

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Kristian Pavlič

**UTJECAJ UBRZANOG
TOPLINSKOG TRETMANA I
ULTRAZVUKA NA AKTIVNOST
ENZIMA PLODA 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, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



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

Roditeljima Miji i Katici, braći Lucianu i Mihaelu na bezuvjetnoj podršci, ljubavi, nadi i vjeri u mene.

Ivici Ciku i Filipu Mariću na očinskoj i bratskoj ljubavi, posjetama u bolnici i svemu dobrome učinjenom u tajnosti srca.

Ani i Marini na prijateljstvu, osjećaju pripadnosti i smijehu.

Prof. Dubravki Škevin, prof. Kati Galić, doc. Moniki Kovačević i mentorici, izv. prof. Klari Kraljić na prilici, stručnoj pomoći i zauzimanju za mene.

Angeli i Melisi na predanom radu u laboratoriju i ustrajnosti iz dana u dan.

Ivanu Merzu, Tomislavu Ivančiću i Fultonu Sheenu na putokazu i uzoru.

Dečkima iz zajednice na susretima i stotinama kilometara pod nogama.

Iv 11, 3-4

Ps 128

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 UBRZANOG TOPLINSKOG TRETMANA I ULTRAZVUKA NA AKTIVNOST ENZIMA PLODA MASLINE

Kristian Pavlić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058206263

Sažetak: Inovativni postupci proizvodnje hrane i njihova mogućnost primjene u proizvodnji ulja od velikog su interesa uljarske industrije. Iako se danas nove tehnologije poput ubrzanog toplinskog tretmana ili ultrazvuka najčešće koriste kako bi se inaktivirali enzimi i mikroorganizmi, moguće je primjenom određenih procesnih parametara i aktivirati enzime. Enzimi ploda masline ključni su faktori u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja visoke nutritivne i senzorske vrijednosti i zato je provedeno istraživanje utjecaja ubrzanog toplinskog tretmana i ultrazvuka visoke snage na aktivnost enzima ploda masline preko komercijalno dostupnih β -glukozidaze i lipoksigenaze. Ispitani su parametri vremena, temperature (u rasponu 15-40 °C) i procesni parametri ultrazvuka (vrijeme tretiranja i snage ultrazvuka) nakon kojih je simuliran postupak miješenja od 30 minuta na 25 °C. Enzimu β -glukozidazi odgovaraju uvjeti povišene temperature od 40 °C i duže vrijeme reakcije od 60 minuta, dok lipoksigenazi za maksimalnu aktivnost odgovaraju temperature od 25 °C i 30 minuta reakcije. Upravo zbog toga se veća aktivnost β -glukozidaze postiže pri većim snagama ultrazvuka, a lipoksigenaza postiže najveću aktivnost pri vrlo maloj snazi ultrazvuka od svega 20 % kapaciteta snage.

Ključne riječi: β -glukozidaza, enzimi, lipoksigenaza, djevičansko maslinovo ulje, ultrazvuk

Rad sadrži: 40 stranica, 15 slika, 1 tablicu, 71 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

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: 22. prosinca 2021

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

INFLUENCE OF RAPID THERMAL TREATMENT AND ULTRASOUND ON OLIVE FRUIT ENZYME ACTIVITY

Kristian Pavlić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058206263

Abstract: Innovative food production processes and their potential application in oil production are of great interest to the oil industry. Although today new technologies such as rapid thermal treatment or ultrasound are most commonly used to inactivate enzymes and microorganisms, it is also possible to activate enzymes by applying certain process parameters. Olive fruit enzymes are key factors in the production of virgin olive oil with high nutritional and sensory value. Therefore, a study was conducted on the effects of rapid thermal treatment and high power ultrasound on olive fruit enzyme activity by commercial β -glucosidase and lipoxygenase. The parameters of time, temperature (in the range of 15-40 °C) and process parameters of ultrasound (treatment time and power of ultrasound) were studied, after which the malaxation procedure of 30 minutes at 25 °C was simulated. The enzyme β -glucosidase corresponds to the conditions of increased temperature of 40 °C and longer reaction time of 60 minutes, while lipoxygenase for maximum activity corresponds to temperatures of 25 °C and 30 minutes reaction time. This is the reason why higher β -glucosidase activity is achieved at higher ultrasound powers and lipoxygenase achieves the highest activity at a very low ultrasound power of only 20% of the power capacity.

Keywords: β -glucosidase, enzymes, lipoxygenase, virgin olive oil, ultrasound

Thesis contains: 40 pages, 15 figures, 1 table, 71 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

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 22nd, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 PLOD MASLINE	2
2.2 PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA	4
2.3 SASTAV I SVOJSTVA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA	6
2.3.1 Masne kiseline	6
2.3.2 Fenolni spojevi	7
2.3.3 Hlapljive tvari	9
2.4 ULTRAZVUK	12
2.4.1 Mehanizam djelovanja ultrazvuka	13
2.4.2 Ultrazvučni uređaji	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJAL.....	15
3.2. REAGENSI	15
3.3. METODE	16
3.3.1. Priprema modelnih otopina	16
3.3.2. Simulacija procesa miješenja	16
3.3.3. Ubrzani toplinski tretman (UTT).....	16
3.3.4. Tretman ultrazvukom (UZV)	17
3.3.5. Određivanje aktivnosti β -glukozidaze	17
3.3.6. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze.....	18
3.3.7. Određivanje proteina po Bradford-u	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1 UTJECAJ VREMENA MIJEŠENJA NA AKTIVNOST ENZIMA.....	21
4.2 UTJECAJ TEMPERATURE NA AKTIVNOST ENZIMA	23
4.3 UTJECAJ ULTRAZVUKA NA AKTIVNOST ENZIMA	26
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	33

1. UVOD

Djevičansko maslinovo ulje (DMU) dobiva se iz ploda masline primjenom isključivo mehaničkih postupaka koji omogućuju nastanak i očuvanje tvari s mirisnim i okusnim svojstvima te potencijalno blagotvornim učinkom na zdravlje. Hlapljive i fenolne tvari odgovorne su za specifična i jedinstvena okusno-mirisna svojstva te visoku nutritivnu vrijednost DMU. Na sastav i udio poželjnih hlapljivih i fenolnih spojeva značajno utječu enzimi prisutni u plodu masline. Upravo su enzimi, mehanizmi njihova djelovanja i optimalni parametri za njih u proizvodnji ulja postali fokus novijih istraživanja.

Sve navedeno otvara nova interesna područja za proizvodnju DMU koja istražuju i nove postupke proizvodnje. Tradicionalno se u proizvodnji DMU koriste hladni postupci. Za postupak miješenja to su temperature od 25 do 30 °C kroz 45 minuta trajanja postupka. Utjecaj toplinskog tretmana posebno je otvoren za raspravu jer je temperaturni raspon između razgradnje ili bolje topljivosti poželjnih spojeva vrlo uzak.

Novi postupci koji uključuju tehnologije poput ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja i mikrovalova pokazuju veliki potencijal i mogućnost kontinuiranosti cijeloga procesa. Koristeći navedene tehnologije, moguće je provoditi učinkovitije i ekološki prihvatljivije ekstrakcije, inaktivirati mikroorganizme pa čak i izdvojiti određenu količinu ulja koje se inače gubi s vegetabilnom vodom i kominom. Zajedničko svim ovim tehnikama je da se obrada materijala odvija na sobnoj temperaturi.

Primjenom netermičkih tehnologija obrade hrane, u koje se ubrajaju ultrazvuk i pulsirajuće električno polje, moguće je postići očuvanje senzorskih i nutritivnih značajki kroz dulje vrijeme uz zajamčenu sigurnost proizvoda (Krešić i sur., 2011). Ultrazvuk brže zagrijava maslinovo tijesto i može aktivirati prisutne enzime, ali potrebno je utvrditi koji su to optimalni parametri za proces proizvodnje. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj ubrzanog toplinskog tretmana i utjecaj ultrazvuka visoke snage na enzime ploda masline β -glukozidazu i lipoksigenazu (LOX).

2. TEORIJSKI DIO

2.1 PLOD MASLINE

Jedan od ključnih faktora za kvalitetu DMU stanje je ploda masline, koji mora biti zdrav, neoštećen i ubran u optimalnom stupnju zrelosti. Prosječna masa ploda masline se kreće od 0,5 do 20 g te je određena genetski tj. sortom, a ovisi o uzgojnim uvjetima i količini ploda po stablu (Kailis i Harris, 2007). Oblik ploda najčešće je sferičan, a može biti izdužen, kruškolik i srcolik, što je također određeno sortom. Velika varijabilnost kemijskog sastava ploda posljedica je velike biološke raznolikosti unutar porodice Oleaceae. Svježi plod može sadržavati 40 – 70 % vode, 6 – 25 % ulja te 24 – 35 % ostalih tvari poput šećera, proteina, organskih kiselina, fenolnih tvari i netopljivih koloidnih tvari (Servili i sur., 2012). Koloidne tvari su komponente stanične stjenke i središnje lamele koja povezuje susjedne stanice, poput celuloze, hemiceluloze, pektina, enzimskih i strukturnih proteina. Ove tvari u maslinovom tijestu, osobito s visokim udjelom vode, stvaraju emulziju i otežavaju izdvajanje ulja (Canamasas, 2006).

Plod masline je koštunica budući da sadrži drvenastu košticu (endokarp) unutar koje je sadržana sjemenka (endosperm) koja čini 2 – 4 % mase cijelog ploda. Koštica je okružena mesom ploda ili pulpom (mezokarp) koju pokriva zaštitna kožica (epikarp) prekrivena voštanom prevlakom. Na slici 1 prikazani su osnovni anatomske dijelovi ploda s njihovim udjelima u masi svježeg ploda (Majetić Germek, 2014).



Slika 1. Anatomske dijelovi ploda masline i njihovi udjeli u masi svježeg ploda (Majetić Germek, 2014)

U plodu masline ulje se najvećim dijelom nalazi u pulpi (16,5-23,5 % mase svježeg ploda) i manjim dijelom u sjemenci (1-1,5 % mase svježeg ploda) (Servili i sur., 2012). U stanicama pulpe ulje se nakuplja u vakuolama, čime je odvojeno od vodenog dijela citoplazme. Manji dio ulja raspršen je u vidu sitnih kapljica u citoplazmi, a taj se dio znatno teže izdvaja tijekom prerade. Vakuole s uljem sadrže najvećim dijelom triacilglicerole (≥ 98 %) dok su drugi sastojci poput ugljikovodika, sterola i voskova prisutni u manjim udjelima (Koprivnjak, 2006). Nakupljanje ulja u plodu započinje nakon odrvenjavanja koštice, a najviše količine postižu se u potpuno zrelim plodovima (Kailis i Harris, 2007).

Fenolne tvari (fenolni alkoholi, kiseline i sekoiridoidni glikozidi) u plodu masline javljaju se u obliku unutarstaničnih nakupina smještenih neposredno uz stanične stjenke. Nalaze se u pulpi, kožici i sjemenci ploda. Njihova biološka uloga je zaštita od razvoja mikroorganizama na mjestima oštećenja te odbijanje nametnika. Osim toga imaju i strukturnu ulogu, s obzirom na to da stvaraju veze između polisaharida koji izgrađuju stanične stjenke (Ucella, 2001). Udio fenolnih tvari u plodu prilično je visok i kreće se od 0,5 do 2,5 % mase svježeg ploda te značajno ovisi o sorti i stupnju zrelosti ploda (Servili i sur., 2012). Količina fenolnih tvari u plodu povećava se sa stupnjem zrelosti ploda, do trenutka kada plodovi počinju mijenjati boju kožice u ružičasto-ljubičastu. Nakon toga njihov se udio u plodu smanjuje, što je u korelaciji s porastom aktivnosti hidrolitičkih enzima ploda (Conde i sur., 2008). Prilikom prerade, u ulje prijeđe svega 1-2 % fenolnih spojeva prisutnih u plodu zbog njihove izrazite hidrofilnosti (Rodis i sur., 2002). U djevičanskim maslinovim uljima fenolne tvari imaju iznimnu važnost jer utječu na okusna i nutritivna svojstva te održivost ulja zbog izrazite antioksidacijske aktivnosti (Bendini i sur., 2007).

U plodu masline, osobito pulpi i sjemenci, sadržani su enzimi s hidrolitičkim i oksidoredukcijskim djelovanjem na fenolne tvari i tvari koloidnog karaktera. Celulaze, poligalakturonaze i pektin metil-esteraze omekšavaju tkivo ploda i razgrađuju koloidne tvari te pridonose izdvajanju ulja za vrijeme prerade (Koprivnjak, 2006). Enzimi poput β -glukozidaze, peroksidaze i polifenol-oksidaze djeluju na fenolne tvari ploda mijenjajući njihovu strukturu i topljivost u ulju (Clodoveo i sur., 2014). U sintezu mirisnih hlapljivih tvari djevičanskih maslinovih ulja uključen je niz enzima iz lipoksigenaznog (LOX) puta sinteze (Kalua i sur., 2007). Glavni enzimi ploda masline prikazani su u tablici 1 uz opis njihovog djelovanja i lokalizacije u samom plodu.

Tablica 1. Enzimi ploda masline, njihova lokalizacija u plodu i djelovanje (Majetić Germek, 2014)

	Endogeni enzim	Lokalizacija	Djelovanje
Enzimi koji djeluju na koloidne tvari	celulaze poligalakturonaze pektin metil-esteraze	pulpa	hidroliza celuloze, hemiceluloze i pektina, razgradnja staničnih stjenki, omekšavanje tkiva i olakšavanje izdvajanja ulja;
Enzimi koji djeluju na fenolne tvari	β -glukozidaze	pulpa (kloroplasti i kapljice ulja u citoplazmi)	odvajanje šećera iz fenolnih glikozida čime nastaju aglikoni koji su topljiviji u ulju;
	polifenol-oksidge	pulpa	hidroksilacija monofenola u <i>o</i> -difenole, oksidacija <i>o</i> -difenola u kinone;
	peroksidaze	sjemeka	oksidacija fenolnih tvari uz prisutnost vodikovog peroksida;
Enzimi koji su uključeni u sintezu hlapljivih tvari	lipaze	pulpa i sjemenka	hidroliza triacilglicerola, oslobađanje slobodnih masnih kiselina;
	lipoksigenaze	pulpa i sjemenka	oksidacija slobodnih višestruko nezasićenih masnih kiselina, početak eznimskih reakcija LOX puta sinteze poželjnih mirisnih tvari;
	hidroperoksid-liaze	pulpa (kloroplasti)	cijepanje hidroperoksida višestruko nezasićenih masnih kiselina na aldehide i oksokiseline;
	alkohol-dehidrogenaze	pulpa i sjemenka	reverzibilna redukcija aldehida u alkohole;

2.2 PROIZVODNJA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

U procesu proizvodnje DMU plod masline treba proći kroz faze pranja i uklanjanja nečistoća, mljevenja, miješenja, izdvajanja ulja iz maslinovog tijesta, odvajanja ulja od biljne vode i završnih postupaka bistrenja, pakiranja i distribucije. Osim karakteristika ploda masline, na kvalitetu i iskorištenje procesa u preradi utječu i jedinične operacije u procesu proizvodnje djevičanskih maslinovih ulja, od kojih su najznačajnije mljevenje maslina i miješenje maslinovog tijesta (Uceda i sur., 2006, Di Giovacchino, 2002).

