

# Primjena celulaze u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz lista masline

---

Limari, Lora

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:806512>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Lora Limari**  
0058217461

**PRIMJENA CELULAZA U EKSTRAKCIJI**  
**BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA MASLINE**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:**  
*Biotehnologija 3*

**Mentor:** prof. dr. sc. Tonči Rezić

**Zagreb, 2023.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo i Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tončija Rezića te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Maje Dent.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva  
i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Primjena celulaze u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz lista masline

Lora Limari, 0058217461

**Sažetak:** Enzimski potpomognute ekstrakcije su metode koje se temelje na korištenju enzima koji hidroliziraju staničnu stijenku biljaka, kako bi se povećala efikasnost ekstrakcijskog predtretmana te se smanjila količina organskog otapala koje se koristi tijekom ekstrakcije. U ovom radu određivana je aktivnosti enzima celulaze, ksilanaze i pektinaze. Određivanje je provedeno prema Kracherovoj metodi. To je kolorimetrijska metoda u kojoj DNSA uz prisutnost reducirajućih šećera prelazi u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu, te se karbonilna skupina šećera reducira u karboksilnu skupinu. U usporedbi s rezultatima određivanja aktivnosti celulaze u otopinama supstrata celuloze i lista masline, možemo zaključiti da je aktivnost veća ako je supstrat čist. Također na prinos ekstrakcije utječu i temperatura, pH, vrijeme ekstrakcije, količina enzima i vrsta enzima. Korištenjem enzima celulaze značajno se povećao prinos ekstrakcije fenola iz lista masline.

**Ključne riječi:** celulaze, enzimska aktivnost, enzimski potpomognuta ekstrakcija

**Rad sadrži:** 29 stranica, 6 slika, 10 tablica, 28 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Tonči Rezić

**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Maja Dent

**Datum obrane:** 14.7.2023

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Undergraduate thesis**

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

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Application of cellulase in the extraction of bioactive compounds from olive leaves**

**Lora Limari, 0058217461**

**Abstract:** Enzyme-assisted extractions are methods based on the use of enzymes that hydrolyze plant cell walls, in order to increase the efficiency of the extraction pretreatment and reduce the amount of organic solvent used during extraction. In this thesis, cellulase, xylanase and pectinase enzyme activity was determined. The determination was carried out according to Kracher's method. It is a colorimetric method in which, in the presence of reducing sugars, DNSA turns into 3-amino-5-nitrosalicylic acid, and the carbonyl group of the sugar is reduced to a carboxyl group. In comparison with the results of the determination of cellulase activity in cellulose and olive leaf substrate solutions, we can conclude that the activity is higher if the substrate is clean. Although, extraction yield is also affected by temperature, pH, extraction time, amount of enzyme and type of enzyme. Utilization of cellulase enzyme significantly increased the yield of phenols extraction from olive leaves.

**Keywords:** cellulase, enzyme activity, enzyme-assisted extraction

**Thesis contains:** 29 pages, 7 figures, 10 tables, 28 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Tonči Rezić, PhD, Full Professor

**Technical support and assistance:** Maja Dent, PhD, Associate Professor

**Thesis defended:** July 14, 2023

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Metode ekstrakcije .....	2
2.1.1. Konvencionalne metode ekstrakcije .....	3
2.1.2. Nekonvencionalne metode ekstrakcije .....	4
2.2. Enzimi .....	6
2.2.1. Celulaza.....	6
2.2.2. Ksilanaza.....	7
2.2.3. Pektinaze .....	8
2.3. Teorijska osnova mjerenja enzima DNSA metodom.....	10
2.4. Enzimski potpomognuta ekstrakcija polifenola .....	11
2.4.1. Čimbenici koji utječu na kvalitetu ekstrakcije.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Reagensi.....	13
3.1.2. Supstrati i enzimi .....	13
3.1.3. Aparatura i pribor.....	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Priprema otopina.....	15
3.2.2. Postupak određivanja enzimске aktivnosti prema Kracher metodi .....	15
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola iz lista masline.....	17
4. REZULTATI.....	18
4.1. Mjerenje enzimskih aktivnosti ksilanaze, celulaze i pektinaze.....	18
4.1.1. Ksilanaza.....	18
4.1.2. Celulaza.....	20
4.1.3. Pektinaza .....	21
4.2. Određivanje aktivnosti celulaze tijekom ekstrakcije fenola iz lista masline.....	23
5. RASPRAVA.....	24
6. ZAKLJUČCI .....	26
7. LITERATURA .....	27

# 1. UVOD

Enzimi imaju široku primjenu u industriji u obradi biljnog materijala, najčešće služe za hidrolizu dijelova biljnih stanica. Sve češće se koriste u metodama za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz stanice, samostalno ili u kombinaciji sa nekom drugom fizikalnom metodom. Kako je stanična stijenka biljaka građena od kompleksnih polisaharida kao što su celuloza, ksilan i pektin, za njenu degradaciju se upotrebljavaju kemijske metode, fizikalne metode ili se koriste enzimi. Kako bi se smanjila potrošnja organskih otapala i riješio problem zbrinjavanja istog, te smanjila potrošnja energije koriste se enzimi kao dobra alternativa fizikalno-kemijskim metodama obrade biljnog materijala.

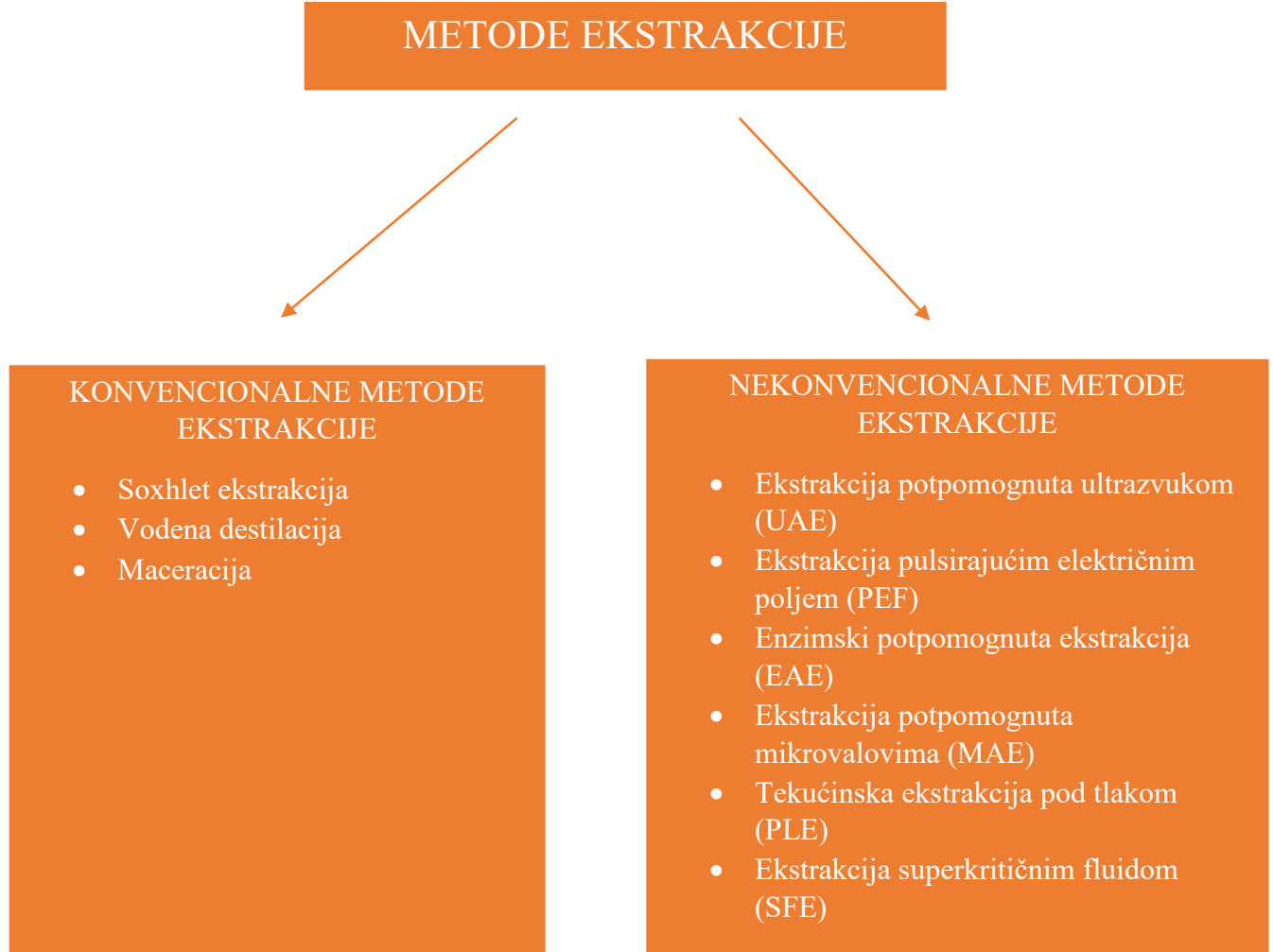
Komercijalno dostupne enzime proizvode sojevi: *Aspergillus*, *Bacillus* i *Trichoderma*. Za kontrolu kvalitete enzima koriste se metode mjerenja aktivnosti. Temelje se na mjerenju količine produkta nastalog hidrolizom specifičnog supstrata za određeni enzim. Neke metode za mjerenje aktivnosti funkcioniraju na principu mjerenja pada viskoznosti u ovisnosti o padu polimerizacije supstrata zbog njegove hidrolize. Također postoje metode kojima se mjeri porast količine reducirajućih skupina u otopini pomoću oksidirajućeg reagensa, pri čemu dolazi do promjene boje. Intenzitet promjene boje mjeri se na spektrofotometru i ukazuje na aktivnost enzima (Miller, 1959).

