

# Utjecaj indeksa zrelosti na aktivnost endogenih enzima hrvatskih autohtonih sorti maslina

---

**Butula, Nika**

**Master's thesis / Diplomski 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:159:792074>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2023.

Nika Butula

UTJECAJ INDEKSA ZRELOSTI NA  
AKTIVNOST ENDOGENIH ENZIMA  
HRVATSKIH AUTOHTONIH SORTI  
MASLINA

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



Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom “Utjecaj inovativnih tehnologija na nutritivnu vrijednost, senzorska svojstva i oksidacijski stabilnost djevičanskih maslinovih ulja iz hrvatskih autohtonih sorti maslina“ (HRZZ CROInEVOO, IP-2020-02- 7553).

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr sc. Klari Kraljić na prenesenom znanju, strpljenju i susretljivosti te na savjetima koji su omogućili izradu ovog rada.*

# 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 INDEKSA ZRELOSTI NA AKTIVNOST ENDOGENIH ENZIMA HRVATSKIH AUTOHTONIH SORTI MASLINA

Nika Butula, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058213574

### Sažetak:

Endogeni enzimi u plodovima maslina i biokemijske transformacije koje oni kataliziraju definiraju nutritivnu vrijednost i senzorske karakteristike djevičanskog maslinovog ulja. U ovom radu je njihova aktivnost ispitivana u plodovima hrvatskih autohtonih sorti, oblici, levantinki, istarskoj bjelici i rosulji u tri stupnja zrelosti. Cilj ovog rada je bio definirati utjecaj indeksa zrelosti i sorte na aktivnost endogenih enzima.  $\beta$ -glukozidaza, polifenol oksidaza i peroksidaza su izolirani iz acetonskih prahova a aktivnost im je određena spektrofotometrijski, dok je lipoksigenaza izolirana iz smrznutog tijesta, a aktivnost određena HPLC metodom. Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze nije detektirana zbog čega nije bilo moguće utvrditi utjecaj istraživanih parametara na njezinu aktivnost. Aktivnost peroksidaze u svim je sortama izrazito niska i raste s povećanjem indeksa zrelosti. Aktivnosti polifenol oksidaze i lipoksigenaze pokazala se kao sortna karakteristika jer su trendovi aktivnosti tih enzima različiti u svim sortama.

**Ključne riječi:** aktivnost endogenih enzima, hrvatske autohtone sorte maslina, indeks zrelosti

**Rad sadrži:** 51 stranica, 8 slika, 9 tablica, 84 literaturnih navoda

**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

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

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

**Datum obrane:** 31. ožujka 2023.

## 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

### THE EFFECT OF MATURITY INDEX ON THE ACTIVITY OF ENDOGENOUS ENZYMES OF CROATIAN AUTOCHTHONOUS OLIVE VARIETIES

Nika Butula, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058213574

#### **Abstract:**

The endogenous enzymes in olive fruit and the transformations they catalyze determine the nutritional value and sensory properties of virgin olive oil. In this study, their activity was investigated in fruits of Croatian autochthonous olive varieties Oblica, Levantinka, Istrian Bjelica and Rosulja at three stages of ripening. The aim of this study was to determine the influence of the maturity index and variety on the activity of endogenous olive enzymes.  $\beta$ -glucosidase, polyphenol oxidase and peroxidase were isolated from acetone powders and their activity was determined spectrophotometrically, while lipoxygenase was isolated from frozen olive paste, and its activity was determined by HPLC method. The activity of  $\beta$ -glucosidase was not detected, therefore it was not possible to determine the effect of the investigated parameters on its activity. Peroxidase activity was low in all samples studied and increased with increasing maturity index. The activity of polyphenol oxidase and lipoxygenase proved to be a varietal characteristic of olives, since the trends of the activity of these enzymes were different among the studied varieties.

**Keywords:** activity of endogenous enzymes, Croatian autochthonous olive varieties, maturity index

**Thesis contains:** 51 pages, 8 figures, 9 tables, 84 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Katarina Filipan, MSc