Mljevenje prethodno očišćenih i opranih maslina provodi se s ciljem oslobađanja ulja iz pulpe ploda i njegovog izdvajanja u kasnijim fazama prerade. Mljevenjem se usitnjavaju svi

dijelovi ploda, uključujući i košticu sa sjemenkom, pa ulje dolazi u kontakt i s ostalim specifičnim tvarima ploda, poput tvari boje iz kože, tokoferola iz sjemenke i enzima iz pulpe i sjemenke. Fragmenti koštice u maslinovom tijestu olakšavaju izdvajanje ulja zbog drenažnog učinka. Osim toga, narušavanjem staničnih struktura aktivira se niz enzima sadržanih u plodu koji sudjeluju u promjeni strukture polarnih fenolnih tvari i sintezi hlapljivih tvari. Stoga, mljevenje nije isključivo mehanički proces koji može utjecati na prinos ulja, već i operacija kojom započinju biokemijske reakcije koje utječu na sastav i kvalitetu ulja (Fregapane i Salvador, 2013; Inarejos-García i sur., 2011).

Sljedeća faza proizvodnje je miješenje. To je proces u kojem se samljevena smjesa (tijesto) miješa kako bi se postiglo bolje odvajanje uljne od vodene faze. Miješenjem (15-20 o/min) razbija se emulzija nastala mljevenjem maslina i potiče se ujedinjavanje sitnih kapljica ulja u kapljice promjera većeg od 30 μm , čime se olakšava ekstrakcija ulja (Di Giovacchino i sur., 2002). Za vrijeme miješenja maslinovog tijesta endogeni enzimi poput pektinaza, celulaza i hemicelulaza razgrađuju stanične stijenke i lipoproteinske ovojnice, koje se dodatno mehanički razbijaju pod utjecajem oštih bridova koštice, čime se razbija emulzija i olakšava izdvajanje ulja. Osim toga, za vrijeme miješenja se nastavljaju i enzimске reakcije na fenolnim tvarima te sinteza hlapljivih tvari. Učinkovitost miješenja tijesta ovisi o reološkim karakteristikama tijesta i uvjetima provođenja ove operacije kao što su vrijeme miješenja i temperatura (Clodoveo, 2012; Di Giovacchino i sur., 2002). Obično se miješenje maslinovog tijesta provodi na temperaturama do 27 °C (Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91), ako se želi deklarirati da se radi o hladnom postupku, u vremenu od 30 do 60 minuta ovisno o karakteristikama tijesta. Produženjem vremena miješenja maslinovog tijesta postiže se veće iskorištenje procesa proizvodnje ulja što je potvrđeno brojnim istraživanjima (Stefanoudaki i sur., 2011; Aguilera i sur., 2010; Inarejos-García i sur., 2009; Kalua i sur., 2006; Ranalli i sur., 2003; Di Giovacchino i sur., 2002; Amirante i sur., 2001).

Nakon miješenja slijedi izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta. Postoji više načina kojima se postupak izdvajanja može provesti: prešanjem, kontinuiranom centrifugalnom ekstrakcijom ili procjeđivanjem. Prešanje, koje smatramo tradicionalnim načinom izdvajanja u proizvodnji DMU temelji se na Pascalovu zakonu; izdvajanje kontinuiranom centrifugalnom ekstrakcijom na razlici u gustoći ulja, vegetabilne vode i komine, a procjeđivanje na razlikama u površinskoj napetosti. Nakon provedenog izdvajanja slijedi bistrenje, pakiranje i distribucija DMU (Škevin, 2016).

2.3 SASTAV I SVOJSTVA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

DMU čine kemijski različiti spojevi podijeljeni u dvije skupine: osapunjivi i neosapunjivi dio. Po sadržaju i vrsti spojeva maslinovo ulje se razlikuje od ostalih jestivih ulja

Veliku većinu svih spojeva DMU čine trigliceridi i to u postotku do 98 %, a u manjem omjeru su tu slobodne masne kiseline i ostali gliceridni spojevi.

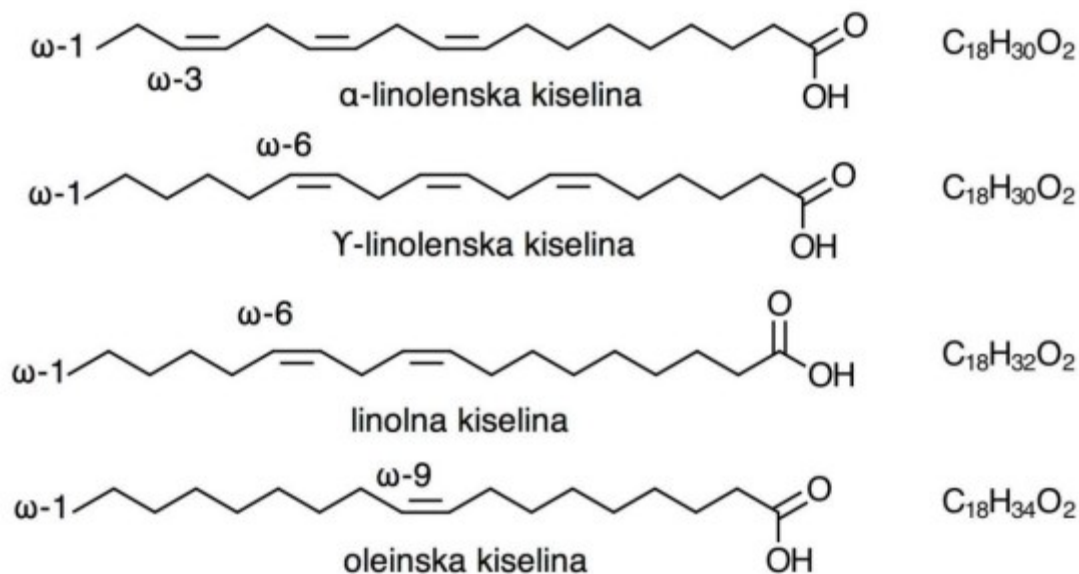
Neosapunjivi dio kojeg je pronađeno do 2 % u ukupnom sastavu DMU čine spojevi koji su različitih struktura i polariteta (lipofilne ili hidrofilne) i stoga se mogu koristiti u karakterizaciji ulja. Ovoj heterogenoj skupini od 200 spojeva pripadaju ugljikovodici, terpeni, alkoholi, steroli, tokoferoli, pigmenti, fenoli i hlapljivi aromatski spojevi (Kiritsakis, 1998).

2.3.1 Masne kiseline

Jednostruko nezasićena oleinska kiselina zastupljena je u visokom udjelu u sastavu masnih kiselina DMU, od 55 do 83 %, i jedan je od kriterija za određivanje njegove autentičnosti. Učinci maslinovog ulja i manje pojavnosti kardiovaskularnih bolesti pripisani su visokom udjelu oleinske kiseline i njenom svojstvu da usporava prodiranje masnih kiselina u arterijske stijenke (Perrin, 1992).

Uz oleinsku, masnu kiselinu u maslinovom ulju prisutne su esencijalne masne kiseline linolna i linolenska. One se se ne mogu sintetizirati u organizmu pa ih je potrebno unositi hranom. Izgrađuju membranu ljudskih stanica, tkiva, organe, a od njih se stvaraju i spojevi slični hormonima koji upravljaju raznim životnim funkcijama, a njihove strukture su prikazane na slici 2 (Presnec, 2017).

Osim jakoga genetskog utjecaja, sastav masnih kiselina mijenja se ovisno o području uzgoja masline, zemljopisnoj širini, klimatskim uvjetima tijekom godine te stupnju zrelosti plodova (Boskou, 2006).



Slika 2. Kemijska strukturna formula: linolenske ($C_{18}:3$), linolne ($C_{18}:2$) i oleinske ($C_{18}:1$) masne kiseline (Presnec, 2017)

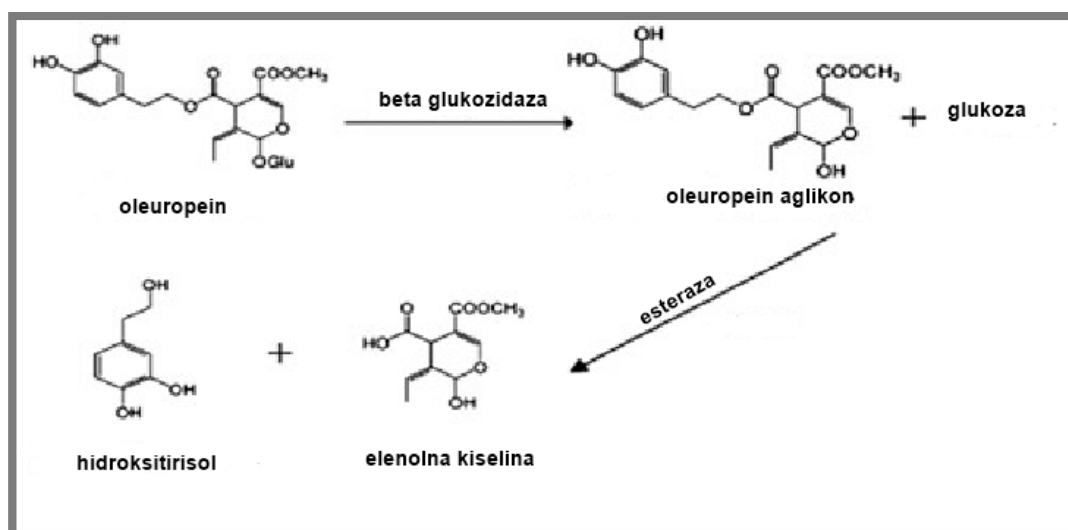
2.3.2 Fenolni spojevi

Fenolni spojevi nalaze se u svim dijelovima biljke pridonoseći boji i okusu, ali njihova priroda i koncentracija značajno varira između različitih tkiva ploda masline (Ucella, 2001). DMU obiluje fenolnim spojevima koji su primarni antioksidansi što znači da sprječavajući oksidaciju ulja i utječu na senzorska svojstva samog ulja budući da su pojedini fenoli odgovorni za svojstva gorčine, pikantnosti i oporosti (Žanetić, 2009; Caponio i sur., 2001).

Fenolni spojevi DMU mogu se podijeliti na: fenolne kiseline i alkohole, flavonoide, lignanane i sekoiridide koji su karakteristični samo za porodicu Oleaceae. Oleuropein, demetiloleuropein i ligstrozid su najznačajniji fenolni spojevi unutar grupe sekoiridida. Plod masline, pored navedenih sadrži i jednostavne fenolne spojeve, tirosol, hidroksitirosol, glikozide flavanola i složeniji verbaskozid (Bendini i sur., 2007).

Oleuropein je najzastupljeniji fenolni spoj ploda većine sorti maslina čija je koncentracija mijenja tijekom rasta. Koncentracija oleuropeina povećava se za vrijeme rasta ploda i nakon dosegnute najviše vrijednosti u nezrelim plodovima opada s početkom procesa sazrijevanja. Povećana aktivnost hidrolitičkih enzima i nakupljanje antocijana mogući su razlozi smanjenja koncentracije oleuropeina. Degradaciju oleuropeina sazrijevanjem prati nakupljanje demetiloleuropeina i glikozida elenolne kiseline (Esti i sur., 1998; Amiot i sur.,

1989). Ipak, najznačajnije promjene fenolnih tvari iz ploda odvijaju se za vrijeme prerade mljevenjem plodova i miješenjem maslinovog tijesta. Za vrijeme mljevenja i miješanja aktivira se enzim β -glukozidaza, glavni enzimski sustav koji katalizira i kontrolira hidrolizu fenolnih glikozida u mehanički oštećenom ili mikrobiološki kontaminiranom plodu masline. Njezina važnost leži u tome da katalizira hidrolizu fenolnih glikozida i time oslobađanje aglikona koji doprinose senzorskim svojstvima proizvoda (Romero-Segura i sur., 2009). Optimalni parametri izoliranih β -galaktozidaza su 45°C i pH 5,5 (Koprivnjak, 2006). Spojevi nastali iz fenolnih glikozida kao što je oleuropein, jednostavni su šećeri i aglikoni koji se esterazom cijepaju na fenolne kiseline i alkohole kao što je prikazano na slici 3.



Slika 3. Oleuropein i njegovi derivati nakon enzimske razgradnje β -glukozidazom i esterazom (prema Abdel-Shafy i sur., 2014)

Peroksidaza (POD) i polifenol-oksidaža (PPO) su enzimi odgovorni za oksidaciju fenolnih spojeva za vrijeme prerade te u konačnici zajedno s β -glukozidazom imaju snažan utjecaj na sastav fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima (El Riachy i sur., 2011; Artajo i sur., 2006; Servili i sur., 2004).

Osim prethodno spomenute grupe sekoiridoida, grupe fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju uključuju fenolne kiseline koje proizlaze iz dviju osnovnih struktura benzojeve i cimetine kiseline (vanilinska, kavena i p-kumarinska kiselina), fenolne alkohole (tirozol i hidroksitirozol), flavonoide (apiginin i luteolin) i lignanane (pinorezinol i acetoksinorezinol) (El Riachy, 2011; Angerosa i sur., 1996).