Uglavnom se koriste metode mjerenja reducirajućih ekvivalenata. Metoda koja se najčešće koristi i koja je korištena u ovom radu je metoda mjerenja aktivnosti korištenjem 3,5-dinitrosalicilne kiseline (König i sur., 2002).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala je prvi korak u izolaciji i pročišćavanju bioaktivnih spojeva (Jha i Sit, 2022.). Efikasnost ekstrakcije ovisi o topivosti bioaktivnog spoja u odnosu na otapalo kojim se ekstrahira i ostalim spojevima koji se nalaze u sklopu biljne stanice. Učinkovitost ekstrakcije ovisi o parametrima kao što su: temperatura, priroda otapala i njegova pH vrijednost, omjer otapala i spoja koji želimo ekstrahirati, te vremenu trajanja ekstrakcije (Puri i sur., 2012.). Metode ekstrakcije mogu se podijeliti na konvencionalne (klasične) i nekonvencionalne (suvremene) metode (Slika 1).



**Slika 1.** Podjela metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva (Azmir i sur., 2013.)



### 2.1.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Konvencionalne metode ekstrakcije se temelje na sposobnosti otapala, da uz miješanje i/ili zagrijavanje ekstrahira određenu tvar iz uzorka.

Soxhlet ekstrakcija je jedna od najčešće korištenih metoda ekstrakcije. Metoda uključuje konstantnu cirkulaciju istog otapala u ekstraktoru, što omogućava korištenje manje količine otapala te povećanje ekonomičnosti metode. Najčešće se koristi za ekstrakcije kruto-tekuće, kod uzoraka kao što su osušeni i usitnjeni dijelovi biljaka. Metoda se primarno koristila za ekstrakciju lipida i masti, ali danas nije ograničena na samo tu vrstu spojeva (Azmir i sur.,2013).

Maceracija se koristi za ekstrakciju kruto-tekuće. Jednostavan je način za ekstrakciju eteričnih ulja, bioaktivnih spojeva i aroma. Biljni uzorak se prije provođenja ekstrakcije mora usitniti, mljevenjem ili drobljenjem. Usitnjavanjem uzorka se povećava kontaktna površina s otapalom. Odgovarajuće otapalo, se stavlja u zatvorenu posudu i miješa s uzorkom kako bi se povećala brzina difuzije. Nakon toga, tekućina se ocijedi te se ostala komina preša (Azmir i sur. 2013).

Vodena destilacija je metoda kod koje se ne koriste organska otapala, te se može koristiti prije sušenja, odnosno dehidracije uzorka. Vodena destilacija može biti: vodena, destilacija direktnom parom i vodeno-parna destilacija (Azmir i sur. 2013; prema Vankar, 2004). Uzorak se pomiješa s vodom koja se zagrijava, te se u sustav može uvesti i para koja djeluje kao pokretač ekstrakcije bioaktivnog spoja iz uzorka. Spoj iz uzorka s vodenom parom isparava te dolazi na hladilo gdje se kondenzira. Kondenzat se zatim odvaja od vode na separatoru. Mana ovog postupka je smanjena mogućnost pri ekstrakciji termolabilnih spojeva (Azmir i sur., 2013; prema Silva i sur., 2005).

### 2.1.2. Nekonvencionalne metode ekstrakcije

Zbog problema kao što su: ubrzavanje procesa ekstrakcije, povećanje ekonomičnosti i iskorištenja, želje za smanjenjem organskih otapala zbog njihove cijene i problema odlaganja, te nemogućnosti ekstrakcije termolabilnih spojeva javila se potreba za unaprjeđenjem metoda ekstrakcije.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je metoda koja se koristi za ekstrakciju aroma, polifenola, karotenoida te polisaharida iz biljnih stanica. Navedena metoda ne zahtjeva dovođenje topline, ali je potrebna regulacija frekvencije, snage, vremena, temperature, vrste otapala i omjera otapalo-kruta tvar (Kumar i sur.,2021; prema Vilku i sur., 2008). Ultrazvučna ekstrakcija funkcionira na principu akustične kavitacije. Zvučni valovi visokog intenziteta (>20kHz) prolazeći kroz fluid stvaraju ekspanziju i kompresiju, pri čemu nastaju kavitacije. Kavitacijski mjehurići svojom implzijom, oslobađaju veliku količinu energije te uzrokuju fragmentaciju stanične stijenke (Kumar i sur., 2021; prema Aijla i sur. 2011).

Tehnologija pulsirajućeg električnog polja se koristi za ekstrakciju bioaktivnih spojeva te očuvanje hrane s većom električnom vodljivošću. Ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem se temelji na principu da električni impulsi povećavaju permeabilnost stanične membrane, na način da stvaraju ireverzibilne pore (Naliyadhara i sur., 2022; prema Wang i sur.,2018). Metoda koristi umjeren do visok intenzitet impulsa: 20-80 kV/cm za kontinuiranu ekstrakciju i 100-300V/cm za diskontinuiranu ekstrakciju. Efikasnost metode ovisi o frekvenciji, širini, trajanju, broju impulsa te jačini električnog polja. Osim parametara vezanih uz uređaj, također ovisi i o omjeru otapala i krute tvari, vrsti uzorka, veličini komponente koja se ekstrahira (Ranjha i sur.,2021).

Enzimski potpomognute ekstrakcije su metode koje se razvijaju zbog potrebe za pronalaskom „zelene“ alternative organskim otapalima. Korištenjem enzima koji hidroliziraju staničnu stijenku biljaka, povećava se efikasnost ekstrakcijskog predtretmana te se smanjuje količina organskog otapala koji se koristi tijekom ekstrakcije. Dokazano je da enzimski potpomognute ekstrakcije povećavaju prinos ekstrakcije polisaharida, lipida, prirodnih pigmenata i ostalih bioaktivnih spojeva (Puri i sur., 2021).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima se temelji na principu zagrijavanja materijala mikrovalovima. Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi, frekvencije od 300 MHz do 300 GHz. Materijal izložen mikrovalovima pretvara dio apsorbiranog elektromagnetskog

zračenja u toplinu. Zagrijavanje se događa lokalizirano bez gubitka topline u okoliš. Kao uzorak se ne koristi osušeni biljni materijal, već hidratiziran, odnosno biljne stanice koje sadržavaju vodu. Voda izložena mikrovalovima se zagrijava, pretvara u paru i stvara tlak na unutrašnjost stanične stijenke, što kasnije dovodi do njenog pucanja (Mandal i sur., 2007; prema Wang i sur., 2006).

Tekućinska ekstrakcija pod tlakom je vrsta tekućinske ekstrakcije koja se provodi pri povišenim temperaturama i tlaku. Pri promjeni uvjeta ekstrakcije dolazi do promjene fizikalno kemijskih svojstava otapala. Dolazi do povećanja prijenosa mase i topivosti željenog analita, te se pritom smanjuje viskoznost i površinska napetost otapala. Kao posljedica dolazi do lakšeg prodiranja otapala u stanicu te iskorištenje ekstrakcije raste (Alvarez-Rivera i sur., 2020).