#### **Reviewers:**

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

**Thesis defended:** March 31<sup>st</sup>, 2023



## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>2.1. HRVATSKE AUTOHTONE SORTE</b> .....  | <b>2</b>  |
| 2.1.1. Dalmatinske sorte.....   | 2         |
| 2.1.2. Istarske sorte.....  | 3         |
| <b>2.2. INTRODUCIRANE SORTE U HRVATSKOJ</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>2.3. ENDOGENI ENZIMI PLODA MASLINE</b> .....   | <b>4</b>  |
| 2.3.1. Lipaze.....  | 4         |
| 2.3.2. Pektinaze .....  | 5         |
| 2.3.3. $\beta$ -glukozidaza .....   | 5         |
| 2.3.4. Polifenol oksidaza .....   | 6         |
| 2.3.5. Peroksidaza .....  | 6         |
| 2.3.6. Lipoksigenaza .....  | 7         |
| <b>2.4. FAKTORI KOJI UTJEČU NA AKTIVNOST ENDOGENIH ENZIMA PLODA MASLINE</b> .....         | <b>8</b>  |
| 2.4.1. Utjecaj sorte masline .....  | 8         |
| 2.4.2. Utjecaj stupanj zrelosti ploda masline.....  | 10        |
| 2.4.3. Skladištenje plodova .....   | 12        |
| 2.4.4. Prerada ploda masline .....  | 13        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>3.1. MATERIJALI</b> .....  | <b>15</b> |
| 3.1.1. Popis kemikalija.....  | 15        |
| <b>3.2. METODE</b> .....  | <b>17</b> |
| 3.2.1. Određivanje indeksa zrelosti ploda maslina.....                                    | 17        |
| 3.2.2. Priprema acetonskog praha iz maslinovog tijesta .....                              | 17        |
| 3.2.3. Određivanje enzimске aktivnosti $\beta$ -glukozidaze .....                         | 18        |
| 3.2.4. Određivanje enzimске aktivnosti polifenol oksidaze i peroksidaze .....             | 19        |
| 3.2.5. Određivanje enzimске aktivnosti lipoksigenaze .....                                | 21        |
| 3.2.6. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....                       | 25        |
| <b>3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>4.1. INDEKS ZRELOSTI MASLINA</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>4.2. AKTIVNOSTI ENDOGENIH ENZIMA</b> .....   | <b>29</b> |
| 4.2.1. Aktivnost $\beta$ -glukozidaze .....   | 29        |
| 4.2.2. Aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze u oblici .....           | 31        |
| 4.2.3. Aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze u levantinki .....       | 32        |
| 4.2.4. Aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze u istarskoj bjelici..... | 34        |
| 4.2.5. Aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze u rosulji .....          | 35        |
| <b>4.3. REZULTATI STATISTIČKE OBRADU</b> .....  | <b>37</b> |
| 4.3.1. Utjecaj sorte i indeksa zrelosti na aktivnost polifenol oksidaze .....             | 38        |
| 4.3.2. Utjecaj sorte i indeksa zrelosti na aktivnost peroksidaze.....                     | 38        |
| 4.3.3. Utjecaj sorte i indeksa zrelosti na aktivnost lipoksigenaze.....                   | 39        |
| 4.3.4. Korelacije između aktivnosti enzima i indeksa zrelosti.....                        | 40        |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....  | <b>43</b> |

# 1. UVOD

Senzorske karakteristike djevičanskog maslinovog ulja (DMU) uvjetovane su prisutnošću specifičnih fenolnih i hlapljivih komponenata. Najzaslužniji enzimi masline koji oblikuju fenolni profil u DMU su endogene  $\beta$ -glukozidaze i oksidoreduktaze. Udio fenolnih komponenti određene sorte je odraz razine aktivnosti endogenih enzima tijekom sazrijevanja ploda kao i aktivnosti istih tijekom procesa mljevenja i miješenja (Peres i sur., 2016). Endogene  $\beta$ -glukozidaze tijekom mehaničke obrade hidroliziraju sekoiridoidne glikozide, kao što su oleuropein i dimetil oleuropein te modificiraju profil fenola koji će biti prisutan u konačnom proizvodu i tako definiraju aromu poput gorčine, trpkosti i pikantnosti (Lukić i sur., 2017), a pokazuju snažno antioksidativno djelovanje zbog čega imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje (Šarolić i sur., 2015). S druge strane, polifenol oksidaze i peroksidaze kataliziraju oksidaciju fenola u maslinovom tijestu zbog prisutnosti zraka iz atmosfere time smanjujući koncentraciju antioksidanasa i oksidacijsku stabilnost konačnog proizvoda (Taticchi i sur., 2013).

Hlapljive komponente DMU poput C6 i C5 aldehida, alkohola, estera itd. rezultat su aktivnosti enzima lipoksigenaznog puta. Aktivnosti enzima lipoksigenaznog puta ovise o sorti masline i stupnju zrelosti (Luaces i sur., 2007b), a produkti lipoksigenaznog puta su ti koji DMU daju voćne note kao i note na "zeleno" ili na "svježe pokošenu travu". Za dobivanje DMU poželjnih senzorskih svojstava potrebno je poznavati lipoksigenaznu aktivnost tijekom zrenja ploda, njenu ulogu tijekom proizvodnje ulja kao i ovisnost o sortnim karakteristikama.

Sorta masline jedan je od faktora koji utječe na sastav DMU jer su zabilježene razlike u sastavu triglicerida, hlapljivih spojeva, masnih kiselina i fenolnih spojeva u DMU dobivenog iz različitih sorti maslina (Huang i sur., 2020). S obzirom na to da na fenolni profil utječe biokemijska aktivnost, posljednjih godina posvetila se pozornost praćenju promjena koje se događaju u plodu i DMU tijekom sazrijevanja, s ciljem određivanja optimalnog termina berbe. Nadalje, optimalni indeks zrelosti ploda masline ima veliki utjecaj na iskorištenje proizvodnje, kvalitetu, stabilnost i senzorska svojstva konačnog proizvoda (Peres i sur., 2016).

Cilj ovog diplomskog rada je utvrditi utjecaj indeksa zrelosti na aktivnost endogenih enzima,  $\beta$ -glukozidaze, polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze, autohtonih hrvatskih sorti maslina.

Za potrebe ovog istraživanja korištene su hrvatske autohtone sorte oblica i levantinka, najzastupljenije u Dalmaciji te istarska bjelica i rosulja, zastupljene u Istri s različitim stupnjevima zrelosti ploda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. HRVATSKE AUTOHTONE SORTE

Dugu tradiciju uzgoja maslina u Hrvatskoj omogućuju agro-klimatski i pedološki uvjeti kao i kultivarska morfologija te se procjenjuje da se u Hrvatskoj uzgaja oko 6 milijuna stabala maslina. Uzgojno područje maslina prostire se duž 1000 km, od Savudrije na sjeveru do Prevlake na jugu i podijeljeno je na šest dijelova: Sjevernu, Srednju i Južnu Dalmaciju, Kvarnerske otoke, Istru i Dalmatinsku Zagoru (Strikić i sur, 2009). Popis sorti voćnih vrsta kojeg vodi Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu - HAPIH (HAPIH, 2021) broji 28 sorti maslina registriranih na temelju službeno priznatog opisa. Popis uključuje autohtone hrvatske i introducirane sorte maslina, ali ne uključuje podatke o njihovoj zastupljenosti. Prema podacima Agencije za upravljanje poljoprivrednim zemljištem od srpnja 2017. godine, zastupljenost sorti u maslinicima Republike Hrvatske je sljedeća: oblica 66 %, leccino 10 %, lastovka 4 % i buža 4 % dok su ostale sorte zastupljene u manjem postotku (Lukić, 2022).