2.3.3 Hlapljive tvari

Hlapljive tvari su spojevi male molekulske mase, manje od 300 Da, koje lako isparavaju na sobnoj temperaturi (Kalua i sur., 2007) i upravo njima se pripisuje aroma, miris i ostala senzorska svojstva DMU. U maslinovom ulju prisutno je oko 280 hlapljivih spojeva od čega sedamdesetak pridonosi mirisu, a dvadesetak okusu maslinovog ulja. Ostali su prisutni u toliko niskim koncentracijama da ih osjetilima ne možemo zamijetiti (Boskou, 2006).

Različite su skupine spojeva među detektiranim hlapljivim tvarima u DMU: alkoholi, aldehidi, ketoni, eteri, esteri, furani i njihovi derivati te aromatski ugljikovodici (Kiritsakis, 1998). Većinu, 60-80 % hlapljivih spojeva čine C6 esteri, alkoholi i aldehidi koje doprinose poželjnim mirisnim svojstvima ulja. Osim poželjnih hlapljivih spojeva u DMU, postoje i hlapljive tvari koje mogu doprinijeti nepoželjnim mirisnim svojstvima, a nastaju najčešće zbog vanjskih faktora poput grešaka u skladištenju ploda, neusklađivanju berbe s vremenom procesa prerade ili zbog propusta u skladištenju samog ulja. Takvi spojevi su organske kiseline ili aldehidi poput butanske kiseline, propionske kiseline, nonanala i oktanala (Koprivnjak, 2006).

Na rast i sastav ploda, a samim time i udio hlapljivih tvari utječu brojni faktori kao što su sorta masline, starost i zdravstveno stanje stabla, zemljopisni položaj i klimatski uvjeti (Ročak, 2005). Autor Kiritsakisu (1998) navodi kako se najveća koncentracija hlapljivih tvari pojavljuje se u fazi optimalne zrelosti ploda, a smanjuje se tijekom vremena skladištenja. Od proizvodnih procesa DMU posebno je važan postupak miješenja koji uzrokuje povećanje lipofilnih komponenata, aldehida i estera, te smanjenje hidrofilnih komponenata, alkohola.

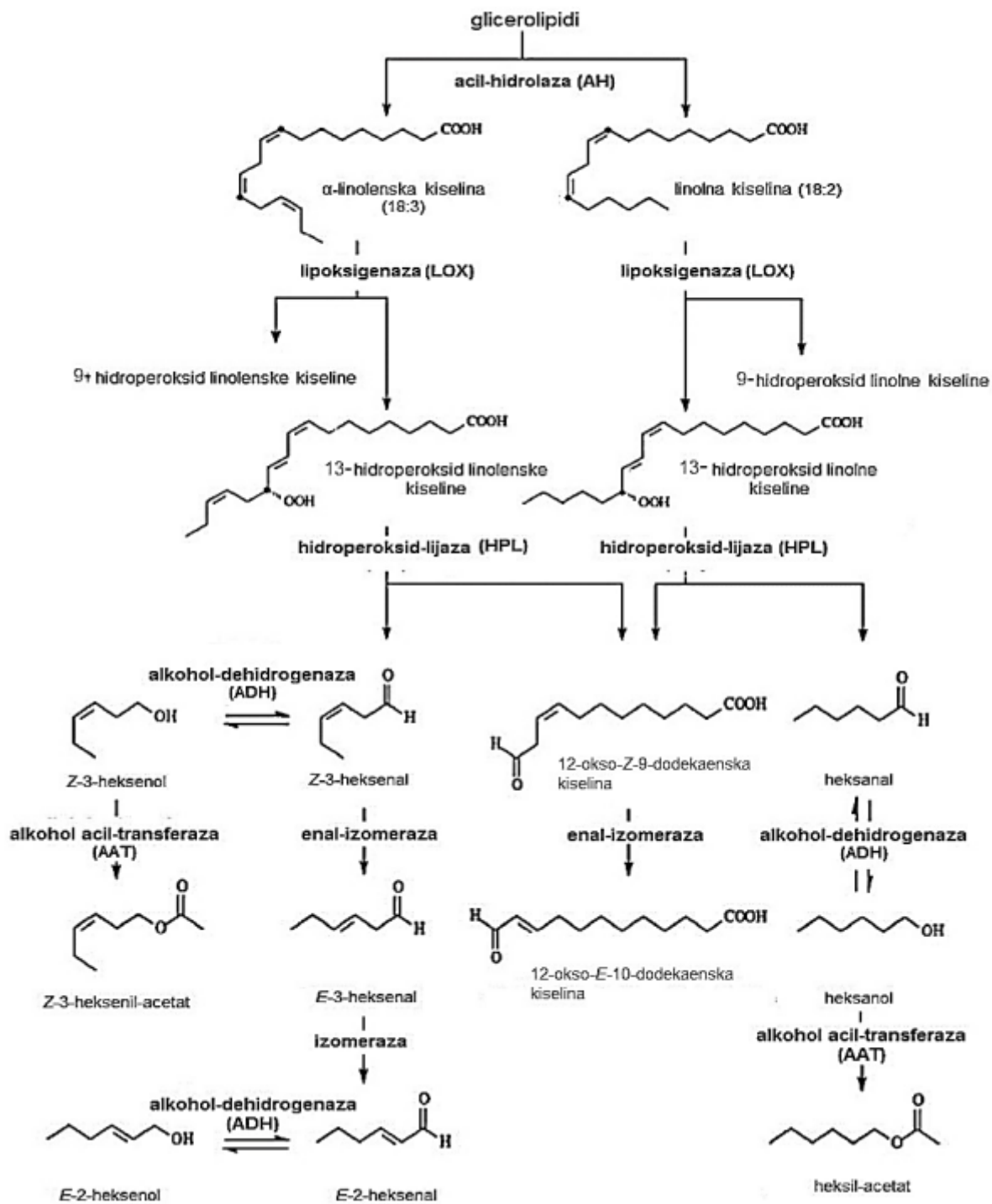
Sinteza poželjnih hlapljivih tvari djevičanskih maslinovih ulja započinje u trenutku mljevenja zdravih plodova maslina, kada se narušavanjem stanične strukture oslobađa niz enzima koji oslobađaju masne kiseline, oksidiraju ih i cijepaju do C6 i C5 hlapljivih komponenti. Sinteza hlapljivih tvari lipoksigenaznog puta nastavlja se za vrijeme miješenja maslinovog tijesta (Kalua i sur., 2007; Salas i sur., 2000).

Lipoksigenaza (LOX) pripada ne-hemskim dioksigenazama koje sadrže željezo, a katalizira uvođenje molekule kisika u višestruko nezasićene masne kiseline s barem jednim (1Z,4Z)-pentadienskim slijedom. Enzimi lipoksigenaze jedan su dio lipoksigenaznog puta i posljedica njihovog djelovanja je stvaranje C6 i C5 spojeva koji su kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi arome djevičanskog maslinovog ulja (Luaces i sur., 2007) i nosioci su zelenih nota. Biosinteza hlapljivih produkata lipoksigenaznog puta ovisi o dostupnosti esencijalnih nezasićenih masnih kiselina, prvenstveno linolne i linolenske masne kiseline, i

aktivnosti enzima lipoksigenaznog puta (LOX, hiroperekid liaze, alkohol dehidrogenaze, alkohol acetil transferaza) (Sánchez-Ortiz i sur., 2018).

Dokazano je da maslinovo ulje proizvedeno iz prezrelih maslina ima slabiji aromatski karakter upravo zbog smanjene aktivnosti enzima lipoksigenaznog puta (Servili i sur., 2015). Parametri optimalnog djelovanja za lipoksigenazu su 25°C i pH 5,0 do 5,5 (Koprivnjak, 2006).

Lipoksigenazni put prikazan je na slici 4. On započinje acil hidrolazom koja oslobađa kiseline iz glicerolipida. LOX oksidira višenezasićene masne kiseline linolenska i linolna kiselina do hidroperoksida (Angerosa, 2000). Znanstvena istraživanja u vezi afiniteta lipoksigenaze iz masline prema linolnoj i linolenskoj masnoj kiselini su oprečna. Odnosno, prema Ranalli i sur. (2001) afinitet lipoksigenaze iz masline veći je prema linolenskoj, dok postoje i rezultati gdje je veći afinitet prema linolnoj kiselini (Lorenzi i sur., 2006). Različitost afiniteta enzima prema supstratima može proizaći iz toga što lipoksigenaze iz fotosintetskog tkiva imaju veći afinitet prema linolenskoj, a iz nefotosintetskog prema linolnoj (Vick, 1993).

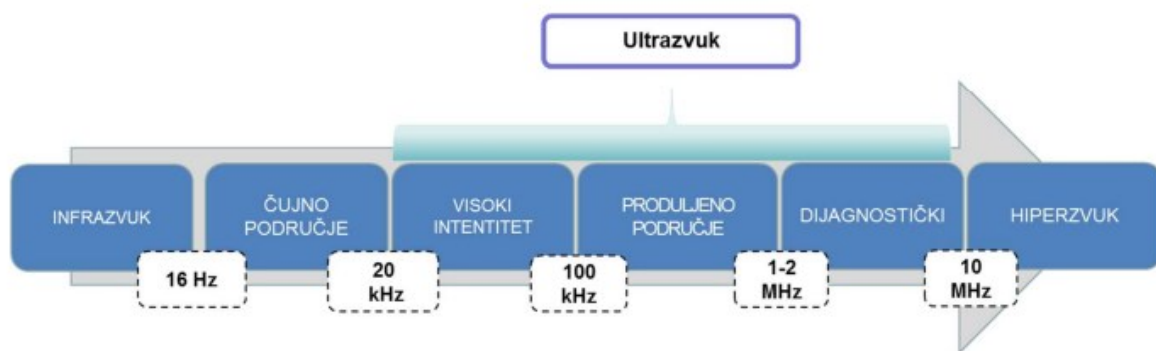


Slika 4. Lipoksigenazni put - shematski prikaz enzimski katalizirane sinteze tvari s poželjnim mirisnim svojstvima u djevičanskom maslinovom ulju (Koprivnjak, 2006)

2.4 ULTRAZVUK

Ultrazvuk definiramo kao dio zvučnog spektra čija je frekvencija viša ili jednaka 20 kHz te ju ljudsko uho ne može detektirati (Jayasooriya i sur., 2004). Zvučni val karakterizira amplituda (A), frekvencija (f), valna duljina (λ) i koeficijent prigušenja (α) koji ovisi o svojstvima materijala kroz koji ultrazvuk prolazi.

Rasponi frekvencija kojima se koristi ultrazvuk kreću se od 20 kHz do 100 MHz, a najčešće je radni raspon u granicama od 500 kHz do 20 MHz, pri čemu su frekvencije koje se koriste kod plinova niže u odnosu na frekvencije koje se koriste kod tekućina i krutina (Brnčić, 2006). Zvučni spektar prikazan je na slici 5.



Slika 5. Zvučni spektar (Dujmić, 2015)

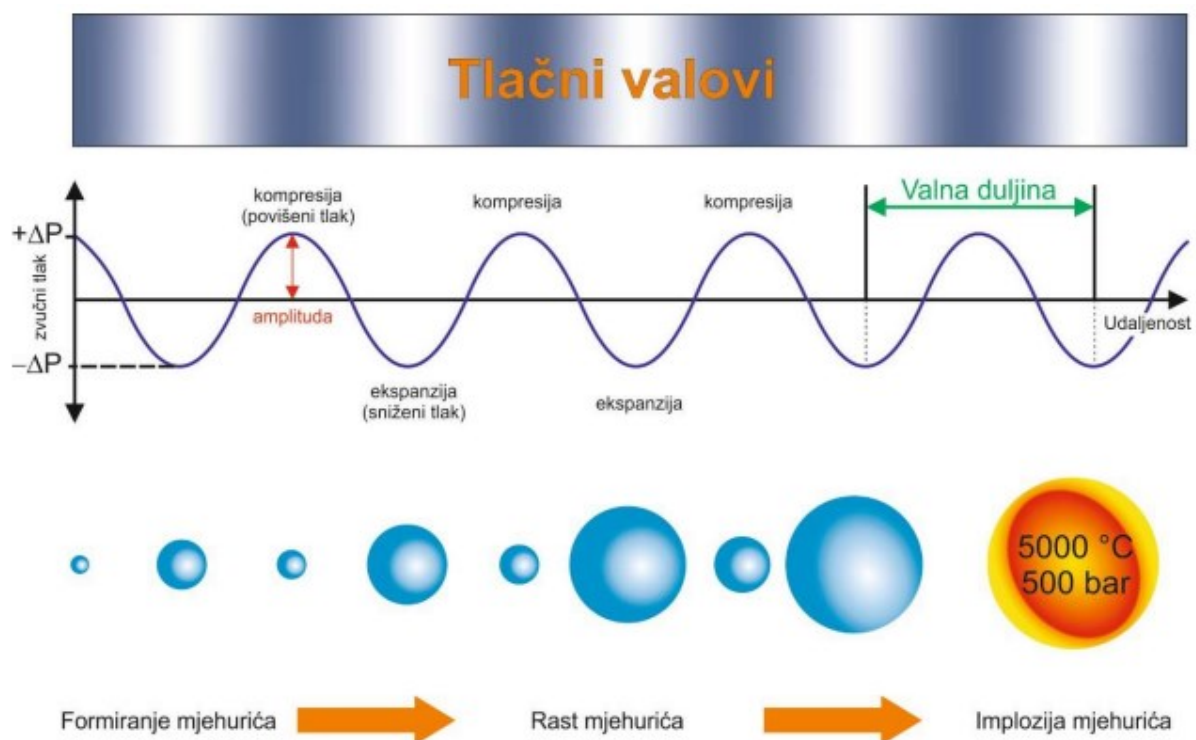
Primjena ultrazvuka može se općenito podijeliti u dva područja ovisno o intenzitetu i snazi ultrazvučnih valova:

1. Ultrazvuk niske snage - frekvencije 1-10 MHz (Mason i sur., 1996), te vrlo male razine snage (manje od 1 W cm^{-2}), uključuje valove malih amplituda i visoke frekvencije. U svojstvima materijala kroz koji prolazi val ne uzrokuje fizičke i kemijske promjene. Koristi se za mjerenja teksture, sastava, viskoznosti, određivanje koncentracije tvari u hrani, stimulaciju aktivnosti živih stanica, površinsko čišćenje hrane i utjecaj na enzime.
2. Ultrazvuk visoke snage - frekvencije 20-100 kHz (Mason i sur., 1996), te visoke razine snage (u rasponu od $10\text{-}1000 \text{ W cm}^{-2}$) ultrazvučnih valova visokih amplituda i malih frekvencija. Ultrazvuk visokog intenziteta tijekom prolaska kroz materijal uzrokuje ubrzavanje kemijskih reakcija, povećanje brzine difuzije, dispergiranje agregata ali i uništenje enzima i mikroorganizama (Herceg, 2009).