Ekstrakcija superkritičnim fluidom je vrsta ekstrakcije kod koje se kao otapalo koristi fluid u svojim kritičnim uvjetima. Najčešće korišten fluid je ugljikov dioksid. Njegova kritična točka se nalazi pri temperaturi od 31°C i tlaku od 74bar. Njegova prednost je u tome što je: jeftin, ne zapaljiv, nije toksičan te je inertan. Prednosti u korištenju superkritičnih fluida u odnosu na organska otapala je ta što na kraju procesa ne zaostaje višak otapala. Na kraju procesa se smanjivanjem tlaka odvajaju analit i superkritični fluid, te fluid slobodno isparava u atmosferu (Sapkale i sur., 2010).

## 2.2. Enzimi

### 2.2.1. Celulaza

Celulaze su skupine enzima koje hidroliziraju celulozu, odnosno  $\beta$  1,4-glikozidne veze u celulozi. Kao produkti hidrolize nastaju jednostavniji šećeri ili jedinice glukoze. U industriji se koriste celulaze koje sintetiziraju bakterije ili kvasci, one su znatno otpornije od celulaza biljnog ili animalnog porijekla (Ohmiya i sur., 1997).

#### 2.2.1.1. Struktura celulaze

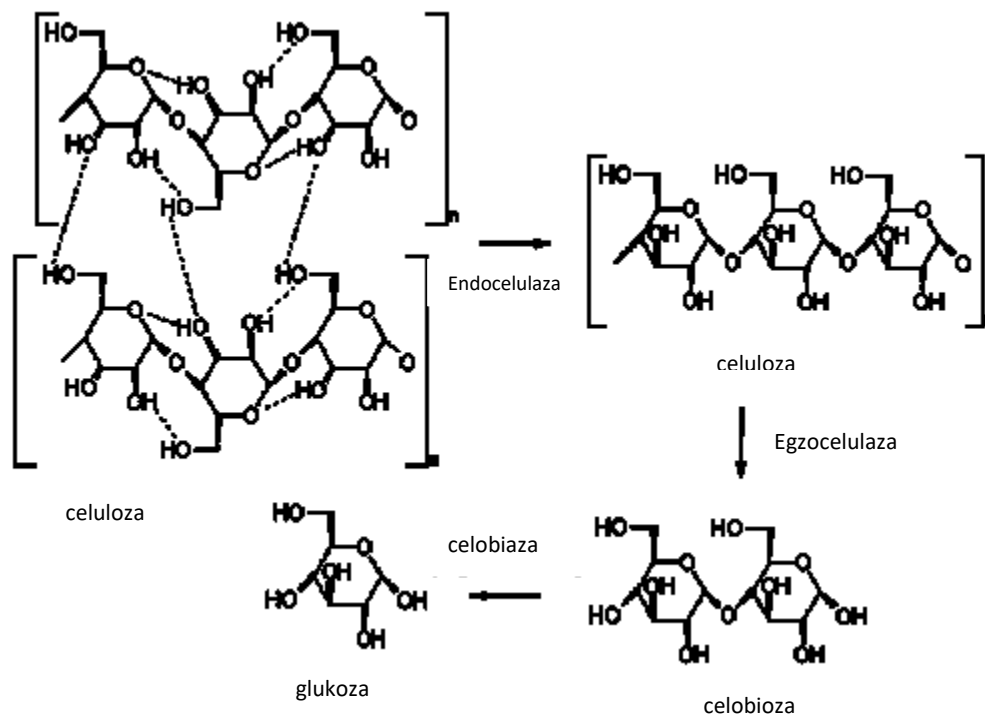
Celulaze bakterijskog ili fungalnog porijekla se najčešće sastoje od dvije ili više funkcijskih ili strukturalnih domena. Sastoji se od katalitičkih i nekatalitičkih domena. Katalitičke domene su klasificirane u nekoliko razreda, ovisno o strukturi i rasporedu aminokiselina. Nekatalitičke domene, domene koje vežu ugljikovodike se nalaze na C ili N terminalnim krajevima katalitičke domene. Uz navedene dvije vrste domena enzim se može sastojati od domena kao što su: S-sloj homologna domena (S-layer homologous domain). Često su povezane prolinskim, treoninskim i serinskim vezivnim sekvencama.

Postoje dva tipa celulaza, ovisno o organizmu koji ih proizvodi. Aerobni mikroorganizmi proizvode jednostavne celulaze, čije su katalitičke domene povezane s domenom koja se veže na celulozu (cellulose-binding domain, CBD). Anaerobni mikroorganizmi proizvode kompleksne celulazne sustave koji se nazivaju „celulosimi“, a nalaze se na površini bakterijskih stanica i povezani su s nekatalitičkom domenom (Jayasekara i Ratnayake, 2019).

#### 2.2.1.2. Funkcija celulaze

Celulaza hidrolizira  $\beta$ -1,4-glikozidne veze između molekula glukoze u celulozi. Tri vrste enzima hidroliziraju celulozu:  $\beta$ -glukozidaza, endo- $\beta$ -1,4-D-glukanaza (endoglukanaza) i egzo-1,4- $\beta$ -D-glukanaza (egzoglukanaza) (Patel i sur., 2019). Potpuna hidroliza celuloze se postiže djelovanjem sva tri enzima. Endoglukanaza je aktivna na amorfnim dijelovima glukoze. Djeluje na unutarnjim vezama oligosaharida stvarajući nove krajeve lanaca, na koje se kasnije lakše vežu ostali enzimi. Najveću aktivnost enzim pokazuje kod topivih dijelova celuloze ili amorfne celuloze tretirane kiselinom. Egzoglukanaza hidrolizira ne reducirajuće krajeve celuloze kristalne strukture, te kao produkte formira glukoze ili celobioze.  $\beta$ -glukozidaza hidrolizira ne reducirajuće krajeve celobioze u glukoze (Slika 2).

Celulaza cijepa glukozidne veze koristeći kiselinsko-baznu katalizu. Hidrolizu provode dvije katalitičke skupine na enzimu proton donor i nukleofil. Katalitički mehanizam koji enzim koristi ovisi o prostornom položaju katalitičkog ostatka, odnosno supstrata (Ohmiya i sur., 1997).



**Slika 2.** Mehanizam djelovanja celulaze (Bacovsky, 2010).

### 2.2.2. Ksilanaza

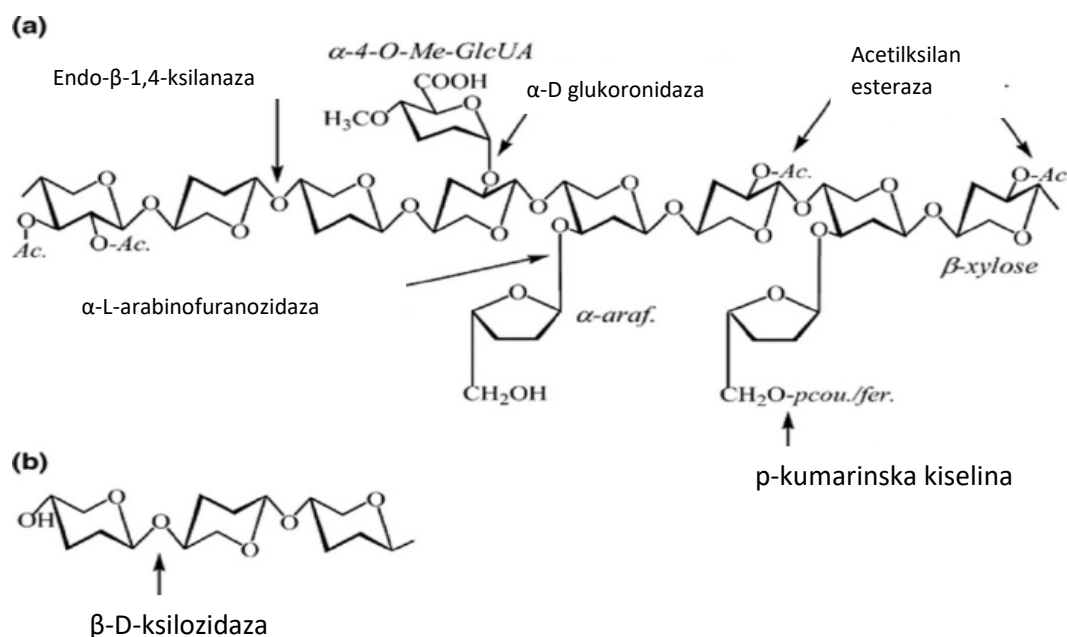
Ksilanaze su skupine enzima koje hidroliziraju ksilan. Ksilan je razgranati heteropolisaharid, struktura i stupanj polimerizacije ovisi o biljnoj vrsti. Glavni lanac u ksilanu je analogan onome u celulozi. Molekule D-ksilana su povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama, također se u njemu nalazi i L-arabinoza u tragovima, te glukaronska kiselina, acetil, p-kumarinska kiselina, arabinoza kao supstituenti (Bajpai,2014).

