigane G, Mnif S, Salem RB, Acar A, Arslan D (2019) Ultrasound technology parameters: effects on phenolics in olive paste and oil in relation to enzymatic activity. *Eur J Lipid Sci Technol* **121**, 1800295. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800295>

Yang H, Gao J, Yang A, Chen H (2015) The ultrasound-treated soybean seeds improve edibility and nutritional quality of soybean sprouts. *Food Res Int* **77**, 704-710. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.011>

Yüksel Aydar A (2019) Emerging Extraction Technologies in Olive Oil Production. U: Muzzalupo I (ured.) Technological Innovation in the Olive Oil Production Chain, Intech Open, Rijeka. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81390>

Zhao W, Yang R, Zhang HQ (2012) Recent advances in the action of pulsed electric fields on enzymes and food component proteins. *Trends Food Sci Technol* **27**, 83-96. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.05.007>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ivana Hojka

Vlastoručni potpis