Za procesiranje hrane ultrazvučnim valovima postoji veliko zanimanje zbog toga što je transfer akustične energije do prehrambenog proizvoda trenutačan i prostire se kroz cijeli volumen proizvoda, što znači smanjenje ukupnog vremena procesiranja i manju potrošnju energije.

2.4.1 Mehanizam djelovanja ultrazvuka

Ultrazvuk visoke snage nastaje tako da dio uređaja koji se zove pretvarač pretvara električnu ili mehaničku energiju u energiju zvuka. Kada ultrazvučni val prolazi kroz medij nastaju longitudinalni valovi i stvaraju se područja promjenjivih kompresija i ekspanzija mjehurića. Nastaje mnoštvo mjehurića na mikroskopskoj razini koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a zatim implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka. Ta pojava poznata je kao kavitacija. Nastali mjehurići ispunjeni su plinom ili parom i kada prsnu dolazi do stvaranja regija vrlo visoke temperature (5500 K) i tlakova (500 bara) što je prikazano na slici 6, a posljedica je promjena fizikalno-kemijskih svojstava molekula u neposrednoj blizini (Leighton, 2007). Prilikom optimizacije primjene ultrazvuka potrebno je uzeti u obzir intenzitet ultrazvuka, temperaturu, vremenski interval i druge parametre (Režek Jambrak i sur., 2010).



Slika 6. Formiranje i urušavanje kavitacijskog mjehurića u akustičnom polju (Dujmić, 2015)

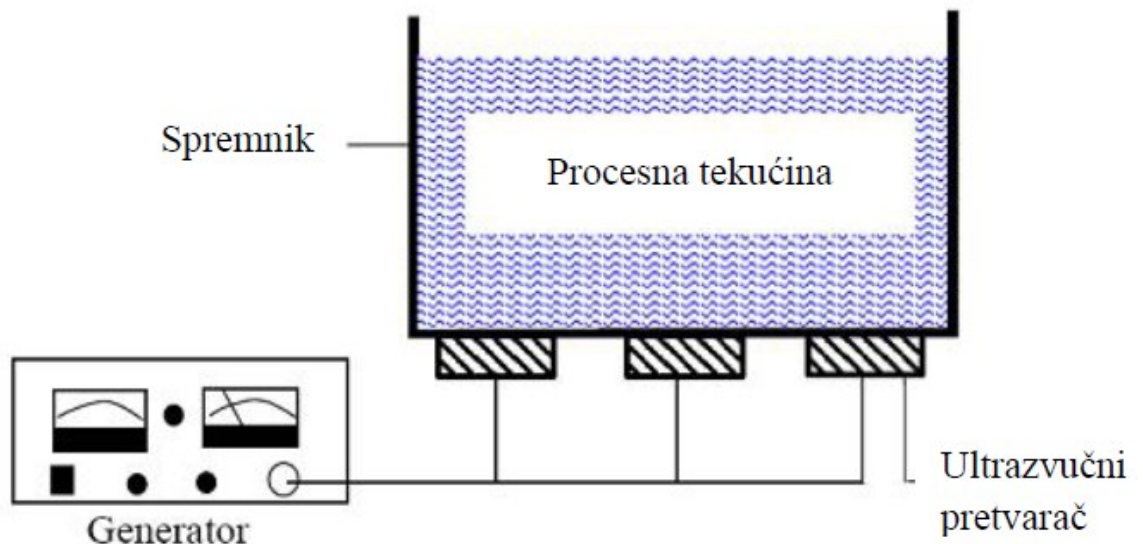
2.4.2 Ultrazvučni uređaji

Ultrazvučni uređaji razlikuju se po svojim konstrukcijama. Razlike su vidljive u dizajnu generatora snage, elemenata ultrazvuka koji se koriste, reaktora i ćelije koja je povezana sa izvorom ultrazvuka. Prema navedenim razlikama koriste se:

- ultrazvučne kupelji,
- ultrazvučne sonde,
- oprema koja uključuje paralelno vibrirajuće ploče,
- radijalno vibrirajući sustavi.

Najčešće se koriste sonde i kupelji. Ultrazvučne kupelji se zbog svoje lake dostupnosti i pristupačne cijene najčešće koriste u laboratorijskim uvjetima. Kod ultrazvučne kupelji, shematski prikazane na slici 7, pretvornik je smješten na dno spremnika te se vibracije direktno predaju na medij koji se nalazi unutar spremnika.

Zbog različitih konstrukcijskih izvedbi ultrazvučnih kupelji velik je broj parametara koji se mogu proučavati, kao što su termostatski kontrolirano grijanje i promjenjiva snaga ili električni mjerači vremena koji omogućuju različito trajanje tretmana i perioda kad je isključen.



Slika 7. Ultrazvučna kupelj (Režek Jambrak i sur., 2010)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Kao materijal u ovom diplomskom radu korišteni su komercijalno dostupni izolati enzima β -glukozidaze iz *Prunus dulcis* (Sigma-Aldrich) i lipoksigenaze iz *Glycine max* (Sigma-Aldrich).

3.2. REAGENSI

- Albumin goveđeg seruma (Santa Cruz Biotechnology)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich)
- β -glukozidaza (Sigma-Aldrich)
- Deionizirana voda
- Etanol (96% v/v) (Gram-mol)
- Fosforna kiselina (85% v/v) (Carlo Erba Reagens)
- Klorovodična kiselina (37% v/v) (Fischer Scientific)
- Linolenska kiselina (Sigma-Aldrich)
- Lipoksigenaza (Sigma-Aldrich)
- 4-nitrofenilglukopiranozid (Sigma-Aldrich)
- Natrijev acetat (Kemika)
- Natrij dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika)
- Natrijev hidrogenfosfat (bezvodni) (Kemika)
- Natrijev hidroksid (Kemika)
- Natrijev karbonat (Gram Mol)
- Octena kiselina (99 % v/v) (Lachner)
- Tween 40 (Fluka)

3.3. METODE

3.3.1. Priprema modelnih otopina

Modelna otopina za određivanje aktivnost β -glukozidaze sastojala se od 1,5 mL otopine *p*-nitrofenilglukopiranozida (*p*-NPG, $c=15$ mM) u acetatnom puferu ($c=0,5$ M) pH 5,5 i 20 μ L otopine enzima ($\gamma=5$ mg/mL) otopljenog u istom acetatnom puferu. Za određivanje aktivnosti lipoksigenaze modelna otopina sadržavala je 2,5 mL 0,1 M fosfatnog pufera pH 6,0; 50 μ L otopine enzima ($\gamma=5$ mg/mL) u istom puferu i 50 μ L supstrata (10 mM otopine linolenske masne kiseline). Otopina masne kiseline pripremljena je prema metodi Axelrod i suradnika (1981). 190 μ L linolenske masne kiseline zajedno s 256 μ L Tween-40 dodalo se u 5 mL deionizirane vode u koju se prethodno upuhivao dušik. Sadržaj se pažljivo miješao pazeći da se ne zapjeni, a otapanje emulzije se pospješi dodatkom 600 μ L 1 M NaOH te se tikvica od 25 mL nadopuni vodom, u koju se prethodno upuhivao dušik, do oznake. Nakon pripreme, otopina je čuvana na -80°C i korištena za izradu 10 mM otopine masne kiseline.

3.3.2. Simulacija procesa miješenja

Kako bi se odredila aktivnost enzima (β -glukozidaze i lipoksigenaze) tijekom procesa miješenja maslinova tijesta, napravljene su modelne otopine enzima i supstrata, promiješane 10 s na Vortex mješalici i temperirane u kupelji kroz 1, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 minuta na 25°C . Nakon temperiranja, spektrofotometrijski je određena količina nastalog produkta prema metodama opisanim u potpoglavlju 3.3.5 Određivanje aktivnosti β -glukozidaze i 3.3.6 Određivanje aktivnosti lipoksigenaze.

3.3.3. Ubrzani toplinski tretman (UTT)

Za utvrđivanje utjecaja početne temperature tijesta maslina na aktivnost enzima tijekom procesa miješenja, otopine enzima i supstrata su prije miješenja temperirane na temperaturama od 15, 20, 25, 30, 35 i 40°C . Nakon što su pripremljene modelne otopine, temperirane su na zadanoj temperaturi 1 minutu te je određena aktivnost prema metodama opisanim u potpoglavljima 3.3.5. i 3.3.6. Nakon toga, modelne otopine su temperirane 30 minuta na 25°C (proces koji simulira miješenje tijesta) te je ponovno određena aktivnost enzima ranije navedenim metodama.

3.3.4. Tretman ultrazvukom (UZV)

Modelne otopine enzima i supstrata tretirane su u ultrazvučnoj kupelji kroz 1, 2, 5, 8, i 12 minuta tretmana sa 20 %, 50 % i 100 % kapaciteta snage ultrazvuka (maksimalna snaga ultrazvučne kupelji Bandelin sonorex digiplus je 640W; Bandelin electronic, Berlin, Njemačka) kako bi se utvrdio utjecaj ultrazvuka na aktivnost enzima ploda masline. Početna temperatura kupelji prije svakog tretmana bila je 25 °C. Nakon tretmana, uzorci su u slijedećih 15 sekundi prebačeni u spektrofotometrijske kivete te je određena aktivnost prema metodama opisanim u potpoglavljima 3.3.5. i 3.3.6. Osim toga, modelne otopine su nakon tretmana temperirane dodatnih 30 minuta na 25 °C kako bi se simulirao postupak miješenja tijesta te je ponovno određena aktivnost enzima navedenim metodama.

3.3.5. Određivanje aktivnosti β-glukozidaze

Aktivnost β-glukozidaze mjerila se prema metodi koju su u svom radu opisali Romero-Segura i sur. (2009). Princip određivanja temelji se na mjerenju povećanja apsorbancije na 405 nm uzrokovane odcjepljivanjem molekule glukoze s *p*-nitrofenilglukopiranozida (*p*-NPG) pod djelovanjem β-glukozidaze i formiranjem *p*-nitrofenola (*p*-NP).

Nakon provedenog tretmana, modelne otopine prebace se u semimikro kivete volumena 1,5 mL te se mjeri apsorbancija na 405 nm. Paralelno je određena apsorbancija samog enzima (20 μL otopine enzima u 1,5 mL acetatnog pufera) i apsorbancija samog *p*-NPG-a (1,5 mL s 20 μL acetatnog pufera). Razlika apsorbancija (ΔA) izračunata je prema formuli [1] a koncentracija *p*-nitrofenola prema formuli [2] uzimajući u obzir njegov molarni ekstincijski koeficijent koji iznosi 552,8 M⁻¹ cm⁻¹.

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

gdje je

- A_1 – apsorbancija modelne otopine
- A_2 – apsorbancija enzima u modelnoj otopini
- A_3 – apsorbancija *p*-NPG-a u modelnoj otopini

$$c(p\text{-NP}) = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l} 1000 \quad [2]$$

gdje je

- $c(p\text{-NP})$ – koncentracija *p*-nitrofenola (mM)
- ΔA – apsorbancija *p*-nitrofenola pri 405 nm
- ϵ – molarni ekstincijski koeficijent *p*-nitrofenola (552,8 M⁻¹ cm⁻¹)
- l – širina kivete (1 cm)

Aktivnost enzima izražena je kao količina *p*-nitrofenola koju proizvede 1 mg β-glukozidaze i izračuna se prema formuli [3]. Točna koncentracija proteina u otopini enzima metodom po Bradford-u opisanoj u podpoglavlju 3.3.7.

$$AE = \frac{c(\text{produkta})}{\gamma(\text{proteina})} \quad [3]$$

gdje je

- AE – aktivnost enzima
- $c(\text{produkta})$ – koncentracija formiranog *p*-nitrofenola (mM)
- $\gamma(\text{proteina})$ – koncentracija proteina u otopini enzima (mg mL^{-1})

3.3.6. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze

Određivanje aktivnosti lipoksigenaze provelo se prema metodi iz rada Luaces i sur. (2007). Metoda se zasniva na mjerenju količine nastalih hidroperoksida koji pokazuju maksimum apsorbancije na 234 nm.

Modelne otopine prebace se u kvarcne kivete te se mjeri apsorbancija na 234 nm. Paralelno je određena apsorbancija samog enzima (50 μL otopine enzima u 2,55 mL fosfatnog pufera) i apsorbancija same masne kiseline koja se koristila kao supstrat (50 μL linolenske masne kiseline u 2,55 mL fosfatnog pufera). Razlika apsorbancija (ΔA) izračunata je prema formuli [4] a koncentracija hidroperoksida linolenske masne kiseline prema formuli [5] uzimajući u obzir molarni ekstincijski koeficijent od $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$\Delta A = A_1 - A_2 - A_3 \quad [4]$$

gdje je

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

$$c(\text{hidroperoksida}) = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l} 1000 \quad [5]$$

gdje je

- $c(\text{hidroperoksida})$ – koncentracija hidroperoksida (mM)
- ΔA – apsorbancija hidroperoksida pri 405 nm
- ϵ – molarni ekstincijski koeficijent ($2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- l – širina kivete (1 cm)

Aktivnost enzima izražena je kao količina produkta koju proizvede 1 mg enzima i izračuna se prema formuli [6]. Točna koncentracija proteina u otopini lipoksigenaze metodom po Bradford-u opisanoj u podpoglavlju 3.3.7.

$$AE = \frac{c(\text{hidroperoksid})}{\gamma(\text{proteina})} \quad [6]$$

gdje je

- AE – aktivnost enzima
- c(hidroperoksida) – koncentracija nastalih hidroperoksida (mM)
- $\gamma(\text{proteina})$ – koncentracija proteina u otopini enzima (mg mL^{-1})

3.3.7. Određivanje proteina po Bradford-u

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

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

Za izračun koncentracije proteina izrađena je baždarna krivulja [7] pomoću standardnih otopina albumina goveđeg seruma u koncentracijama od 0,01 do 0,5 mg mL^{-1} .

$$\gamma(\text{proteina}) = \frac{A-0,1877}{6,3294} \quad [7]$$

gdje je

- $\gamma(\text{proteina})$ – masena koncentracija proteina (mg mL^{-1})
- A – apsorbancija otopine proteina pro 595 nm

Koeficijent korelacije za baždarnu krivulju (r) iznosi 0,997.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Enzimi, katalizatori u živim sustavima, važni su molekularni uređaji koji usmjeruju kemijske pretvorbe. Enzimi su visoko specifični, i po reakcijama koje kataliziraju, i po svojem izboru reaktanata, koje nazivamo supstratima (Berg i sur., 2013).