#### 2.2.2.1. Struktura i funkcija ksilanaze

Ksilanaze su skupine od nekoliko enzima koje hidroliziraju ksilozu, polimer koji se nalazi u hemicelulozi. Enzimi koji služe za depolimerizaciju ksiloze su:  $\beta$ -ksilozidaza (ksilan-1,4- $\beta$ -

ksiloksidaza), endo-ksilanaza (endo-1,4- $\beta$ -ksilanaza),  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaza,  $\alpha$ -D-glukuronidaza, acetiksilan-esteraza, esteraza feurlinske kiseline i esteraza p-kumarinske kiseline.

Dva ključna enzima za hidrolizu ksilana su endo-ksilanaza i  $\beta$ -ksilozidaza. Endo-ksilanaza nasumično cijepa  $\beta$ -1,4-glikozidne veze u ksilozi, kao produkti nastaju manji oligosaharidi ksilana.  $\beta$ -ksilozidaza cijepa nastale ksilo-oligosaharide, hidrolizira sa ne reducirajućeg kraja, te nastaju monomeri ksilana (Slika 3). Ostali enzimi služe za odvajanje radikala sa ksiloze (Bajpai,2014).



**Slika 3.** (a)Struktura ksilana i mjesta na koje se veže ksilanaza. (b)Hidroliza ksilo-oligosaharida  $\beta$ -ksilozidazom (Sunna i Antranikian, 1997)

### 2.2.3. Pektinaze

Pektin je polisaharid sastavljen od galakturonske kiseline i metanola kao glavnih komponenti (Haile i Ayele,2022; prema Shet i sur., 2018). U sastavu radikala glavnog lanca pektina nalaze se drugi šećeri kao što su: D-glukoza, D-manoza, D-kisloza, D-fukoza i D-galaktouronska kiselina (Nighjokar i sur.,2019). Pektin je smatran jednim od najkompleksnijih heteropolisaharida stanične stijenke biljaka.

#### 2.2.3.1. Propektinaza

Propektinaza je enzim koji hidrolizira, netopivi dio pektina. Najviše se nalazi u nezrelim plodovima biljaka. Propektinaza prevodi netopivi pektin u visoko polimerizirani, topivi pektin (Haile i Ayele, 2022; prema Hassana i Ali, 2016.) .

#### 2.2.3.2. Pektin metilesteraza

Metoksi esterska skupina je jedna od glavnih skupina strukture pektina. Pektin metilesteraza cijepa navedenu skupinu te kao produkti reakcije nastaju pektinska kiselina i metanol. Enzim de-esterificira metil estersku vezu na  $\alpha$ -1,4-D galaktouronozilnoj podjedinici uz dodatak vode (Rebello i sur., 2017.).

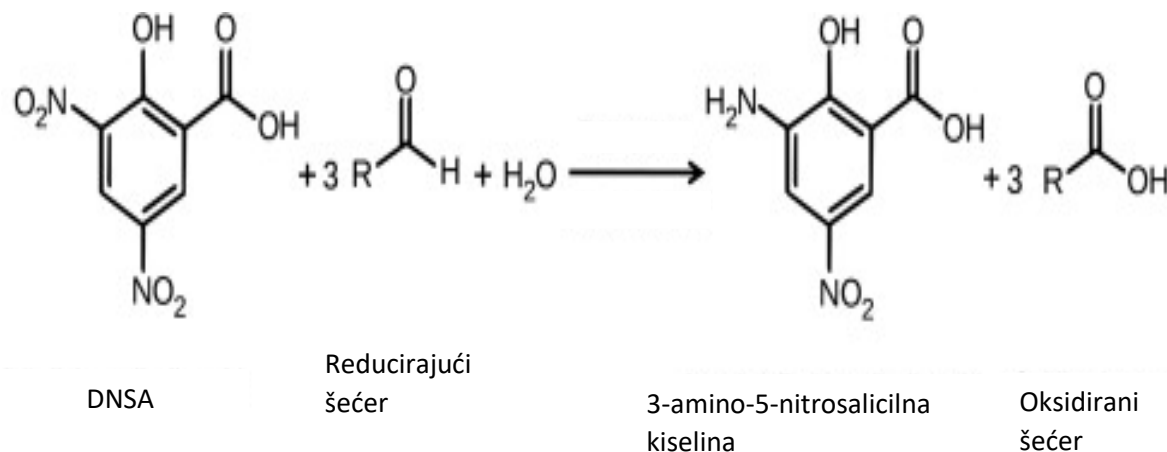
#### 2.2.3.3. Poligalaktouronaza

Poligalaktouronaza sudjeluje u depolimerizaciji pektina. Katalizira hidrolitičko cijepanje poligalakturonskog lanca (Rebello i sur.,2017, prema Kant i sur.,2013). Cijepa  $\alpha$ -1,4-glikozidnu vezu između monomera galaktouronske kiseline. Poligalaktouronaze su podijeljene u dvije skupine: endo- i egzo- poligalaktouronaze. Endopoligalaktouronaze hidroliziraju poligalaktouronsku kiselinu, a kao rezultat nastaju jedinice oligogalakturonske kiseline. Egzopoligalaktouronaza hidrolizira pektinsku kiselinu, te se oslobađaju jedinice monogalaktouronata (Haile i Ayele, 2022; prema Patidar i sur., 2016.).

### 2.3. Teorijska osnova mjerenja aktivnosti enzima DNSA metodom

Navedena metoda se koristi za određivanje aktivnosti celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima u sirovim ekstraktima ili djelomično pročišćenim uzorcima.

U prisutnosti reducirajućih šećera 3,5-dinitrosalicilna kiselina prelazi u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu te se karbonilna skupina šećera reducira u karboksilnu, pri čemu dolazi do promjene obojenja reakcijske smjese iz žute u crveno-smeđu boju (Slika 4).



**Slika 4.** Prikaz redukcije 3,5-dinitrosalicilne kiseline u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu (Thongprajukaew i sur.,2014)

Moguće je odrediti aktivnost različitih celulolitičkih enzima kvantifikacijom produkta nastalih hidrolizom odgovarajućeg supstrata (Tablica 1).

**Tablica 1.** Kvantifikacija različitih enzima korištenjem DNSA (Karcher,2010)

Ime enzima	Supstrat	Produkt
Endo-ksilanaza	Ksilan	D-ksiloza
Egzo-ksilanaza	Ksilan	D-ksiloza
Endo-manaza	Manan	D-manoza
Egzo-manaza	Manan	D-manoza
Endo-arabinaza	Arabinan	L-arabinoza
Egzo-arabinaza	Arabinan	L-arabinoza
Galaktomanaza	Galaktomanan	D-galaktoza
Endo-glukanaza	Celuloza	D-glukoza
Egzo-glukanaza	Karboksimetil celuloza	D-glukoza
Pektinaza	Pektin	Galaktouronska kiselina



## 2.4. Enzimski potpomognuta ekstrakcija polifenola

Fenolni spojevi zbog svojeg antioksidativnog, protuupalnog i antitumorskog djelovanja pozitivno utječu na zdravlje. Polifenoli se nalaze u topivom obliku kao flavonidi, te u netopivom obliku kao fenolne kiseline. Fenolne kiseline su kovalentno vezane za komponente stanične stijenke biljaka kao što su: lignin, celuloza, hemiceluloza i pektina (Gligor i sur., 2019; prema Azmir i sur., 2013).

Klasične ekstrakcijske metode imaju nedostatke kao što su: predugo vrijeme trajanja ekstrakcije, otapalo visoke čistoće te niska selektivnost ekstrakcije, zbog kojih se javila potreba za razvojem novih metoda. Enzimski potpomognuta ekstrakcija nudi prednosti u odnosu na klasične metode kao što su: niže temperature provođenja reakcije, brže provođenje ekstrakcije, mogućnost ekstrakcije spojeva koji se nalaze u teže dostupnim dijelovima stanice kao što su vakuole te smanjenje cijene ekstrakcije (Gligor i sur., 2019).