#### 2.1.1. Dalmatinske sorte

##### 2.1.1.1. *Oblica*

Oblica je autohtona sorta i najzastupljenija je u dalmatinskim maslinicima, s više od 2000 godina uzgoja u Hrvatskoj (Strikić i sur., 2009). Plod sadrži do 21 % ulja što sortu čini primarnom sirovinom za proizvodnju ulja. Uvrštena je na sortnu listu Republike Hrvatske te se nalazi i na popisu svjetskih sorti pri Međunarodnom vijeću masline (The International Olive Council- IOC). Oblica je otporna na niske zimske temperature i suše (Mladar i sur., 1987) te nastanjuje maslinike sa siromašnijim i pličim tlima dalmatinskih otoka i obale (Jusup, 2021).

##### 2.1.1.2. *Lastovka*

Podrijetlo imena ove sorte dolazi iz izgleda grančice i ploda koji podsjećaju na krila lastavice. Uzgoj lastovke ograničen je na područja južne i srednje Dalmacije. Najveća populacije ove sorte je na otoku Korčuli, a posebice u području mjesta Vela Luka gdje prelazi 80 % ukupnog broja stabala lastovke. Uvrštena je na sortnu listu Republike Hrvatske kao i na popis svjetskih sorti pri IOC. Povećani interes za sadnjom ove sorte vidljiv je posljednjih dvadesetak godina zahvaljujući spoznajama o njezinoj gospodarskoj, agronomskoj i biološkoj

vrijednosti (Medved, 2018).

### *2.1.1.3. Levantinka*

Levantinka, čiji je rast ograničen na područje južne i srednje Dalmacije osim što je uvrštena na sortnu listu Republike Hrvatske također se nalazi na popisu svjetskih sorta masline koji se vodi pri IOC-u u Madridu. Levantinka je, za razliku od oblice, veoma osjetljiva na sušu i za njen uzgoj potrebna su tla dubljeg profila ili je potrebno osigurati adekvatno navodnjavanje (Medved, 2019). Najveća populacija ove sorte je na području otoka Šolte i prema procjeni struke zauzima 5-10 % od ukupnog broja stabala u srednjoj Dalmaciji.

### *2.1.2. Istarske sorte*

#### *2.1.2.1. Buža*

Buža je najrasprostranjenija istarska sorta, a nazivaju je još i buga, buža vodnjanka, burgaca itd., najviše se uzgaja u maslinicima jugozapadnog dijela Istre oko Peroja i Fažane, kao i u maslinicima Slovenskog primorja. Povoljni položaji za sadnju moraju biti zaštićeni od vjetra i topli s dubokom zemljom, ali i u takvim okolnostima je sklona alternativnoj rodности. Plodovi se beru kada se počnu mijenjati iz zelene u žutu boju (Maslinar, 2020). Sorta je namijenjena za proizvodnju ulja koje je pri optimalnom vremenu berbe odlične kvalitete sa srednje izraženim voćnim svojstvima u kojima prevladava badem, rajčica, radič i banana (Agroklub, 2021).

#### *2.1.2.2. Istarska bjelica*

Istarska bjelica, autohtona kasna sorta koja osim što dominira na istarskom poluotoku se također uzgaja na području Tršćanske pokrajine u Italiji. Obzirom na otpornost prema niskim temperaturama i vjetru, uzgaja se već nekoliko stotina godina. Djevičansko maslinovo ulje proizvedeno iz sorti istarske bjelice kao i iz rosulje prema istraživanju Koprivnjak i sur. (2016) ima najveći antioksidacijski kapacitet te se preporuča maslinarima razmnožavanje i uzgajanje ovih dviju sorti kako bi finalan proizvod bio konkurentan na globalnom tržištu.

### 2.1.2.3. Rosulja

Sorta rosulja kojoj su sinonimi još i rošinjola, rušinjola, rosinjola je autohtona istarska sorta maslina i jedna je od najzastupljenijih sorti nakon istarske bjelice, buže i črne (Milotić i sur., 2005; Poljuha i sur., 2008a). Na sortnoj je listi Republike Hrvatske od 2008. Najveći broj stabala rosulje nalazi se na istočnoj strani istarskog poluotoka u okolici Rovinja, Vodnjana i Vrsara. Sorta daje ujednačen prinos i pogodna je za proizvodnju ulja. Otporna je na slanost i dobro uspijeva u tlu crvenici, vrsti crvenog glinenastog tla na karbonatnoj stijeni, što je karakteristično za istarski poluotok (Milotić i sur., 2005). Prema studiji Poljuha i sur. (2008b), ova sorta sadrži veliki udio ukupnih polifenola, što povećava interes za njezinom sadnjom.