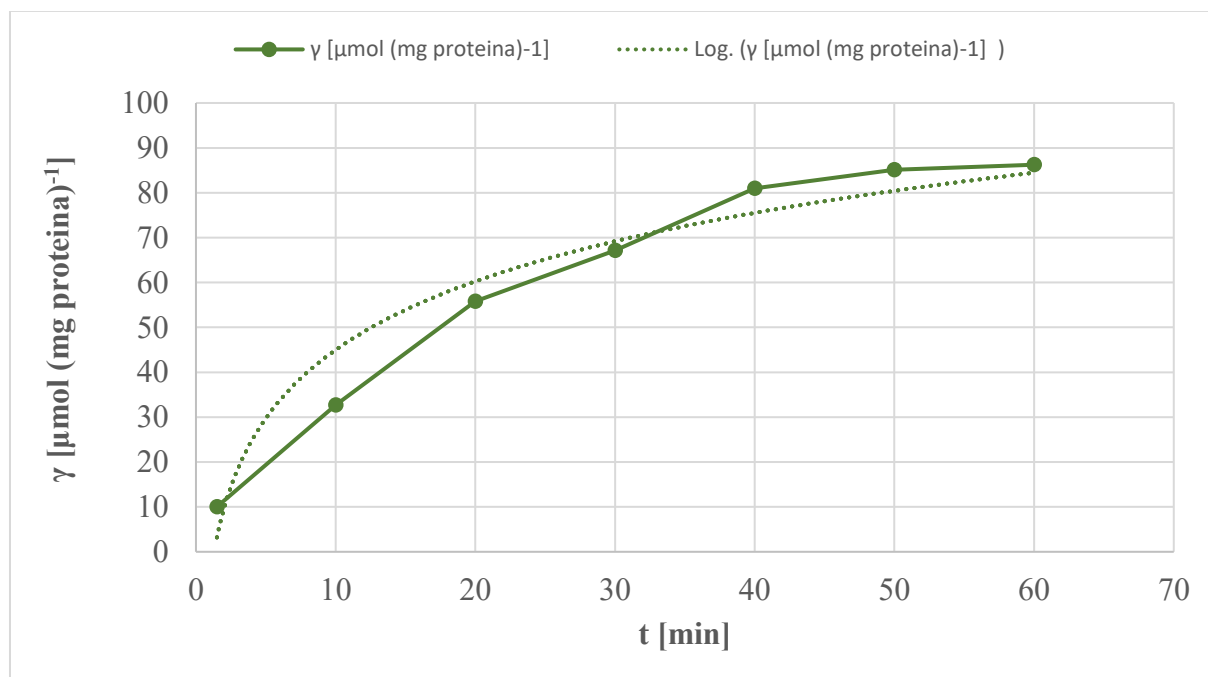
Za vrijeme miješenja, fazi proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja (DMU) koja može trajati i do jednog sata, događaju se mnoge enzimske reakcije koje mogu utjecati pozitivno ili negativno na kvalitetu i nutritivnu vrijednost ulja (Yahyaoui i Ghayth, 2019).

Povišenjem temperature maslinovog tijesta može se postići smanjenje viskoznosti tijesta koje dovodi do boljeg odvajanja i većih iskorištenja procesa proizvodnje ulja (Kalua i sur., 2006). Također, povišenje temperature prije postupka miješenja moglo bi aktivirati ili inaktivirati enzime koji formiraju poželjne spojeve DMU. Nove tehnologije proizvodnje poput ultrazvuka (UZV) pokazale su značajan potencijal u ubrzanju cijelog procesa proizvodnje DMU upravo skraćivanjem vremena miješenja, a dobivanjem ulja koje sadrži jednake ili veće koncentracije poželjnih produkata enzimskih reakcija.

Stoga je cilj ovog rada bio istražiti kako ubrzani toplinski tretman (UTT) i UZV kao predtretman i tretman utječu na enzime ploda masline β -glukozidazu i lipoksigenazu (LOX). Aktivnost enzima pratila se mjerenja koncentracije *p*-nitrofenola (*p*-NP-a) za β -glukozidazu i hidroperoksida linolenske masne kiseline kao pokazatelja aktivnosti LOX. Kako bi se utvrdio utjecaj temperature na aktivnost enzima, proveden je UTT hlađenjem ili grijanjem modelnih otopina na temperaturama od 15 °C do 40 °C a aktivnost je izmjerena nakon jedne i nakon trideset minuta reakcije. Mjerenja za UZV kao predtretman i tretman provodila su se nakon 1, 2, 5, 8 i 12 minuta pri snagama ultrazvučne kupelji od 20 %, 50 %, i 100 % kapaciteta od 640 W i opet nakon trideset minuta (koje simuliraju proces miješenja).

4.1 UTJECAJ VREMENA MIJEŠENJA NA AKTIVNOST ENZIMA

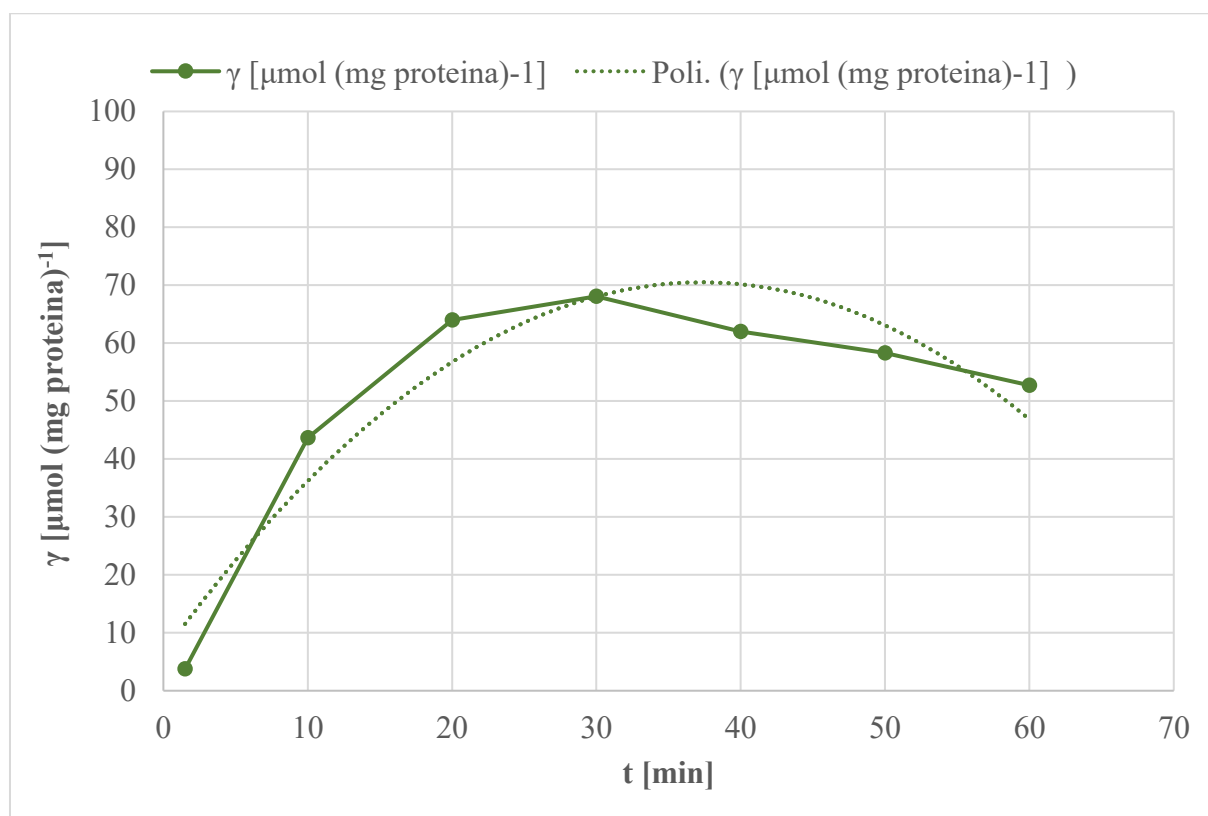
Vrijeme i temperatura miješenja može utjecati na kemijski sastav DMU (Inarejos-Garcia i sur., 2009; Di Giovacchino i sur., 2002). Stoga su istodobne promjene u parametrima vremena i temperature tijekom miješenja najizvediviji sustavni način kako utjecati na fenolni i hlapljivi sastav ulja (Kalua i sur., 2006). Na slici 8 prikazana je ovisnost koncentracije *p*-nitrofenola (*p*-NP) o vremenu pri konstantnoj temperaturi od 25 °C kao pokazatelj aktivnosti enzima β -glukozidaze i aproksimirana logaritamska funkcija: $y = 22,028\ln(x) - 5,737$ uz koeficijent determinacije $R^2 = 0,9457$. Vidljivo je kako protokom vremena koncentracija produkta β -glukozidaze kontinuirano raste. Taj rast u prvih dvadeset minuta je linearan i značajan, a nakon toga porast koncentracije slijedi logaritamsku funkciju. Nakon četrdesete minute porast koncentracije je manji u zadanim intervalima tako da se vrijeme od četrdeset minuta miješenja čini kao optimalno. Izmjereni rezultati imaju dobru korelaciju s aproksimiranom logaritamskom krivuljom. Ovi rezultati su u skladu s onima koji su već objavljeni u literaturi o aktivnosti β -glukozidaze (Elshafei i sur., 2011).



Slika 8. Ovisnost koncentracije *p*-nitrofenola o vremenu pri konstantnoj temperaturi od 25 °C kao pokazatelj aktivnosti enzima β -glukozidaze (puna linija pokazuje izmjerene rezultate a isprekidana aproksimiranu logaritamsku funkciju $y = 22,028\ln(x) - 5,737$ uz koeficijent determinacije $R^2 = 0,9457$)

Vujnović (2021) koja je svoje istraživanje provela u istom laboratoriju dobila je veći afinitet lipoksigenaze (LOX-a) za linolensku masnu kiselinu pa se na osnovu tog rada išlo u daljnje istraživanje aktivnosti LOX-a s linolenskom masnom kiselinom.

Koncentracija hidroperoksida (slika 9) nastalog djelovanjem enzima lipoksigenaze na linolensku masnu kiselinu pokazala je rast do 30. minute, pri čemu je postignuta najviša vrijednost od 68,1 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$ nakon čega dolazi do pada koncentracije. Unutar 30 minuta tijekom kojih je uočen rast koncentracije nastalog hidroperoksida, prema slici 9 vidljivo je da u prvih 20 minuta koncentracija značajno raste, a istekom 20 minuta može se uočiti usporavanje rasta krivulje koncentracije hidroperoksida do dostizanja maksimuma u 30. minuti. Rast u prvih 20 minuta je 7,42 puta veći nego u idućih 10 minuta.



Slika 9. Ovisnost koncentracije hidroperoksida linolenske masne kiseline o vremenu pri konstantnoj temperaturi od 25 °C, kao pokazatelj aktivnosti enzima lipoksigenaze (puna linija pokazuje izmjerene rezultate a isprekidana aproksimiranu polinomnu funkciju $y = -0,046x^2 + 3,4317x + 6,4808$ uz koeficijent determinacije $R^2 = 0,8993$)

Razlozi pada koncentracije hidroperoksida nakon 30 minuta reakcije mogu biti višestruki. Najizgledniji razlog smanjenja koncentracije hidroperoksida u ovom slučaju jest spontani raspad hidroperoksida. Formiranje hlapljivih tvari DMU u lipoksigenaznom putu jest

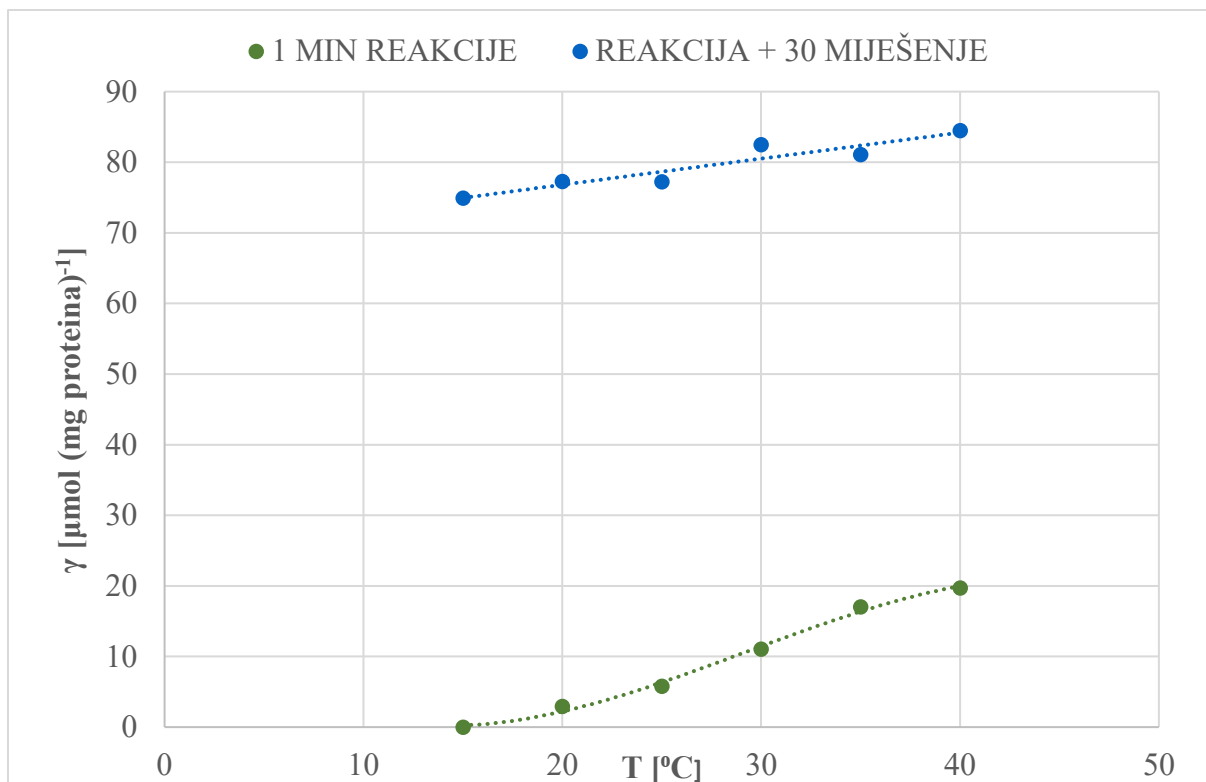
zapravo lanac enzimatskih reakcija koje počinju odcjepljivanjem linolenske ili linolne kiseline hidrolizom s molekule triacilglicerola. LOX ih koristi kao supstrate i pretvara u 9-hidroperoksida ili 13-hidroperoksida koji su nestabilni i lako se raspadaju na sekundarne produkte, aldehide koji su nositelji mirisnih karakteristika DMU (Tsimidou i sur., 2020). Osim toga, razgradnja hidroperoksida je moguća i pomoću homolitične razgradnje koju katalizira upravo LOX (Salas i sur., 2013). Dakle, dodatna grana lipoksigenaznog puta je aktivna kada je supstrat linolenska masna kiselina i osim sinteze hidroperoksida, LOX katalizira i njihovu razgradnju putem alkoksi radikala, nakon čega slijedi niz reakcija koje mogu dovesti do C5 alkohola kao produkata (Angerosa i sur., 2004).