### 2.4.1. Čimbenici koji utječu na kvalitetu ekstrakcije

#### 2.4.1.1. Vrsta enzima

Vrsta enzima te količina različitih enzima kojih se koriste kao predtretman ekstrakciji utječu na prinos ekstrakcije ovisno o vrsti biljke iz koje se ekstrahira bioaktivni spoj. Prema rezultatima iz rada Nagendra i suradnika u kojem je proučavana enzimaska ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz đumbira, zaključeno je da je najviši prinos ekstrakcije polifenola postignut korištenjem celulaze kao predtretman ekstrakciji etanolom u odnosu na predtretman pektinazom, proteazom ili  $\alpha$ -amilazom (Nagendra i sur., 2013). Chen i suradnici su zaključili da celulaza proizvedena od *Penicillium decumbens* bolje razgrađuje staničnu stijenku stanica lista ginka u odnosu na pektinazu koju je proizveo soj *Aspergillus niger* (Chen i sur., 2011). Naime prinos najviše ovisi o specifičnosti enzima za supstrat, odnosno o strukturi i sastavu uzorka.

#### 2.4.1.2. Utjecaj smjese enzima

Kako bi se degradirao što veći dio stanične stijenke često se koriste smjese hidrolitičkih enzima. Efikasnost smjese ovisi o udjelu pojedinih enzima te sastavu smjese. Hosni i suradnici su zaključili da korištenje smjese hemicelulaze i celulaze pri ekstrakciji ulja iz timijana, omogućava celulazama lakše djelovanje, jer hemicelulaza degradira hemicelulozu odnosno uklanja „fizičku barijeru“ do

celuloze. Dok kod ekstrakcije ulja iz ružmarina mješavina enzima nije poboljšala prinos ekstrakcije u odnosu na ekstrakciju potpomognutu samo jednim enzimom. Količina i vrsta enzima u smjesi ovisi o sastavu biljnog uzorka (Hosni i sur.,2013)

#### 2.4.1.3. Utjecaj vremena ekstrakcije i koncentracije enzima

Vrijeme trajanja ekstrakcije i koncentracija enzima su usko povezani, na način da se vrijeme ekstrakcije može skratiti ako se poveća koncentracija enzima. Vrijeme ekstrakcije je jedan od ključnih faktora koji utječu na prinos; dulje trajanje ekstrakcije može prouzročiti degradaciju bioaktivnih komponenata zbog duljeg izlaganja visokoj temperaturi ili zbog moguće oksidacije (Muniglia i sur., 2014). Lotfi i suradnici su u svom radu proučavali utjecaj koncentracije enzima i vremena na prinos ekstrakcije antocijanina iz latica šafrana (*Crocus sativus L.*). Koristili su vodenu otopinu smjese enzima koncentracije iznad 5% i ekstrakciju provodili 3 sata pri čemu je došlo do negativnih rezultata ekstrakcije. Odnosno pri većoj koncentraciji enzima došlo je do oslobađanja proteina iz uzorka koji su uništili stanice pigmenta (Lotfi i sur., 2015).

#### 2.4.1.4. Utjecaj temperature ekstrakcije

Temperatura ekstrakcije je još jedan parametar koji utječe na aktivnost enzima i topivost bioaktivnog spoja. Enzimska aktivnost se povećava povišenjem temperature, viskoznost ekstrakcijskog medija smanjuje te se povećava topivost bioaktivnog spoja. No pretjerano povećanje temperature može negativno utjecati na trodimenzionalnu strukturu enzima i rezultirati smanjenjem njegove aktivnosti te degradirati bioaktivni spoj. Farinas i suradnici su u svom radu proučavali utjecaj temperature na celulozitičke enzima, iz čega je zaključeno da se optimalan temperaturni interval nalazi između 35°C i 60 °C, te je najveća brzina reakcije izmjerena pri 55° (Farinas i sur.,2010).

#### 2.4.1.5. Utjecaj pH na ekstrakciju

pH je bitan parametar ekstrakcije zbog njegovog utjecaja na efikasnost djelovanja enzima i strukturu staničnog zida. Pri kiselim uvjetima ekstrakcije, dolazi do destabilizacije vodikovih veza što rezultira povećavanju „plastičnosti“ staničnog zida, te dolazi do modifikacije konfiguracije proteina, odnosno utjecaja na katalitičku aktivnost enzima, te zato ekstrakciji pogoduju blago kiseli uvjeti. Wang i suradnici su proučavajući utjecaj pH na aktivnost celulaze i pektinaze došli do zaključka da je optimalan pH između 5 i 6,5, te da se daljnjim povećavanjem smanjuje aktivnost (Wang i sur., 2011).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Reagensi

Određivanje aktivnosti enzima:

- Destilirana voda
- Pročišćena destilirana voda
- K-Na-tartarat tetrahidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- natrijev sulfit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- natrijev hidroksid (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- fenol
- limunska kiselina monohidrat (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Određivanje ukupnih fenola :

- Folin-Cicolteau reagens
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna otopina)
- Standard galne kiseline

##### 3.1.2. Supstrati i enzimi

- Celulaza iz *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Søborg, Danska)
- Ksilanaza (Sigma-Aldrich, Søborg, Danska)
- Pektinaza (Sigma-Aldrich, Søborg, Danska)
- Celuloza (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Ksilan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Pektin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

### 3.1.3. Aparatura i pribor

- Tresilica s grijačem (Thermo-Shaker TS-100) (Biosan, Riga, Latvija)
- analitička vaga (GR-200-EC, A&D Instruments Ltd., Tokyo, Japan)
- automatske pipete volumena 2 – 1000  $\mu$ L (KemoLab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga (Z 216 MK, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL i 500 mL
- graduirane pipete volumena 10 ml
- kapaljka
- kivete
- laboratorijska metalna žlica
- laboratorijska špatula
- laboratorijske boce volumena 500 mL
- menzura volumena 100 mL
- odmjerne tikvice volumena 10 mL, 25 mL, 50 mL i 100 mL
- pH-metar (LAB 860, SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka)
- plastične epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf)
- propipete
- spektrofotometar (Lambda 1, Perkin-Elmer, Waltham, SAD)
- staklene laboratorijske čaše volumena 250 mL
- stakleni lijevak
- stakleni štapići
- tehnička vaga (MK-500C, Chyo, Kyoto, Japan)
- vorteks tresilica (VTX, Labo Moderne, Pariz, Francuska)
- magnetna miješalica (MS-H-S, DLAB Scientific, Peking, Kina)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema otopina

#### 3.2.1.1. Otopina K-Na-tartarata

Odvaže se 4g K-Na-tartarat monohidrat u odmjernu tikvicu od 10 mL, te se tikvica napuni do oznake. Dobivena je 40%tna otopina.

#### 3.2.1.2. Otopina DNSA

Otopina je pripremljena prema Kracher i sur., 2014.

Odvaže se 10g DNSA, 0,5g natrijevog sulfita, 10g natrijevog hidroksida i 2mL fenola. Krute tvari se u međuvremenu otope u destiliranoj vodi. Sve otopine se pomiješaju, te se doda ostatak vode do 1L. Otopina se dobro promiješa, te prebacuje u zatamnjenu posudu i čuva se na 4°C.

#### 3.2.1.3. Otopina enzima

U čistu laboratorijsku čašu volumena 50mL izvaže se 11mg enzima i otopi u 50mL pročišćene vode ili citratnog pufera kako bi se dobila otopina enzima masene koncentracije 0,22 mg mL<sup>-1</sup>. Zatim su se iz pripremljenih otopina enzima masene koncentracije 0,22 mg mL<sup>-1</sup> otpipetirali alikvoti od 100μL te prebacili u odmjerne tikvice od 100mL koje su nadopunjene odgovarajućim otopinama. Dobivena su razrjeđenja 1:1000 u odnosu na početne koncentracije.

#### 3.2.1.4. Slijepe probe

Napravljene su tri različite slijepe probe za svaki enzim. Slijepe probe bez otopine ispitivanog enzima, slijepe probe bez supstrata i slijepe probe bez otopine DNSA. Otopine enzima i DNSA su nadomještene destiliranom vodom u odgovarajućem volumenu.

Slijeпа probа bez ispitivanog enzima se sastojala od: otopine DNSA, supstrata, pročišćene vode i tartarata. Slijeпа probа bez DNSA se sastojala od: vodene otopine enzima, supstrata, pročišćene vode i tartarata. Slijeпа probа bez supstrata ima sve otopine osim krutog supstrata.