## 2.2. INTRODUCIRANE SORTE U HRVATSKOJ

Najzastupljenija introducirana sorta u Hrvatskoj je leccino. Sorta originalno potječe iz Toskane u Italiji i vrlo je raširena u cijelom svijetu zbog osobite prilagodljivosti na različite agroekološke uvjete. Leccino raste na dubokim i plodnim tlima koja u ljetnim mjesecima lakše podnose sušu. Prema klimatskim uvjetima, dobro podnosi niske zimske temperature i do -10 °C bez većih oštećenja. Osim u Istri u kojoj je kultivirana još od 1940., proširila se duž čitavog priobalja Hrvatske, sve do juga pa i na otoke. Rana je sorta kojoj je vrijeme berbe već u rujnu i listopadu (Agroportal, 2019).

## 2.3. ENDOGENI ENZIMI PLODA MASLINE

Pektinaze, lipaze, lipoksigenaze, hidroperoksid liaze,  $\beta$ -glukozidaze, polifenol oksidaze i peroksidaze endogeni su enzimi ploda masline (Koprivnjak, 2006). Poznavanje svojstava enzima, parametara za njihovu izolaciju iz ploda masline kao i odvijanje biokemijskih reakcija važno je za poboljšavanje nutritivne vrijednosti i senzorskih svojstva ulja.

### 2.3.1. Lipaze

Lipaze su endogeni enzimi ploda masline koji su locirani i u sjemenci i pulpi, a odgovorni su za hidrolizu triacilglicerola (TAG) (Kiritsakis i Markakis, 1988). Reakcija

hidrolize esterskih veza u TAG-u rezultira nastankom mono- i di-acilglicerola kao i alkohola glicerola te slobodnih masnih kiselina. Prema studiji Panzanaro i sur. (2010) lipaza je termolabilan enzim i njezina aktivnost se smanjuje na temperaturama višim od 35 °C. Također, se navodi kako aktivnost lipaze ovisi o stupnju zrelosti ploda i maksimalna je u drugom stadiju zrelosti ploda masline, a smanjuje se daljnjim sazrijevanjem ploda.

### 2.3.2. Pektinaze

U staničnoj stijenci pektin je za celulozu vezan mikrofibrilima i obzirom da je netopljiv u vodi staničnu stijenu održava krutom. No, pektinaze, enzimi prirodno prisutni u pulpi ploda tijekom dozrijevanja cijepaju pektinski lanac stvarajući manje, i u vodi topljivije dijelove pektina što omekšava staničnu stijenu ploda (Kashyap i sur., 2001). Te biokemijske reakcije mijenjaju teksturu ploda masline. Pektinaze su prema vrsti enzima hidrolaze, a dijele se u dvije skupine: pektinesteraze i pektin depolimeraze (Clodoveo i sur., 2014).

### 2.3.3. $\beta$ -glukozidaza

Ključni enzimski sustav koji kontrolira hidrolizu fenolnih glikozida kada je tkivo masline mehanički oštećeno ili patogeno napadnuto je skup  $\beta$ -glukozidaza ( $\beta$ -GLU).  $\beta$ -GLU je endogena glukohidrolaza koja katalizira reakciju hidrolitičkog cijepanja glikozidne veze između dva ili više ostataka glikona tj. veze između glukoze i aril ili alkil aglikona (Ertürk Kara i sur., 2011). Glavna fenolna komponenta i ujedno primarni supstrat  $\beta$ -GLU-e je oleuropein čija je koncentracija najveća u ranom periodu sazrijevanja ploda. Istraživanja su pokazala kako je i aktivnost  $\beta$ -GLU najviša upravo u tom periodu te da se smanjuje smanjenjem koncentracije oleuropeina (Hachicha Hbaieb i sur., 2015; Mazzuca i sur., 2006). Prema studiji Mazzuca i sur. (2006) oleuropein i  $\beta$ -GLU se nalaze u različitim staničnim odjelcima i nisu u kontaktu. Oleuropein je lokaliziran u vakuoli koja je smještena u vanjskom dijelu stanica mezokarpa, a  $\beta$ -GLU se nalazi u kloroplastima mezokarpa. Mehanička sila koja se primjenjuje tijekom mljevenja plodova razara stanično tkivo ploda i u neposredni kontakt dovodi  $\beta$ -GLU i oleuropein. Tijekom proizvodnje ulja, oleuropein i druge glikozide poput dimetiloleuropeina i ligstrozida,  $\beta$ -GLU hidrolizira u aldehidne aglikone. Aglikoni postaju topljiviji u uljnoj fazi dok glikozidi ostaju u vodenoj fazi (Servili i Montedoro, 2002). Osim  $\beta$ -GLU, oleuropein razgrađuju i esteraze prisutne u plodu, a oba enzimska puta razgradnje završavaju nastankom

hidroksitirosola (3,4-DPHEA), glukoze i elenolne kiseline. Oslobođeni aglikoni su visoko reaktivne molekule sa antioksidacijskom i antimikrobnom aktivnosti i doprinose senzorskim karakteristikama proizvedenog DMU (Cleodeveo i sur., 2014). Optimalni parametri za maksimalnu aktivnost  $\beta$ -GLU maslinama su temperatura od 45 °C i pH 5,5 (Romero- Segura i sur., 2009).