4.2 UTJECAJ TEMPERATURE NA AKTIVNOST ENZIMA

Fregapane i Salvador (2013) donose u svom preglednom radu zaključak kako je za povećanje fenolnih tvari u djevičanskom maslinovom pomoću postupka miješenja potrebna veća temperatura miješenja i kraće vrijeme, a za povećanje hlapljivih tvari potrebna je niža temperatura miješenja kroz dulje vrijeme. Stoga je potrebno naći optimalne uvjete kako bi se dobilo najviše od obje vrste spojeva.

Dokazano je da β -glukozidaze pokazuju optimalnu aktivnost na temperaturama između 40-45 °C (Romero-Segura i sur., 2009).

U ovom diplomskom radu provedeno je mjerenje pri različitim vrijednostima temperature, od 15 °C do 40 °C, a rezultati su prikazani na slici 10, gdje je prikazana ovisnost koncentracije *p*-nitrofenola, kao pokazatelja aktivnosti β -glukozidaze, o temperaturi nakon jedne minute reakcije te nakon jedne minute reakcije i trideset minuta miješenja.



Slika 10. Ovisnost koncentracije *p*-nitrofenola o temperaturi nakon jedne minute reakcije te nakon jedne minute reakcije i trideset minuta miješenja

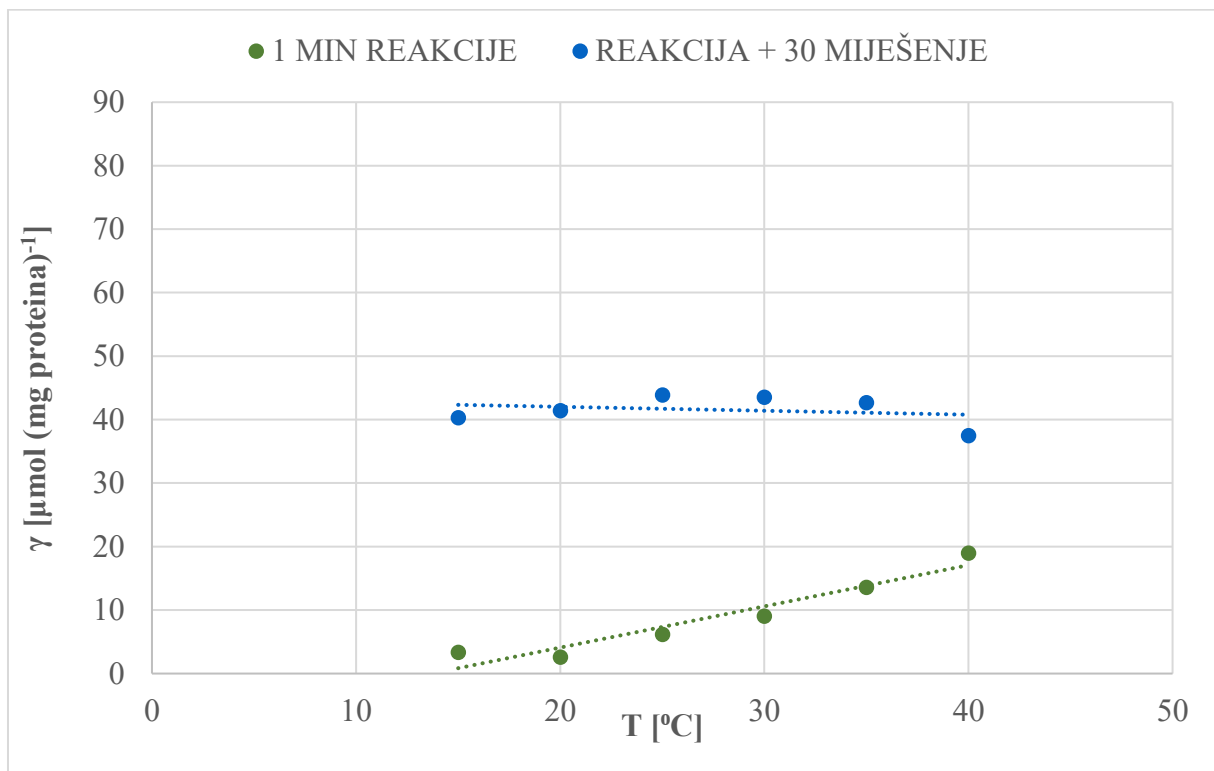
Rezultati su u skladu s onima već objavljenim u literaturi (Terefe i sur., 2013). Koncentracija *p*-NP-a, a samim time i aktivnost enzima β -glukozidaze od 15 °C do 40 °C kontinuirano raste s porastom temperature u oba slučaja: i nakon jednog minute reakcije i nakon dodatnih trideset minuta reakcije.

U slučaju minute reakcije pri temperaturi od 15 °C nije zabilježena koncentracija *p*-NP-a, pa samim time nema ni aktivnosti enzima. Porastom temperature iznad 15 °C raste i koncentracija *p*-NP-a, pri čemu je najveća koncentracija od 19,7 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$ postignuta pri temperaturi od 40 °C. Naknadnom reakcijom od 30 minuta pri 25 °C koja simulira proces miješenja uočava se blagi linearni rast aktivnosti s porastom početne temperature (slika 10).

Može se uočiti i da jedna minuta reakcije s predgrijanjem reaktanata na 40 °C uz trideset minuta miješenja daje 1,26 puta veću koncentraciju *p*-NP-a nego kada bi reakciju provodili na 25 °C kroz trideset minuta kako je prikazano na slici 8 u prethodnom podpoglavlju. To je također 99,3 % koncentracije nastalog *p*-NP-a za 50 minuta što znači da se ovim postupkom skratilo vrijeme za 20 minuta.

Taticchi i sur. (2019) izvjestili su da temperature veće od 30 °C smanjuju aktivnost dvaju osnovnih enzima lipoksigenanog puta: LOX i hidroperoksid liaze što posljedično dovodi do smanjene koncentracije hlapljivih tvari. Dakle, porast temperature ima negativan utjecaj na hlapljive tvari koje doprinose voćnom mirisu DMU (Angerosa i sur., 2001).

Rezultati mjerenja ovisnosti koncentracije hidroperoksida linolenske masne kiseline, kao pokazatelja aktivnosti lipoksigenaze, o temperaturi nakon jedne minute reakcije te nakon jedne minute reakcije i trideset minuta miješenja prikazani su na slici 11.



Slika 11. Ovisnost koncentracije hidroperoksida linolenske masne kiseline o temperaturi nakon jedne minute reakcije te nakon jedne minute reakcije i trideset minuta miješenja

Rezultati pokazuju rast za minutu reakcije tj. rast koncentracije hidroperoksida sa porastom temperature što se može pripisati povećanju kinetike enzima uslijed povećanja temperature. Najbolji postignuti rezultat za jednominutnu reakciju s predgrijanjem pokazao se na najvišoj zadanoj temperaturi i iznosio je 18,96 μmol mg proteina⁻¹. No kada se k tome doda i trideset minuta miješenja, rezultat koncentracije hidroperoksida nije najveći u najvišoj mjerenoj temperaturi već pri 25 °C i iznosi 43,89 μmol mg proteina⁻¹. To je u skladu s već postojećim istraživanjima da temperature veće od 30 °C smanjuju aktivnost LOX (Ngin i sur., 2021).

Kada se rezultat dobiven za predgrijanje modelne otopine na 25 °C uz 30 minuta miješenja usporedi sa 30 minuta miješenja pri 25 °C iz prethodnog podpoglavlja gdje su početni parametri istovjetni dobije se 1,55 puta manje hidroperoksida.

Objašnjenje se može potražiti u stabilnosti hidroperoksida i termostabilnosti izoenzima LOX. Otkrivene su različite vrijednosti za termostabilnost LOX enzima što se može pripisati činjenici da LOX enzim iz soje postoji u više izoformi koje se razlikuju prema afinitetu prema supstratu, stereospecifičnosti i optimalnim pH vrijednostima (Kalua i sur., 2007; Glickman i Klinman, 1995).

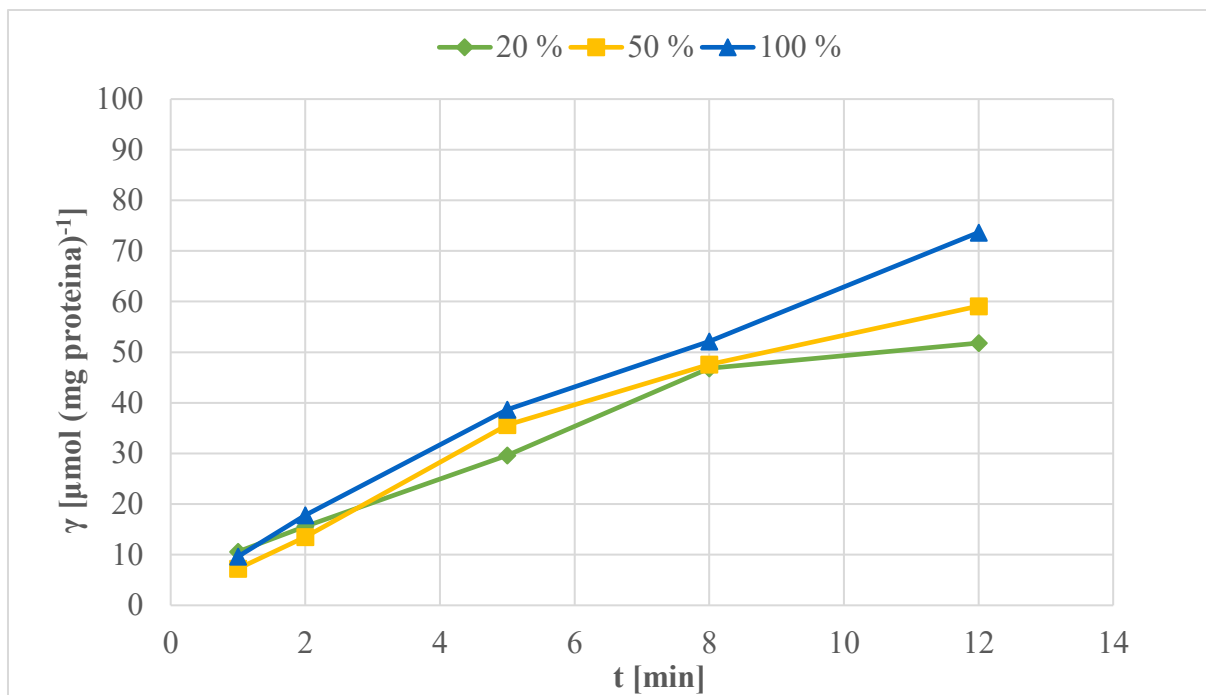
Hidroperoksidi su nestabilni spojevi i razlažu se na radikale (uglavnom alkoksilne i hidroksilne radikale) koji slijede različite puteve kako bi proizveli veliki broj sekundarnih oksidacijskih proizvoda. Hidroperoksidi nastaju i razgrađuju se istovremeno i čine najzastupljenije spojeve u uvjetima niskih i umjerenih temperatura. Kada se hidroperoksidi akumuliraju u relativno visokim razinama, njihova razgradnja postaje brža od njihovog stvaranja, a ukupna stopa oksidacije raste eksponencijalno.

Linolenska masna kiselina pri povišenoj temperaturi može se razgraditi samim povišenjem temperature ili autooksidacijom. U linolenskoj kiselini, s tri dvostruke veze, postoje dvije bis-alilne metilenske skupine koje djeluju neovisno i međusobno se ne aktiviraju. Dakle, iz svake strukture 1,4-pentadiena nastaju dva hidroperoksida, s jedne strane 9- i 13-hidroperoksidi, a s druge 12- i 16-hidroperoksidi.

4.3 UTJECAJ ULTRAZVUKA NA AKTIVNOST ENZIMA

Poznato je da ultrazvučni valovi mogu izazvati aktivaciju ili inaktivaciju enzima procesa koji su katalizirani enzimima. Enzimska inaktivacija se može odviti kroz tri mehanizma. Prvi je kroz samu termalnu inaktivaciju zbog povišenja temperature koja je rezultat kavitacije. Druga mogućnost je djelovanjem slobodnih radikala nastalih razgradnjom vode, a treća mogućnost je djelovanjem samih mehaničkih sila nastalih od udarnih valova ultrazvuka (Yahyaoui i Ghayth, 2019).

Na slikama 12 i 13 prikazani su rezultati mjerenja ovisnosti koncentracije *p*-NP-a o vremenu ultrazvučnog tretmana bez i s postupkom miješenja od trideset minuta. Ultrazvučni tretman se provodio pri tri različite vrijednosti snage ukupnog kapaciteta: 20, 50 i 100 %.