### 3.2.2. Postupak određivanja enzimske aktivnosti prema Kracher metodi

Aktivnosti enzima su bile određivane prema protokolu za određivanje hemicelulazne i celulazne aktivnosti pomoću DNSA (Kracher i sur., 2014.). U odgovarajuće Eppendorf epruvete se pomiješa oko 7mg supstrata i 1mL otopine enzima, te se stave na inkubaciju u miješalicu s grijačem na 50°C u trajanju od 2h. Nakon inkubacije uzorci se centrifugiraju 5 min na 1000rpm. Poslije centrifugiranja izdvaja se 600μL supernatanta u nove Eppendorf epruvete, te se dodaje 600μL

otopine DNSA. Epruvete se ponovo inkubiraju 15min na 95°C. Nakon inkubacije u epruvete se dodaje 200µL otopine K-Na-tartarata i zatim se epruvete hlade u hladnjaku 5-10 min. Kada se uzorci ohlade mjeri im se apsorbancija na spektrofotometru na valnoj duljini od 575nm .

#### 3.2.2.1. Princip metode

Metoda određivanja aktivnosti enzima je provedena prema Kracherovoj metodi iz 2014. pod nazivom: „Određivanje celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom“. Metoda je primjenjiva za mjerenje aktivnosti iz sirovih ekstrakta i pročišćenih preparata.

DNSA uz prisutnost reducirajućih šećera prelazi u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu, te se karbonilna skupina šećera reducira u karboksilnu skupinu. U reakcijskoj otopini dolazi do promjene boje iz žute u smeđu i promjene apsorpcijskog maksimuma na 575nm. Intenzitet boje ovisi o količini šećera.

Od očitanih apsorbancija na spektrofotometru pri 575nm se oduzmu apsorbancije slijepe probe. Dobivena razlika uvrsti se u formulu baždarnog pravca enzima te se dobivena vrijednost pomnoži s faktorom konverzije za određeni enzim. Baždarni dijagrami su uzeti iz prethodno navedene literature. Nakon izračuna oslobođene količine šećera, enzimska aktivnost izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$\text{Enzimska aktivnost}(U mL^{-1}) = \frac{\text{Oslobođeni šećer } (\mu mol)}{\text{Vrijeme inkubacije}(min) * 1mL} * \text{faktor razrjeđenja}$$

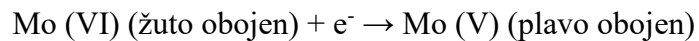
Faktori konverzije:

- glukoza 1mg=5,5506µmol
- ksiloza 1mg=6,6609µmol
- galaktouronska kiselina 1mg=5,1509µmol

### 3.2.3. Određivanje ukupnih fenola iz lista masline

Ukupni fenoli su određivani kolorimetrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom. U reakciji fenola sa reagensom koji se sastoji od fosfomolibdata i fosfovoframata, nastaje plavo obojenje čiji se intenzitet mjeri pri 765nm. Pri oksidaciji fenola u blago alkalnim uvjetima fosfovolframova i fosfomolibdena kiselina reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid (Jakopić, 2009).

Reakcija:



Postupak provođenja reakcije:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom: 125 $\mu$ L uzorka (prethodno razrijeđenog, 5 puta), 625 $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 10mL deionizirane vode. Nakon 3 min doda se 1,9mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortex tresilice, a potom se uzorci termostatiraju 25min na temperaturi od 50°C u vodenoj kupelji. Zatim se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765nm. Te se na isti način priprema slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (voda ili pufer).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Mjerenje enzimskih aktivnosti ksilanaze, celulaze i pektinaze

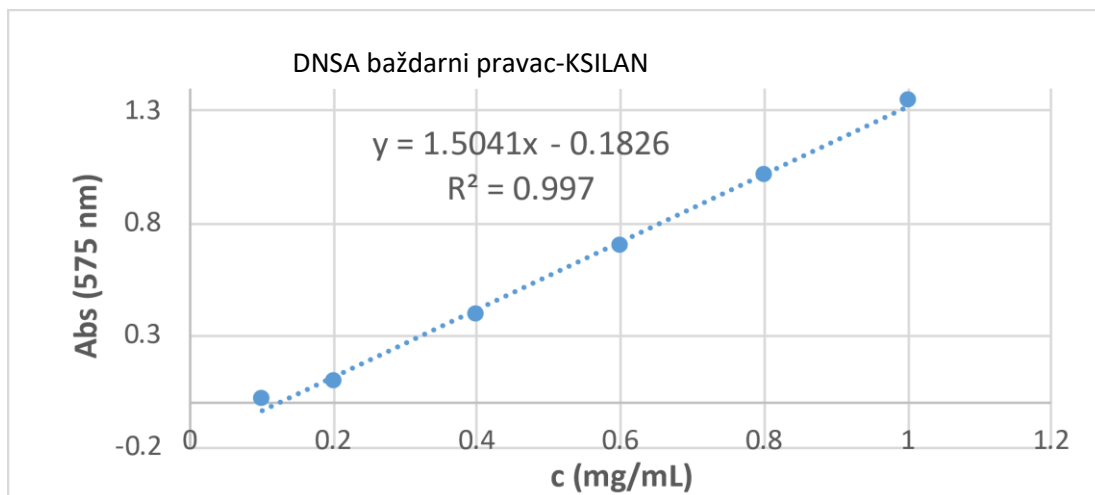
Promatrana je enzimska aktivnost hidrolitičkih enzima: ksilanaze, celulaze i pektinaze u ovisnosti o mediju u kojem su otopljeni, citratni pufer pH 5 i pročišćena voda pri 50°C. Uz pomoć očitanih apsorbancija na spektrofotometru i baždarnih dijagrama ovisnosti apsorbancije o koncentraciji šećera, dobivena je koncentracija oslobođenog šećera tijekom reakcije koja odgovara aktivnosti enzima. Aktivnost enzima je definirana kao količina enzima koja je potrebna za oslobađanje 1 μmol odgovarajućeg šećera u 1 min u odgovarajućim uvjetima.

Zadatak:

Odrediti enzimsku aktivnost: ksilanaze, celulaze i pektinaze, u pročišćenoj vodi i citratnom puferu pH 5

#### 4.1.1. Ksilanaza

Na slici 5 prikazan je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ksiloze nastale tijekom enzimске hidrolize ksilana. Tablice 2 i 3 prikazuju rezultate mjerenja aktivnosti ksilanaze u destiliranoj vodi i citratnom puferu pH 5.



**Slika 5.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ksiloze nastale enzimskom hidrolizom ksilana.



**Tablica 2.** Rezultati dobiveni mjerenjem aktivnosti 0,22mg ksilanaze u 1mL destilirane vode

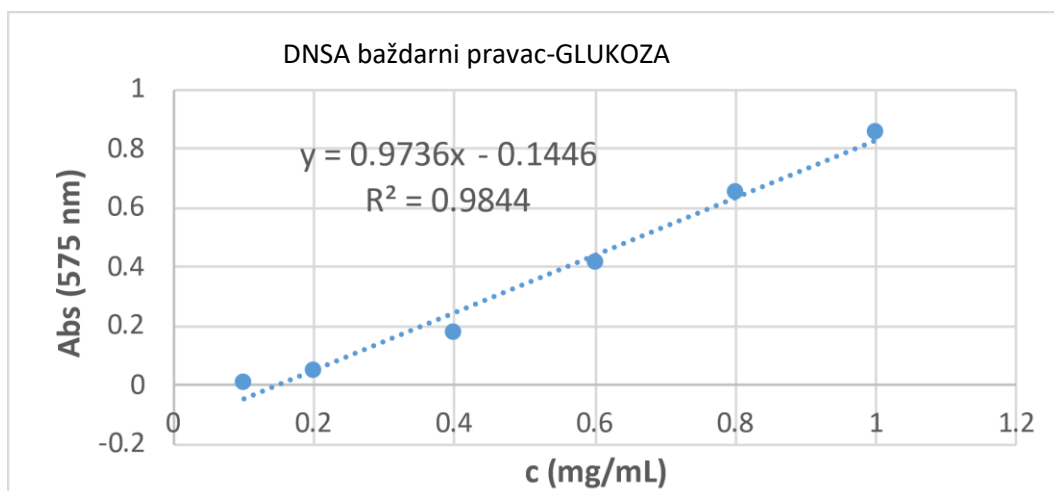
<b>UZORAK</b>	<b>Abs (575nm)</b>	<b>Abs(reakcijske smjese)- Abs(slijepih proba)</b>	<b>Koncentracija ksiloze (mg/mL)</b>	<b>Količina ksiloze (μmol)</b>	<b>Aktivnost ksilanaze (U/mL)</b>
Slijepa proba bez DNSA	0,088	0,119	0,2009	1,3380	22,3006
Slijepa proba bez supstrata	0,016				
Slijepa proba bez enzima	0,192				
Enzim-voda	0,415				

**Tablica 3.** Rezultati dobiveni mjerenjem aktivnosti 0,22mg ksilanaze u 1mL pufera pH=5

<b>UZORAK</b>	<b>Abs (575nm)</b>	<b>Abs(reakcijske smjese)- Abs(slijepih proba)</b>	<b>Koncentracija ksiloze (mg/mL)</b>	<b>Količina ksiloze (μmol)</b>	<b>Aktivnost ksilanaze (U/mL)</b>
Slijepa proba bez DNSA	0,088	0,273	0,3035	2,02125	13,4750
Slijepa proba bez supstrata	0,016				
Slijepa proba bez enzima	0,192				
Enzim-pufer	0,569				

#### 4.1.2. Celulaza

Na slici 6 prikazan je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji glukoze nastale tijekom enzimske hidrolize celuloze. Tablice 4 i 5 prikazuju rezultate mjerenja aktivnosti celulaze u destiliranoj vodi i citratnom puferu pH 5.