#### 2.3.4. Polifenol oksidaza

Polifenol oksidaza (PPO) je enzim koji uzrokuje enzimsko posmeđivanje u mnogim biljkama. Klasificira se u razred oksidoreduktaza, a u maslinama se nalazi u pulpi. Ukoliko su plodovi oštećeni, nepropisno transportirani ili neadekvatno skladišteni aktivnost PPO je izraženija te dolazi do promjene boje (Zawistovski i sur., 1991). PPO katalizira reakciju *o*-hidroksilacije monofenola (aktivnost monofenolaze) i oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone (aktivnost difenolaze) pomoću molekularnog kisika (Chazarra i sur., 2001). Produkti te biotransformacije, *o*-kinoni, su visoko reaktivne molekule koje se imaju sposobnost međusobno povezivati kovalentnim vezama ili reagirati sa aminima i polifenolima i tako stvarati smeđe ili crne polimere. Aktivnost PPO detektirana je u mezokarpu no, ne i u sjemenci ploda masline (Peres i sur., 2016; García-Rodríguez i sur., 2011). Ortega- García i sur. (2008) su u svom istraživanju definirali kinetiku PPO i rezultati u ispitivanoj sorti picual pokazuju kako sazrijevanjem ploda raste afinitet PPO prema supstratima, kateholu i katehinu. Temperaturni optimum PPO u turskim sortama domat, kiraz, uslu, gemlik i ayvalik je 40 °C, a pH 6,5 (Gencer i sur. 2012). Dok su Segovia- Bravo i sur. (2007) kao optimalnu vrijednost pH naveli 6,0 za PPO izoliranu iz španjolske sorte manzanilla.

#### 2.3.5. Peroksidaza

Peroksidaza (POX) katalizira reakciju oksidacije fenolnih komponenti u prvim fazama proizvodnje ulja uz vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ili neki drugi organski peroksid kao oksidans stvarajući slobodne radikale i polimerizirajuće intermedijare (Gajhede, 2001). Oksidacija fenola POX ograničena je dostupnim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no uslijed oštećenja tkiva dolazi do auto-oksidacije fenolnih komponenti što povećava koncentraciju dostupnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kojeg POX dalje koristi za daljnju oksidaciju fenolnih komponenti. Kao i PPO, POX je oksidoreduktaza, ali se nalazi i u pulpi i sjemenci masline. Mjerenjem aktivnosti peroksidaza u studiji Peres i sur. (2016)

pokazalo se kako znatno višu aktivnost posjeduje POX izolirana iz sjemenke. Obzirom na to da su hidrofilni fenoli većinom koncentrirani u pulpi, a u sjemenci tek malo, faza mljevenja omogućuje kontakt POX i fenola. Ovaj enzim je termorezistentan i može se regenerirati ukoliko je inaktiviran toplinom (Clodoveo i sur., 2014). Postoje mnogi izoformni oblici ovog enzima koji se razlikuju prema molekularnoj masi, izoelektričnoj točki, optimalnom pH i temperaturnim vrijednostima, specifičnosti prema supstratu, sastavu aminokisline i šećera kao i toplinskoj stabilnosti (Saraiva i sur., 2007). Saraiva i sur. (2007) pročišćavanjem i karakterizacijom enzima iz douro sorte u kasnom stupnju zrelosti masline definirali su pH 7,0 i temperaturu 34,7 °C kao optimalne vrijednosti za najveću enzimsku aktivnost POX, a ista je temperatura potvrđena od strane Taticchia i sur. (2013) u maraiolo kultivaru.

### 2.3.6. Lipoksigenaza

Lipoksigenaza (LOX) je enzim koji se nalazi u biljkama i sisavcima, a prema novijim istraživanjima i u gljivama, koraljima i bakterijama. LOX je u plodovima maslina dio cijelog sustava enzima lipoksigenaznog puta (LOX put) i ima značajnu ulogu u sintezi hlapljivih tvari koje utječu na aromu i miris DMU (Soldo, 2016). Supstrati LOX su višestruko nezasićene masne kiseline poput linolne i  $\alpha$ -linolenske, a njihova dostupnost LOX glavni je čimbenik za biosintezu komponenata arome (Peres, 2015). Enzimski LOX put započinje acil-hidrolazom koja oslobađa masne kiseline iz glicerolipida, a zatim LOX katalizira reakcije oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina. Produkti reakcije su hidroperoksidi tih masnih kiselina koji su reaktanti sljedećem enzimu u nizu LOX puta, hidroperoksid liazi (HPL). HPL katalizira enzimsku reakciju nastajanja aldehida. Aldehidi se reduciraju u alkohole djelovanjem alkohol dehidrogenaze, a posljedica postojanja odgovarajućih estera u maslinovom ulju je zbog prisutnosti alkohol acil-transferaze (Sanchez- Ortiz i sur., 2018). Nastale hlapljive komponente su raznoliki aldehidi, alkoholi, esteri i ketoni koji doprinose balansiranom okusu i "zelenim i voćnim" mirisnim notama ulja (Kotti i sur., 2010). LOX put je iniciran kada LOX otpuštanjem iz staničnog tkiva masline dođe u neposrednu blizinu sa supstratima tijekom tehnološke operacije mljevenja ploda i operacije miješenja maslinovog tijesta (Ranalli i sur., 2001). Tip i koncentracija akumuliranih produkata LOX puta usko je povezana s količinom i aktivnošću enzima uključenih u LOX put (Angerosa i Basti, 2003). LOX enzim u biljkama se nalazi slobodan u citoplazmi ili vezan za membrane staničnih organela. Slobodna LOX se nalazi u vakuolama, kloroplastima i lipidnim tijelima, a vezana LOX se nalazi vezana na plazmatskim membranama, tilakoidnim membranama kloroplasta i membranama lipidnih tijela (Braidot i



sur., 2004).

Izolacija enzima je teška zbog hidrofobnog svojstva enzima kao i zbog unakrsnih reakcija i ometanja drugih komponenata ploda poput proteina i polifenola koji su prisutni u visokoj koncentraciji u maslinama. Aktivnost LOX je optimalna u kiselom pH, sličnom onome koji vlada u maslinovom tijestu tijekom procesa mljevenja plodova i miješenja (Kotti i sur., 2010).