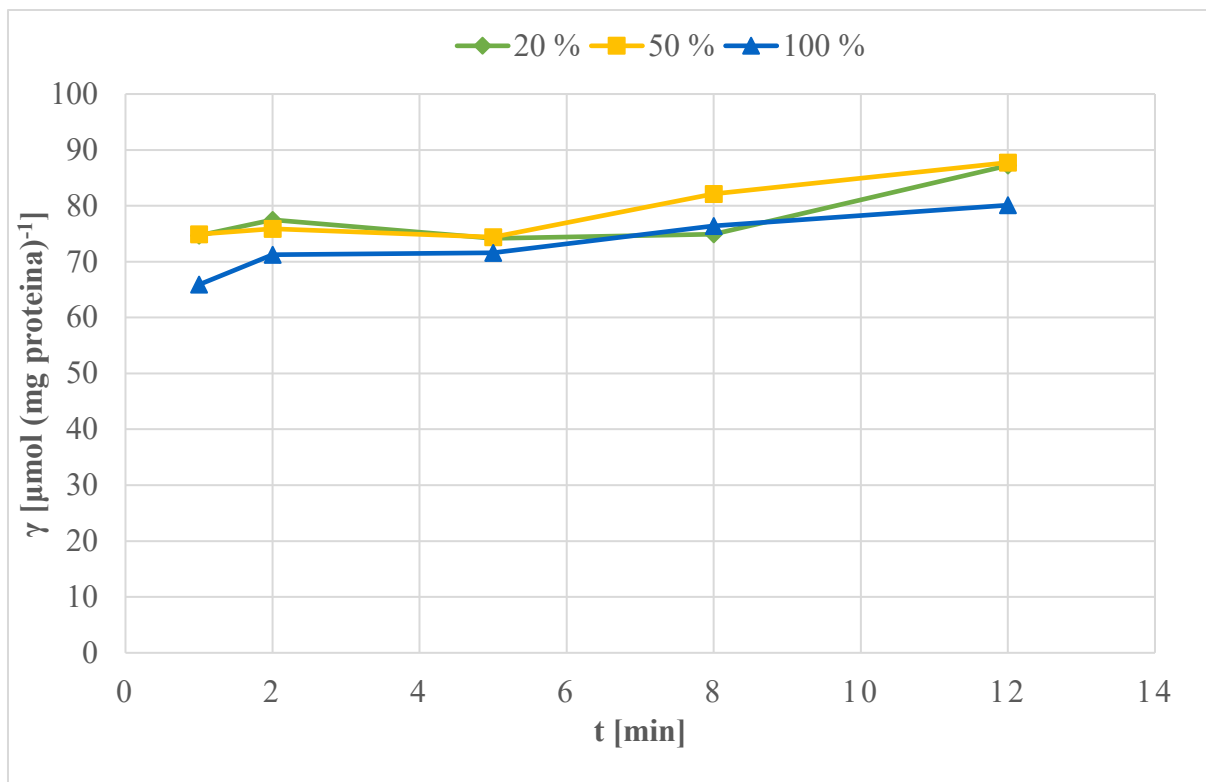


Slika 12. Ovisnost koncentracije *p*-nitrofenola o vremenu ultrazvučnog tretmana pri tri različite snage ultrazvuka (20 %, 50 % i 100 %) kao pokazatelj aktivnosti enzima β -glukozidaze

Tretman reakcijske smjese samo ultrazvukom pokazao je da najveća snaga ultrazvuka daje najveću koncentraciju *p*-NP-a. Do osme minute koncentracije su najbliže za sve tri snage tretmana, a sa produljenjem vremena ta razlika značajno raste u korist veće snage tretmana jer je koncentracija *p*-NP-a veća 1,25 odnosno 1,42 puta za tretman najvećom snagom.

Koncentracija nastalog *p*-NP-a uz ultrazvučni tretman tijekom 12 minuta na 100 % snage u usporedbi sa 60 minuta vremena ili sa UTT postupkom ne pokazuje veću koncentraciju. Ipak, tijekom 12 minuta ultrazvučnog tretmana postigla se koncentracija 1,1 puta veća nego za 30 minuta bez ikakvog tretmana i 95 % koncentracije kao temperaturnim predtretmanom na 25 °C uz trideset minuta miješenja što je vremensko skraćivanje procesa od 18 minuta.

Kada se ultrazvučnim tretmanima od dvanaest minuta doda postupak od trideset minuta miješenja uočava se veća koncentracija *p*-NP-a za tretmane pri nižim snagama ultrazvuka (20 i 50 %) u odnosu na jednosatno miješenje i UTT postupak. Ipak, to povećanje je marginalno, svega 1,02 puta veće pa se može zaključiti kako manje snage ultrazvuka nemaju značajan utjecaj na aktivnost β -glukozidaze.

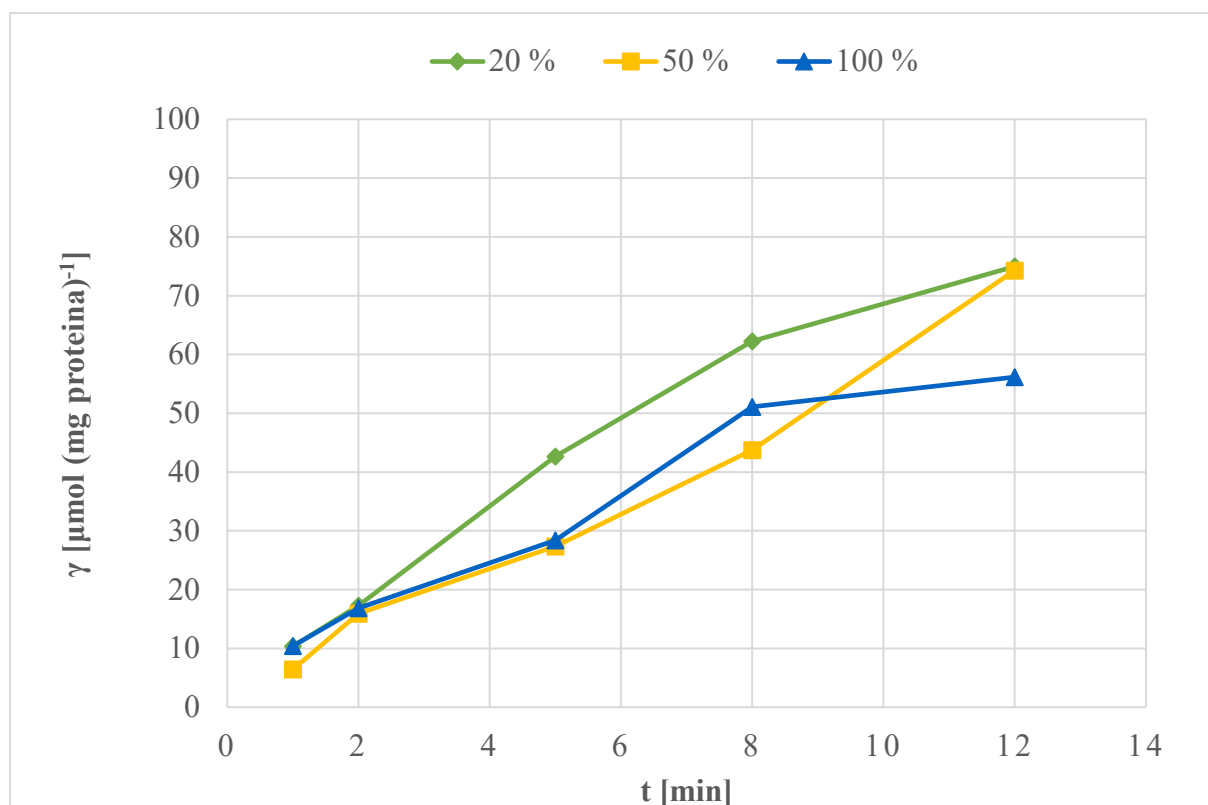


Slika 13. Ovisnost koncentracije *p*-nitrofenola o vremenu ultrazvučnog tretmana pri tri različite snage ultrazvuka (20 %, 50 % i 100 %) zajedno s trideset minuta miješenja kao pokazatelj aktivnosti enzima β -glukozidaze

Treba uzeti u obzir i činjenicu da ultrazvučni tretman neminovno podiže temperaturu reakcijske smjese i logično je zaključiti da će duže vrijeme tretmana na većoj snazi dovesti do većeg povišenja temperature reakcijske smjese. Početna temperatura za sva mjerenja bila je 25 °C, a konačne temperature nakon 12 minuta tretmana sa snagama 20, 50 i 100 % kapaciteta iznosile su redom: 27,5 °C, 30,6 °C i 38 °C. Temperature nisu dosegle vrijednosti koje bi inaktivirale enzim za ove procesne parametre već upravo suprotno, povećale njegovu aktivnost i ovi su rezultati u skladu s rezultatima utjecaja UTT-a na aktivnost β -glukozidaze.

Na slikama 14 i 15 prikazani su rezultati mjerenja ovisnosti koncentracije hidroperoksida o vremenu ultrazvučnog tretmana bez i s postupkom miješenja od trideset minuta pri tri različite snage ultrazvuka. Koncentracija hidroperoksida pokazatelj je aktivnosti enzima lipoksigenaze.

Kod ultrazvučnog tretmana enzima lipoksigenaze sa linolenskom masnom kiselinom kao supstratom, tretman najvećom snagom ne daje najveću koncentraciju hidroperoksida ni u slučaju primjene samo ultrazvučnog tretmana niti uz postupak miješenja od trideset minuta.



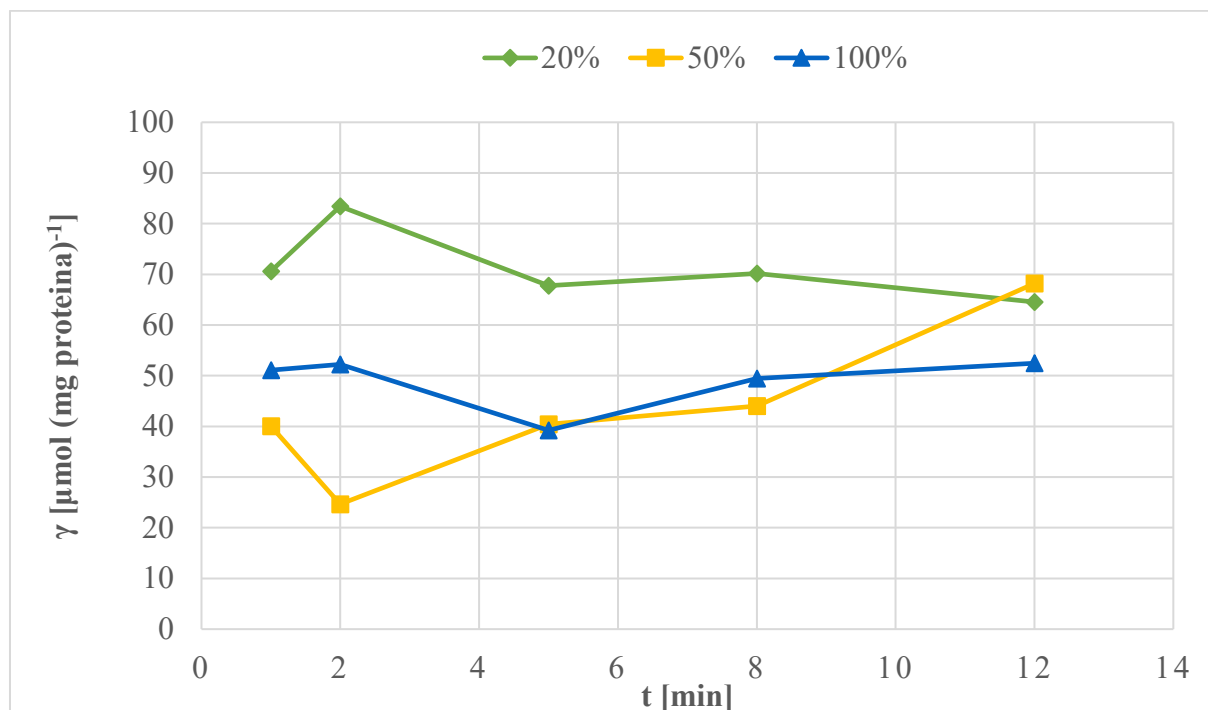
Slika 14. Ovisnost koncentracije hidroperoksida o vremenu ultrazvučnog tretmana pri tri različite snage ultrazvuka (20 %, 50 % i 100 %) kao pokazatelj aktivnosti enzima lipoksigenaze s linolenskom masnom kiselinom

U slučaju samo ultrazvučnog tretmana, tretman sa 20 % snage pokazuje najveću koncentraciju hidroksiperoksida $74,975 \mu\text{mol mg proteina}^{-1}$ i najveće rezultate kroz vrijeme. Tretman sa 50 % snage pokazuje usporedivi rezultat tek u dvanaestoj minuti tretmana gdje se razlikuje za 1 % koncentracije a u osmoj minuti je pokazivao 30 % slabiji rezultat. 100 % snage ultrazvučnog tretmana kroz najduži vremenski tretman pokazuje značajno manju koncentraciju hidroksiperoksida u iznosu od 25 % manje od najboljeg rezultata.

Uspoređujući koncentraciju nastalog hidroperoksida ultrazvučnim tretmanom kroz 12 minuta i 20 % snage sa koncentracijama hidroperoksida formiranih kroz 30 minuta gdje je postignut maksimum (slika 9) ili UTT postupkom pri $25 \text{ }^{\circ}\text{C} + 30$ minuta (slika 11), bolji rezultati se postižu sa ultrazvukom: 1,1 odnosno 1,7 puta više hidroperoksida nastane kada se koristi ultrazvučni tretman, a vremenski proces traje 18 minuta kraće.

Iz slika 14 i 15 je vidljivo da postupak miješenja ima utjecaj na formiranje hidroperoksida kod kraćeg vremena ultrazvučnog tretmana bez obzira na korištenu snagu tretmana. Kod kraćeg vremena ultrazvučnog tretmana, postupak miješenja od 30 minuta značajno povećava koncentraciju hidroperoksida, a što je vrijeme ultrazvučnog tretmana duže

utjecaj postupka miješenja sve je manji. Razlog tome vjerojatno se može pronaći u relativno visokim koncentracijama hidroperoksida već nakon samog tretmana od 8 i 12 minuta te već ranije spomenutoj nestabilnosti formiranih spojeva.