**Slika 6.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji glukoze nastale enzimskom hidrolizom celuloze

**Tablica 4.** Rezultati dobiveni mjerenjem aktivnosti celuloze u 1mL destilirane vode

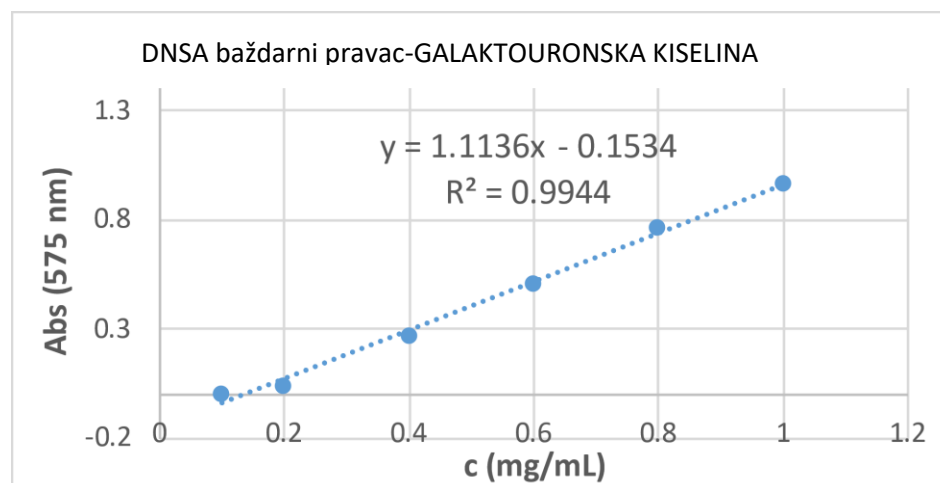
UZORAK	Abs (575nm)	Abs(reakcijske smjese)- Abs(slijepih proba)	Koncentracija glukoze (mg/mL)	Količina glukoze (μmol)	Aktivnost celulaze (U/mL)
Slijepa proba bez DNSA	0,018	0,011	0,1372	0,7617	12,6945
Slijepa proba bez supstrata	0,014				
Slijepa proba bez enzima	0,028				
Enzim-voda	0,049				

**Tablica 5.** Rezultati dobiveni mjerenjem aktivnosti 0,22mg celuloze u 1mL pufera pH=5

UZORAK	Abs (575nm)	Abs(reakcijske smjese)- Abs(slijepih proba)	Koncentracija glukoze (mg/mL)	Količina glukoze (μmol)	Aktivnost celulaze (U/mL)
Slijepa proba bez DNSA	0,018	0,122	0,2738	1,5199	25,3319
Slijepa proba bez supstrata	0,014				
Slijepa proba bez enzima	0,028				
Enzim-pufer	0,182				

#### 4.1.3. Pektinaza

Na slici 7 prikazan je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galaktouronske kiseline nastale tijekom enzimske hidrolize pektina. Tablice 6 i 7 prikazuju rezultate mjerenja aktivnosti pektinaza u destiliranoj vodi i citratnom puferu pH 5. U tablici 8 prikazani su zbirni rezultati mjerenja aktivnosti ksilanaza, celulaza i pektinaza.



**Slika 7.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galaktouronske kiseline nastale enzimskom hidrolizom pektina

**Tablica 6.** Rezultati dobiveni mjerenjem aktivnosti 0,22mg pektinaze u 1mL destilirane vode

<b>UZORAK</b>	<b>Abs (575nm)</b>	<b>Abs(reakcijske smjese)- Abs(slijepih proba)</b>	<b>Koncentracija galaktouronske kiseline (mg/mL)</b>	<b>Količina galaktouronske kiseline (μmol)</b>	<b>Aktivnost pektinaze (U/mL)</b>
Slijepa proba bez DNSA	0,09	0,500	0,5867	3,0223	50,3711
Slijepa proba bez supstrata	0,021				
Slijepa proba bez enzima	1,009				
Enzim-voda	1,62				

**Tablica 7.** Rezultati dobiveni mjerenjem aktivnosti 0,22mg pektinaze u 1mL destilirane vode

<b>UZORAK</b>	<b>Abs (575nm)</b>	<b>Abs(reakcijske smjese)- Abs(slijepih proba)</b>	<b>Koncentracija galaktouronske kiseline (mg/mL)</b>	<b>Količina galaktouronske kiseline (μmol)</b>	<b>Aktivnost pektinaze (U/mL)</b>
Slijepa proba bez DNSA	0,09	0,385	0,4834	2,4912	41,5000
Slijepa proba bez supstrata	0,021				
Slijepa proba bez enzima	1,009				
Enzim-pufer	1,505				

**Tablica 8.** Prikaz ukupnih rezultata mjerenja aktivnosti ksilanaza, celulaza i pektinaza u destiliranoj vodi i citratnom puferu.

<b>ENZIM</b>	<b>Aktivnost 0,22 mg enzima u 1mL destilirane vode (U/mL)</b>	<b>Aktivnost 0,22 mg enzima u 1mL pufera pH=5 (U/mL)</b>
Ksilanaza	22,3006	13,4750
Celulaza	12,6945	25,3319
Pektinaza	50,3711	41,5231

#### 4.2. Određivanje aktivnosti celulaze tijekom ekstrakcije fenola iz lista masline

Zadatak: Odrediti enzimске aktivnosti celulaze tijekom ekstrakcije fenola iz lista masline

Hidrolitička aktivnost celulaze je određivana prema kolorimetrijskoj metodi s DNSA. Rezultati određivanja aktivnosti celulaze na mljevenom listu masline (*Olea europea L.*) u puferu pH=5 i destiliranoj vodi DNSA metodom prikazani su u tablici 8. Rezultati određivanja ukupnih fenola ekstrahiranih iz lista masline s i bez dodatka celulaze prikazani su u tablici 9.

**Tablica 9.** Rezultati određivanja aktivnosti celulaze na mljevenom listu masline (*Olea europea L.*) u puferu pH=5 i destiliranoj vodi DNSA metodom (Buha, 2023)

Otapalo	Koncentracija enzima (U/mg)	Masa nastale glukoze (mg)	Količina nastale glukoze (μmol)	Enzimska aktivnost (U/mL)
voda	10	0,5042	0,3132	5,1299
pufer		0,6753	0,3748	6,2474
voda	50	0,8977	0,4981	8,3025
pufer		1,5972	0,8865	14,7763

**Tablica 10.** Rezultati određivanja ukupnih fenola iz lista masline

otapalo	Masa celulaze (mg)	Apsorbancija (765nm)	Koncentracija galne kiseline (mg/mL)	W(ukupni fenoli) (mgGAE/100g)
destilirana voda	voda	0,111	112,00	696,725
	25	0,175	176,00	1096,655
pufer pH=5	pufer	0,116	117,00	730,738
	25	0,192	193,00	1205,880

## 5. RASPRAVA

Korištenje DNSA metode omogućuje kvantifikaciju oslobođenih reducirajućih šećera te određivanje aktivnosti hidrolitičkih enzima. Kao supstrati korišteni su celuloza, ksilan i pektin te je mjerenjem apsorbancije pri 575nm i 765nm i korištenjem baždarnih dijagrama (slike 5,6 i 7) određena koncentracija ksiloze, glukoze i galaktouronske kiseline u demineraliziranoj vodi pH 7 (tablice 2,4,6), odnosno u citratnom puferu pH 5 (tablice 3,5 i 7). Metoda je izvođena uz pretpostavku da je aktivnost enzima veća pri odgovarajućoj temperaturi i pH vrijednosti. Rezultati mjerenja aktivnosti u vodenoj otopini i puferu na čistom supstratu se ne poklapaju s pretpostavkom za ksilanazu i pektinazu. Naime, aktivnosti ksilanaze i pektinaze u puferu pH=5 su manje u odnosu na aktivnosti u destiliranoj vodi (tablica 8). Prema tome zaključujemo da je došlo do pogreške u samoj pripremi otopina ili provođenju mjerenja. Također na aktivnost enzima značajan utjecaj ima i prisutnost teških metala (Aponte i sur.,2020). Optimalan temperaturni interval za celulolitičke enzime među kojim je i ksilanaza je od 35°C do 60°C, a pH interval se nalazi između 4 i 5,5. Na aktivnost pH ima veći utjecaj od temperature. Te vrijednosti pri kojima je aktivnost najveća su: temperatura u iznosu od 55°C i pH 4,5 (Farinas i sur., 2010).