## **2.4. FAKTORI KOJI UTJEČU NA AKTIVNOST ENDOGENIH ENZIMA PLODA MASLINE**

Kompleksan enzimski sustav masline oblikuje fenolni profil i definira koncentraciju hlapljivih komponenti. Udio hidrofilnih fenolnih spojeva u DMU nije samo odraz početnog udjela fenolnih komponenti određene sorte maslina već odraz razine aktivnosti endogenih enzima tijekom sazrijevanja ploda kao i aktivnosti istih tijekom procesa mljevenja i miješenja (Peres i sur., 2016). Prisutnost hlapljivih spojeva poput heksanala, *trans*-2-heksanala, 1-heksanola i 3-metilbutan-1-ola u ulju rezultat je aktivnosti enzima LOX puta koja je genetski determinirana (Clodoveo i sur. 2014). Osim utjecaja sorte i stupnja zrelosti koji su predmet brojnih istraživanja, utjecaj na sastav i kvalitetu ulja ima i skladištenje (Koprivnjak i sur., 2002) te prerada plodova masline (Servili i sur., 2003).

U preciznijem definiranju enzimске aktivnosti izazov predstavlja heterogenost ploda masline jer kemijski sastav ploda, ulje, voda, složeni i jednostavni ugljikohidrati kao i spojevi poput polifenola, ometaju ekstrakciju enzima (Sanchez- Ortiz i sur., 2018). Za poboljšanje tehnoloških procesa prerade masline presudno je bolje razumijevanje molekularnog mehanizma procesa sazrijevanja ploda kao i faktora koji utječu na aktivnost endogenih enzima masline (Skodra i sur., 2021).

### 2.4.1. Utjecaj sorte masline

Romero- Segura i sur. (2012) su u sortama picual i arbequina, zabilježili značajnu razliku u aktivnosti  $\beta$ -GLU. Iako je trend aktivnosti  $\beta$ -GLU sličan, u sorti picual je izmjerena dvostruko veća aktivnost  $\beta$ -GLU nego u arbequini u plodovima s istim indeksom zrelosti. Da

sorta ima utjecaj na aktivnost  $\beta$ -GLU potvrdili su Velázquez-Palmero i sur. (2017) čiji je cilj bio okarakterizirati gen za endogenu  $\beta$ -GLU iz ploda masline koja je odgovorna za fenolni sastav DMU. Rezultati su pokazali kako je ekspresija gena za  $\beta$ -GLU ovisna o sorti obzirom da je razina transkripcije gena u mezokarpu u 28. tjednu nakon cvjetanja veća u sorti picual nego u sorti arbequina.

U istraživanju koje su proveli García-Rodríguez i sur. (2011) prateći utjecaj aktivnosti PPO i POX na formiranje fenolnog profila DMU u sortama arbequina i picual, detektirali su razliku u aktivnosti POX u plodovima tih sorti s istim indeksom zrelosti, gdje je u sorti picual izmjerena veća aktivnost POX nego u arbequini. S druge strane, Hachicha Hbaieb i sur. (2016) su izmjerili manju aktivnost PPO u tuniškoj sorti arbequina nego što su to izmjerili García-Rodríguez i sur. (2011) u španjolskim maslinama arbequina. Posljedično, razlika u tim rezultatima može biti zbog utjecaja sorte na aktivnost PPO. Novije istraživanje Sainz i sur. (2019) također pokazuje kako je aktivnost PPO i POX sortna karakteristika jer su dobivene vrijednosti u sortama manzanilla i morisca izmjerene drugačije. Pa je tako u sorti manzanilla vrijednost PPO veća nego u morisci, a isto je izmjereno za aktivnost POX.

Prema Patui i sur. (2010) dostupnost supstrata i enzimski aktivnost ovisi o sorti i samo je djelomično povezana s okolišnim čimbenicima koji mogu utjecati na sazrijevanje plodova, a u njihovom istraživanju u ispitivanim talijanskim sortama ghiaccio i nostrana uočena je razlika u aktivnosti LOX. Nadalje, ispitivanje koje je provedeno na sortama arbequina i farga pokazuje vidljiv utjecaj sorte na aktivnost LOX (Criado i sur., 2006). U prilog utjecaju sorte na aktivnost LOX ide ispitivanje Palmieri- Thiers i sur. (2009) koji su mjerili aktivnosti LOX u ispitivanim sortama i najvišu aktivnost izmjerili u sorti leccino, a nešto niže vrijednosti u arbequini, sabini pa germainu. Budući da su sorte uzgojene u istom masliniku i plodovi brani s istim indeksom zrelosti, razlike u enzimskoj aktivnosti mogu se pripisati sortnim karakteristikama. Ridolfi i sur. (2002) su u svom istraživanju indirektno zabilježili razliku u aktivnosti LOX među sortama, uzimajući u obzir pretpostavku da aktivnost LOX vodi formiraju C5 i C6 hlapljivih komponenti. Nakon izolacije enzima i određivanja aktivnosti rezultati su pokazali kako u plodu sorte FS17 postoji visoka LOX aktivnost što odgovara većoj količini hlapljivih C5 i C6 spojeva, dok je u plodovima sorte ascolana tenera niska enzimski aktivnost rezultirala najnižom količinom C5 i C6 spojeva arome. S obzirom na enzimski aktivnost i koncentraciju hlapljivih spojeva, sorta kalamata nalazi se između ove dvije sorte. Obzirom da su masline tih triju sorti pobrane u istom masliniku s istim indeksom zrelosti razlika u aktivnosti LOX, enzimu zaslužnom za biogenezu C5 i C6 komponenti, može se pripisati razlikama u sorti.