Slika 15. Ovisnost koncentracije hidroperoksida o vremenu ultrazvučnog tretmana pri tri različite snage ultrazvuka (20 %, 50 % i 100 %) zajedno s trideset minuta miješenja kao pokazatelj aktivnosti enzima lipoksigenaze s linolenskom masnom kiselinom

Od svih provedenih mjerenja u ovom diplomskom radu na enzimu LOX najveći rezultat je postignut na 2 minute tretmana pri 20 % snage kapaciteta uz 30 minuta miješenja te iznosi $83,42 \mu\text{mol mg proteina}^{-1}$ i taj rezultat zapravo odudara od ostalih mjerenja. Mogući razlozi zašto se čini da LOX favorizira blaže uvjete UZV su već raspravljani raspadi hidroperoksida. Aktiviranje enzima pri 20 % može se objasniti fizikalnim učinkom prijenosa mase i mikro-miješanja. Enzimske reakcije često su ograničene supstratom zbog strukturne konfiguracije. Ultrazvučni valovi pri različitim frekvencijama mogu nadvladati to ograničenje tako što izazivaju gibanje reakcijske smjese i povećanje prijenosa mase tako što omogućuje dostupnost supstrata enzimu i uklanjanje produkta s aktivnog mjesta. Taj prijenos mase na nižim frekvencijama postiže se kavitacijom (Sinisterra, 1992). Međutim, kavitacija može i inaktivirati enzim izazivanjem termičkih, kemijskih ili mehaničkih učinaka (Feng i sur., 2011).

Poznato je da LOX može katalizirati i reakcije sekundarnog tipa s linolenskom masnom kiselinom koje idu dalje od hidroperoksida prema kiselinama (Ngin i sur., 2021) pa je moguće

da ultrazvučni tretman pogoduje tim reakcijama koje će dovesti do sniženja pH vrijednosti, a već je navedeno da afinitet enzima prema supstratu ovisi i o pH.

Zaključno, β -glukozidaza postiže najveće koncentracije *p*-NG-a i samim time aktivnosti enzima što je duži vremenski interval, u šezdesetoj minuti 86,24 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$ i pri povišenoj temperaturi od 40 °C uz 30 minuta miješenja 84,51 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$. Kada se enzim tretira u ultrazvučnoj kupelji najveća aktivnost se pokazuje za 12 minuta tretmana na 100 % snage kapaciteta i iznosi 73,65 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$, a kada se tome doda i postupak miješenja najveća aktivnost pokazuje se na 50 % snage i iznosi 87,74 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$.

Kod lipoksigenaze najveće koncentracije hidroperoksida, a samim time i aktivnosti enzima postižu se u tridesetoj minuti miješenja i iznose 68,08 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$. UTT je pokazao kako je za enzim lipoksigenazu optimalna temperatura 25 °C uz miješenje 30 minuta i koncentracija za te parametre iznosi 43,89 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$. Kada se enzim lipoksigenaza tretira ultrazvučnim valovima najveća koncentracija hidroperoksida nastaje pri tretmanu od 12 minuta s 20 % snage kapaciteta i iznosi 74,98 $\mu\text{mol mg proteina}^{-1}$ što je 1,1 puta veća koncentracija za 18 minuta kraći postupak i 1,71 puta veća koncentracija pri temperaturi od 25 °C uz također skraćivanje vremena postupka za 18 minuta. Postupak miješenja nakon ultrazvučnog tretmana ima značajan utjecaj na povećanje koncentracije hidroperoksida kod kraćih tretmana. Dodatkom postupka miješenja nakon ultrazvučnog tretmana najveći rezultat je uočen za tretman od 2 minute na 20 % snage koji je 1,9 puta veće koncentracije od one toplinskog tretmana za isto vrijeme.

5. ZAKLJUČAK

1. Koncentracija *p*-nitrofenola, kao produkta β -glukozidaze, raste kroz 60 minuta reakcije na 25°C prateći logaritamsku funkciju, a s druge strane koncentracija hidroperoksida, produkata aktivnosti lipoksigenaze, raste u prvih 30 minuta nakon čega se njihova koncentracija smanjuje.
2. Enzimu β -glukozidazi odgovaraju uvjeti povišene temperature od 40 °C, dok lipoksigenazi za maksimalnu aktivnost odgovaraju temperature do 25 °C.
3. β -glukozidaza nakon tretmana ultrazvukom u vremenu od 12 minuta i 100 % kapaciteta snage od 640 W pokazuje 1,88 puta veću koncentraciju *p*-nitrofenola nego za 12 minuta samo miješenja pri 25 °C, a to je već 85,4 % koncentracije od 60 minuta miješenja. Dodatnim simuliranim procesom miješenja od 30 minuta postiže se koncentracija *p*-nitrofenola jednaka onoj nakon 60 minuta miješenja na 25 °C skraćujući vrijeme procesa za 18 minuta.
4. Nakon tretmana u ultrazvučnoj kupelji u vremenu od 2 minute i 20 % kapaciteta snage zajedno sa postupkom miješenja od 30 minuta na 25 °C, lipoksigenaza pokazuje 1,23 puta veću koncentraciju hidroperoksida nego samo postupak miješenja.
5. S obzirom na to da β -glukozidaza preferira više temperature, duže vrijeme i veće snage ultrazvuka, a lipoksigenaza upravo suprotno, potrebno je dobro optimirati tretmane koji prethode miješenju te samo miješenje kako bi se maksimizirala aktivnost oba enzima i u konačnici proizvelo DMU najviše kvalitete.

6. LITERATURA

Abdel-Shafy HI, Schories G, Mohamed-Mansour MS, Bordei V (2014) Integrated membranes for the recovery and concentration of antioxidant from olive mill wastewater. *Desalin Water Treat* **56**, 305–314. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.935807>

Aguilera MP, Beltrán G, Sánchez-Villasclaras S, Uceda M, Jiménez A (2010) Kneading olive paste from unripe 'Picual' fruits: I. Effect on oil process yield. *J. Food Eng* **97**, 533-53., <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.11.013>

Angerosa F. (2000) Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem* **68**, 283–287. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00189-2)

Angerosa F, Mostallino R, Basti C, Vito R (2001) Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chem* **72**, 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00194-1)

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

Angerosa F, D'Alessandro N, Corana F, Mellerio G (1996) Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **736**, 195-203. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01375-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01375-X)

Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ (1989) Accumulation of oleuropein derivatives during maturation. *Phytochem* **28**, 67–69. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)85009-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)85009-5)

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

Artajo LS, Romero MP, Motilva MJ (2006) Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation of ripening stage of the fruit. *J Sci Food Agric* **86**, 518–527. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2384>

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

Bejaoui MA, Sanchez-Ortiz A, Aguilera MP, Ruiz-Moreno MJ, Sanchez S, Jimenez 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>

Berg JM., Tymoczko JL, Stryer L (2013) Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, str. 205-240.

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Lercker G (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods An overview of the last decade. *Molecules* **12**, 1679-1719. <https://doi.org/10.3390/12081679>

Boskou D (2006) Olive oil, Chemistry and Technology, 2 izd., AOCS Press, Champaign.

Brnčić M (2006) Utjecaj ultrazvuka na svojstva sirovine za ekstruziju i gotovog ekstrudiranog proizvoda (Disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 39-40.

Canamasas P (2006) Use of coadjuvants in olive oil extraction. *Australian New Zealand Olivegrower Processor* **3-4**, 29-32.

Caponio F, Gomes T, Pasqualone A (2001) Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *Eur Food Res Technol* **212**, 329-333. <https://doi.org/10.1007/s002170000268>

Clodoveo ML (2012) Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future-an overview. *Trends Food Sci Technol* **25**, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.004>

Clodoveo ML, 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 Safety* **13**, 135-152. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12054>

Conde C, Delrot S, Gerós H (2008) Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J Plant Physiol* **165**, 1545-1562. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.018>

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)

Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **2**, 22-33.

Dujmić F (2015) Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih sastojaka iz taloga crnih vina (Disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 35-39.

El Riachy M, Priego-Capote F, León L, Rallo L, de Castro L, Dolores M (2011) Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *Eur J Lipid Sci Technol* **113**, 692-707. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100096>

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

Esti M, Cinquanta L, La Notte E (1998) Phenolic compounds in different olive varieties. *J Agric Food Chem* **46**, 32–35. <https://doi.org/10.1021/jf970391>

Feng H, Barbosa-Cánovas GV, Weiss J (2011) Ultrasound technologies for food and bioprocessing (Vol. 1) New York, Springer, str. 389., DOI 10.1007/978-1-4419-7472-3_14

Fregapane G, Salvador MD (2013) Production of superior quality extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor components *Food Res Int* **54**, 1907-1914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.022>

Glickman M, Klinman J (1995) Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction. *Biochem* **34**, 14077-14092, <https://doi.org/10.1021/bi00043a013>

Herceg Z, Brnčić M, Jambrak Režek A, Rimac Brnčić S, Badanjak M, Sokolić I (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo*, **59**, 65-69. <https://hrcak.srce.hr/34100>

Inarejos-García AM, Fregapane G, Desamparados Salvador M (2011) Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *Eur Food Res Technol* **232**, 441-451. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1406-4>

Inarejos-García AM, Gómez-Rico A, Desamparados Salvador M, Fregapane G (2009) Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition. *Eur Food Res Technol* **228**, 671-677. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0977-9>

Jayasooriya SD, Bhandari BR, Torley P, D'arcy BR (2004) Effect of high power ultrasound waves on properties of meat. *Int J Food Prop* **7**, 301-319. <https://doi.org/10.1081/JFP-120030039>

Kailis S, Harris D (2007) Producing table olives, Landlinks Press, Collingwood, str. 37-45.

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

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

Kiritsakis AK (1998) Olive oil handbook, AOCS, Champaign, Illinois.

Koprivnjak O (2006) Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola, MIH, Poreč

Krešić G, Lelas V, Režek Jambrak A, Herceg Z (2011) Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kemija u industriji* **60**, 11-19. <https://hrcak.srce.hr/63133>

Leighton TG (2007) What is ultrasound?. *Prog Biophys Mol Biol* **93**, 3-83. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.026>

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

Majetić Germek V (2014) Promjene sastava hlapljivih i fenolnih tvari u procesu proizvodnje djevičanskih maslinovih ulja sorti Buža, Istarska bjelica i Leccino (Disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 3-5

Mason TJ, Paniwnyk L, Lorimer JP (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochem* **3**, 253. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00034-X)

Ngin P, Cho K, Han O (2021) Immobilization of Soybean Lipoxygenase on Nanoporous Rice Husk Silica by Adsorption: Retention of Enzyme Function and Catalytic Potential, *Molecules*, **26**, 291. <https://doi.org/10.3390/molecules26020291>

Perrin JL (1992) Minor components and natural antioxidants in olives and olive oil. *Revue Francaise Des Corps Grass* **39**, 25–32.

Presnec T (2017) Kemijski sastav lješnjaka (Diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 10

Ranalli A, Contento S, Schiavone C, Simone N (2001) Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* **103**, 228–238. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200104\)103:4<228::AID-EJLT228>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200104)103:4<228::AID-EJLT228>3.0.CO;2-7)

Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Iannucci E, Lucera L (2003) Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* **105**, 57-67. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390018>

Režek Jambrak A, Herceg Z, Šubarić, D, Babić J, Brnčić M, Rimac Brnčić S i sur. (2010) Ultrasound effect on physical properties of corn starch, *Carbohydr Polym* **79**, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.051>

Ročak T (2005) Osnovne kemijske analize kakvoće istarskih maslinovih ulja (Diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Rodis PS, Karathanos VJ, Mantzavinou A (2002) Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J Agric Food Chem* **50**, 596-601. <https://doi.org/10.1021/jf010864j>

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

Salas JJ, Sánchez J, Ramli US, Manaf AM, Williams M, Harwood JL (2000) Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Prog Lipid Res* **39**, 151-180.

Salas JJ, Harwood JL, Martinez-Force E (2013) Lipid Metabolism in Olive: Biosynthesis of Triacylglycerols and Aroma Components. U: Aparicio R, Harwood J (ured.) Handbook of Olive oil, Springer, Boston, str. 97-127. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_4.

Sánchez-Ortiz A, Bejaoui MA, Quintero-Flores A, Jiménez A, Beltrán G (2018) Biosynthesis of volatile compounds by hydroperoxide lyase enzymatic activity during virgin olive oil extraction process. *Food Res Int* **111**, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.024>

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

Servili M, Taticchi A, Esposito S, Sordini B, Urbani S (2012) Technological Aspects of Olive Oil Production, U: Muzzalupo I (ured.) Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy, InTech, Rijeka, str. 151-172.

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

Sinisterra JV (1992) Application of ultrasound to biotechnology – An overview. *Ultrasonics* **30**, 180–185. [https://doi.org/10.1016/0041-624X\(92\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0041-624X(92)90070-3)

Stefanouadaki E, Koutsaftakis A, Harwood JL (2011) Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil. *Food Chem* **127**, 1481-1486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.120>

Škevin D (2016) Interna skripta iz Procesa prerade i maslina i kontrola kvalitete proizvoda, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Taticchi A, Selvaggini R, Esposito 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>

Terefe NS, Sheean P, Fernando S, Versteeg C (2013) The stability of almond β -glucosidase during combined high pressure–thermal processing: a kinetic study. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 2917-2928. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4162-5>

Tsimidou MZ, Mastralexi A, Ozdikicierler O (2020) Cold Pressed Virgin Olive Oils. U: Ramadan MF (ured.) Cold Pressed Oils Green Technology, Bioactive Compounds, Functionality, and Applications, Academic Press, London, str. 547–573.

Uceda M, Jiménez A, Beltrán G (2006) Olive oil extraction and quality. *Grasas Aceites* **57**, 25-31

Ucella N (2001) Olive biophenols: Biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends Food Sci Technol* **11**, 315-327.
[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00029-2)

Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize (1991) *Službeni list europske unije* **248**, Strasbourg.

Vick BA (1993) Oxygenated Fatty Acids of the Lipoxygenase Pathway, U: Moore TS (ured.) Lipid metabolism in Plants, CRC Press, Boca Raton, str. 67–191.

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

Yahyaoui A, Ghayth R, Mnif S, Ben Salem R, 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>

Žanetić M (2009) Utjecaj polifenolnih spojeva na svojstva i oksidacijsku stabilnost djevičanskih maslinovih ulja odabranih autohtonih sorta (Disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Handwritten signature of Kristian Pavlić in blue ink.

Vlastoručni potpis