U usporedbi s rezultatima određivanja aktivnosti celulaze u otopinama supstrata celuloze i lista masline, možemo zaključiti da je aktivnost veća ako je supstrat čist (tablice 4, 5 i 9). Odnosno ostale komponente lista masline utječu na aktivnost celulaze u hidrolizi celuloze do glukoze. Utjecaj čvrste komponente može biti i posljedica vezanja dijela enzima na čvrstu komponentu (Tian i Shi, 2014). Također aktivnost celulaze veća je u puferu odnosno povećava se povećanjem aktivnosti enzima s 10 U/mg na 50 U/mg (tablica 9).

Korištenje enzima za degradaciju komponenata stanične stijenke prije odabrane metode ekstrakcije povećava se iskorištenje ekstrakcije (Tablica 10). Iz rezultata određivanja ukupnih fenola iz lista masline vidljivo je da maseni udio celulaze od 1% u otopini za provođenje ekstrakcije znatno povećava njeno iskorištenje, u odnos na ekstrakcije provedene u otapalima bez enzima. Slične rezultate su postigli Hosin i sur. (2013) koji su provodili ekstrakciju po Clevengeru iz timijana i ružmarina, u čije su reakcijske smjese prethodno dodani celulaza i/ili hemicelulaza. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da su ekstrakcije provedene uz prethodni enzimski pred tretman imale veći prinos. Kod ekstrakcije eteričnih ulja iz timijana, najveći prinos je dobiven kod korištenja smjese hemicelulaze i celulaze. A kod ekstrakcije eteričnih ulja iz ružmarina najveći

prinos je uočen pri korištenju same hemicelulaze. Također se pokazalo da korištenje enzima kao pred tretman prilikom ekstrakcije bioaktivnih spojeva nema utjecaj na kvalitetu ekstrakta, već na količinu određenih spojeva u ekstraktu (Hosin i sur., 2013; Boulila i sur., 2015).

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Korištena metoda je prikladna za određivanje aktivnosti celulaze, ksilanaze i pektinaze na temelju količine oslobođenih šećera određenih pomoću DNSA.
2. Kompleksni supstrati imaju negativan utjecaj na aktivnost celulaze.
3. Korištenjem celulaze značajno se povećala efikasnost ekstrakcije fenola iz lista masline.



## 7. LITERATURA

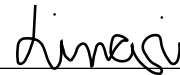
1. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. (2002), Determination of xylanase,  $\beta$ -glucanase, and cellulase activity, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **374**, str.80–87 <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1379-7>
2. Miller (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, **31(3)**, str. 426–428, <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
3. Jha A.K, Sit N. (2022), Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review, *Trends in Food Science & Technology*, **119**, 579-591 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.019>
4. Puri M., Sharma D., J.Barrow C. (2012), Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants, *Trends in Biotechnology*, **30(1)**, str.37-44 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>
5. Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. (2013), Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, **117(4)**, str.426-436, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
6. Kumar K., Srivastav S., Singh Sharanagat V. (2021), Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, **70**, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
7. Naliyadhara N., Kumar A., Girisa S., Devi Daimary U., Hedge M., Kunnumakkara A. B. (2022), Pulsed electric field (PEF): Avant-garde extraction escalation technology in food industry, *Trends in Food Science & Technology*, **122**, str.283-255, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.019>
8. Ranjha A. N. M. M., Kanwal R., Shafique B., Arshad N. R., Irfan S., Kielszek M., Kowalczewski L.P., Irfan M., Zubair Khalid M., Roobab U., Aadil R. M. (2021), A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents, *Molecules*, **26(16)**, <https://doi.org/10.3390/molecules26164893>

9. Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. (2007), Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacognosy Reviews*, **1(1)**
10. Alvarez-Rivera G., Bueno M., Ballesteros-Vivas D., Mendiola J.A., Ibanez E. (2020), Chapter 13 - Pressurized Liquid Extraction, *Liquid-Phase Extraction*, str.375-398, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>
11. Sapkale G.N., Patil S.M., Surwase U.S., Bhatbhage P.K. (2010), *Int. J. Chem. Sci.*: **8(2)**, str.729-743
12. Nagendra chari K.L., Manasa D., Srinivas P., Sobhagya H.B. (2013), Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *Food Chemistry*, **139**, str.509-514, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.099>
13. Chen S., Xing, Huang, Xu (2011), Enzyme-assisted extraction of flavonoids from Ginkgo biloba leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase, *Enzyme and Microbial Technology*, **48(1)**, str.100-105, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.017>
14. Muniglia, L., Claisse, N., Baudelet, P., & Ricochon, G. (2014). Enzymatic aqueous extraction, *Alternative solvents for natural products extraction*, **1** <https://doi.org/10.1007/978-3-662-43628-8>
15. Gligor O., Mocan A., Moldovan C., Locatelli M., Crisan G., Ferreira (2019), Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review, *Trends in Food Science & Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.029>
16. Lotfi, L., Kalbasi-ashtari, A., & Hamed, M. (2015). Effects of enzymatic extraction on anthocyanins yield of saffron tepals (*Crocus sativus*) along with its color properties and structural stability. *Journal of Food and Drug Analysis*, **23(2)**, str.210–218. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.011>.
17. Jayasekara S. i Ratnayake R. (2019), Microbial Cellulase: An Overview and Application , *Cellulose*, IntechOpen, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, str.83-105
18. Patel P.S., Desai R.G. (2019), Study of Cellulase by Isolated Fungal Culture from Natural Resources and Application in Bio-ethanol Production, *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)*, **7(3)**, ISSN:2321-9653

19. Ohmiya K., Sakka K., Karita S., Kimura T. (1997), Structure of Cellulases and Their Applications, (članak) *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, <http://dx.doi.org/10.1080/02648725.1997.10647949>
20. Bajpai P. (2014), Microbial Xylanolytic Systems and Their Properties (knjiga) *Xylanolytic Enzymes*, str.19-36, <https://doi.org/10.1016/C2013-0-18577-7>
21. Haile S. i Ayele A. (2022), Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications, *The Scientific World Journal*, <https://doi.org/10.1155/2022/1881305>
22. Rebello S., Anju M., Mathachan Aneesh E., Sindhu R., Binod P., Pandey A. (2017), Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **16**, str.381-394, DOI 10.1007/s11157-017-9437-y
23. Hosni K., Hassen I., Caabane H., Jemli M., Dallalia S., Sebei H., Casabianca H. (2013) Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, **47**, str.291-299 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.023>
24. Farinas C.S., Moitas Loyo M., Baraldo Junior A., Tardioli P.W., Bertucci Neto V., Couri S. (2010) Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature, *New Biotechnology*, **27(6)**, str.810-815 <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.001>
25. Vujović T. (2020), Utjecaj enzimski potpomognute ekstrakcije na udio eteričnog ulja kadulje i lovora (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
26. Tian L. i Shi W. (2014), Short-term effects of plant litter on the dynamics, amount, and stoichiometry of soil enzyme activity in agroecosystems, *European Journal of Soil Biology*, **65**, str.23-29, <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.08.004>
27. Aponte H., Meli P., Butler B., Paolini J., Matz F., Merino C., Cornejo P., Kuzyakov Y. (2020), Meta-analysis of heavy metal effects on soil enzyme activities, *Science of the Total Environment*, **737**, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139744>
28. Buha J. (2023), Enzimatska ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz lista masline, (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

## Izjava o izvornosti

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



\_\_\_\_\_  
Vlastoručni potpis