## 2.4.2. Utjecaj stupnja zrelosti ploda masline

Maslinari plodove beru u optimalnoj zrelosti plodova kada je omjer količine i kvalitete ulja koje se može dobiti iz ploda najbolji, što se u praksi tradicionalno određuje prema boji plodova. Ipak, pouzdaniji način određivanja termina berbe je određivanjem indeksa zrelosti (engl. ripening indeks, RI ili maturation indeks, MI). Indeks zrelosti procjenjuje stupanj zrelosti plodova maslina, a određuje se procjenom boje kožice i pulpe 100 maslina iz slučajnog uzorka kao reprezentativnih za ukupnu količinu (Beltrán i sur., 2004.; Uceda i Frias, 1975). Stupnjevi zrelosti ploda (0-3) temelje se na promjeni boje pokožice dok se plodovi stupnja zrelosti od 4-7 razlikuju po obojanosti pulpe.



**Slika 1.** Shematski prikaz pigmentacije pokožice i pripadajućeg stupnja zrelosti (prema Ferreira, 1979)

Dosadašnja istraživanja aktivnosti  $\beta$ -GLU u ovisnosti o indeksu zrelosti pokazuju različite rezultate aktivnosti  $\beta$ -GLU. Mazzuca i sur. (2006) su pokazali kako se tijekom dozrijevanja plodova aktivnost  $\beta$ -GLU smanjuje obzirom da njena aktivnost ovisna o koncentraciji oleuropeina. U sortama koje su istraživali je izmjereno kako niskoj vrijednosti indeksa zrelosti plodova odgovara visoka aktivnost  $\beta$ -GLU te da je ona proporcionalna koncentraciji oleuropeina, dok sa porastom indeksa zrelosti i smanjenjem koncentracije oleuropeina se smanjuje i aktivnost  $\beta$ -GLU. Isti trend su zabilježili Hachicha Hbaieb i sur. (2016) u sorti arbequina no, ne i u sorti chetoui gdje sa povećanjem indeksa zrelosti je uočeno

postupno povećanje aktivnosti  $\beta$ -GLU. Velázquez- Palmero i sur. (2017) izolirali su gen za  $\beta$ -GLU iz sorte picual i stvorili odgovarajući rekombinantni enzim. Za taj enzim su pratili razinu transkripcije gena u mezokarpu tijekom dozrijevanja plodova sorti picual i arbequina te izmjerili najvišu razinu transkripcije s najmanjim indeksom zrelosti u obje sorte. Za sortu arbequina nakon tog početnog maksimuma ekspresija gena se znatno smanjuje i ostaje niska i konstantna povećanjem indeksa zrelosti plodova. S druge strane, za sortu picual zabilježen je drugi maksimum ekspresije gena osam tjedana nakon, a potom se razina transkripcije smanjuje. Romero- Segura i sur. (2012) su u ispitivanim sortama picual i arbequina zabilježili suprotan trend aktivnosti  $\beta$ -GLU tijekom dozrijevanja. Između prva dva indeksa zrelosti u obje sorte je došlo do naglog smanjenja aktivnosti  $\beta$ -GLU, a potom je aktivnost  $\beta$ -GLU u obje sorte rasla sa povećavanjem indeksa zrelosti

Prema istraživanju Sainz i sur. (2019) na aktivnost PPO nema utjecaj režim kultivacije kao ni navodnjavanje već samo indeks zrelosti ploda. Aktivnost PPO su pratili u sortama morisca i manzanilla tri godine za redom. Zabilježili su smanjenje aktivnosti PPO u sorti morisca povećanjem indeksa zrelosti kao što je to i slučaj u sortama gordal i picual u istraživanju Hornero- Mendez i sur. (2002). 2011. godine aktivnost PPO u sorti manzanilla je izmjerena znatno veća u odnosu na sljedeće dvije godine istraživanja. Drugačiju aktivnost PPO su izmjerili u istoj sorti sljedeće dvije godine kada je veća aktivnost PPO zabilježena u najzrelijim plodovima. Povećanje aktivnosti PPO povećanjem indeksa zrelosti zabilježili su Ortega- García i sur. (2008) u sorti picual kao i Cirilli i sur. (2017) u sorti frantoio. Da postoje varijacije u aktivnosti PPO tijekom dozrijevanja plodova pokazala je ista grupa znanstvenika koji su u sortama chemali i chetoui detektirali smanjenje aktivnosti PPO porastom stupnja zrelosti, a potom u istim sortama izmjerili dva pika aktivnosti PPO (Hachicha Hbaieb i sur., 2017a; 2017b). Prvu aktivnost izmjerili su u plodovima sa niskim stupnjem zrelosti, a potom u plodovima sa IZ= 3-4. Takva varijacija u aktivnosti PPO tijekom dozrijevanja plodva nije u skladu sa istraživanjem García-Rodríguez i sur. (2011). Prema njima nema varijacija u aktivnosti PPO nakon postignutog maksimuma aktivnosti u 28. tjednu od cvjetanja u obje sorte, arbequina i picual.

Niska aktivnost POX u plodovima picual i arbequina je izmjerena u ranoj fazi razvoja ploda. Maksimum aktivnosti POX je u 28. tjednu cvatnje, a daljnjim dozrijevanjem plodova aktivnost je konstantno rasla (García-Rodríguez i sur., 2011). Sličnu promjenu aktivnosti POX porastom stupnja zrelosti u plodovima sorte chetoui zabilježili su Hachicha Hbaieb i sur. (2017a). U sorti oueslati je također aktivnost POX kontinuirano rasla povećanjem stupnja zrelosti plodova, ali se u zadnjem stupnju zrelosti smanjila (Hachicha Hbaieb i sur., 2022).

Takvo što zabilježila je ista grupa znanstvenika u sortama chemali i chetoui (Hachicha Hbaieb i sur., 2017b). Također, istraživanje Sainz i sur. (2019) je pokazalo rast aktivnost POX tijekom dozrijevanja plodova u sve tri godine (2011., 2012., 2013.) uz kasnije smanjenje aktivnosti u najzrelijim plodovima. Pa je tako u sorti manzanilla, no i u plodovima moriscie aktivnost POX rasla između prva dva indeksa zrelosti, a potom se smanjila ili ostala konstantna. Treći trend promjene aktivnosti POX su zabilježili Cirilli i sur. (2017) u sorti frantoio gdje je došlo do smanjenje aktivnosti POX dozrijevanjem plodova, a potom lagani porast aktivnosti u zadnjem stupnju zrelosti plodova.

Najveća aktivnost LOX izmjerena je u početnoj razvojnoj fazi s izrazitim i kontinuiranim smanjenjem do minimalne razine aktivnosti na kraju dozrijevanja (Salas i Sánchez, 1998). To je potvrđeno od strane Salas i sur. (1999) koji su prijavili veću aktivnost enzima u plodovima s niskim indeksom zrelosti u 13.-tom tjednu nakon oprašivanja. Tu visoku aktivnost LOX enzima u ranoj fazi razvoja ploda povezali su s fiziološkim odgovorom enzima na stres što dalje nisu objasnili. Rezultati istraživanja aktivnosti LOX enzima tijekom dozrijevanja ploda masline, provedenog na četiri sorte, sabina (Korzika), germaine (Korzika), leccino (Italija) i arbequina (Španjolska), potvrdili su očekivane razlike enzimske aktivnosti LOX u pojedinim sortama. Najviša aktivnost izmjerena je u sorti leccino slijede arbequina i sabina, a najmanja aktivnost zabilježena je u sorti germaine. Najviši porast enzimske aktivnosti kod svih ovih ispitivanih sorti zabilježen je u fazi zrenja kada se boja ploda mijenja iz zelene u crveno-ljubičastu (Palmieri-Thiers i sur., 2009) .

#### 2.4.3. Skladištenje plodova

Hachicha Hbaieb i sur. (2016) su promatrali utjecaj temperature skladištenja (25 °C i 4 °C) na aktivnost  $\beta$ -GLU, PPO i POX u plodovima maslina chetoui i arbequina tijekom četiri tjedna. Aktivnost  $\beta$ -GLU u maslinama sorte arbequina se smanjuje na obje temperature odmah nakon prvog tjedna skladištenja. U chetoui plodovima se aktivnost  $\beta$ -GLU na temperaturi od 25 °C smanjila tek u 3. i 4. tjednu, a na temperaturi od 4 °C je aktivnost rasla do 3. tjedna, a potom se smanjila. Što se tiče enzimske aktivnosti PPO tijekom skladištenja, zabilježeno je značajno smanjenje aktivnosti PPO u maslinama na 25 °C u oba kultivara. U četiri tjedna na temperaturi od 25 °C u chetoui maslinama aktivnost PPO se smanjila za 87 % od početne vrijednosti, dok u plodovima sorte arbequina 65 %.

Rezultati za aktivnost POX u chetoui plodovima su pokazali kako temperatura skladištenja nije bila značajna tijekom cijelog razdoblja skladištenja, no povećanje aktivnosti

POX je detektirano u plodovima sorte arbequina u zadnjem tjednu skladištenja na 25 °C. To je u skladu sa rezultatima koje je objavila ista grupa autora (Hachicha Hbaieb i sur., 2015) za zelene masline arbequina uzgojene u Sevilli. Osim toga, u prvom tjednu skladištenja maslina sorte arbequina opaženo je smanjenje aktivnosti POX na obje temperature.

Razine aktivnosti LOX su ostale gotovo nepromijenjene u plodovima maslina picual koje su skladištene na 20 °C, ali je aktivnost značajno smanjena u plodovima koji su skladišteni na 5 °C (Luaces i sur., 2005).

#### 2.4.4. Prerada ploda masline

Biokemijske reakcije koje kataliziraju endogeni enzimi ploda masline započinju nakon što se stanična struktura plodova razori mehaničkim silama i u neposredan kontakt dođu supstrati i endogeni enzimi koji su bili fizički odvojeni unutar stanice. Proces proizvodnje ulja popraćen je reakcijama koji uključuju hidrolizu glicerida lipazama, hidrolizu glikozida i oligosaharida glukozidazama, oksidaciju fenolnih komponenti oksidoreduktazama (Artajo i sur., 2006). Temperatura procesa proizvodnje, prisutnost atmosferskog zraka i način mljevenja plodova glavni su aspekti proizvodnje ulja koji imaju neposredan utjecaj na aktivnost endogenih enzima. Obzirom da  $\beta$ -GLU, PPO i POX definiraju finalnu koncentraciju i sastav fenolnih komponenata u DMU, uvjete rada je potrebno unaprijed odrediti kako sustav mljevenja ne bi npr. inaktivirao  $\beta$ -GLU što bi dovelo do toga da se velika koncentracija hidrofilnih fenolnih glikozida ne ekstrahira u ulje već ostane u otpadnim vodama (Clodoveo i sur., 2014). Također, obzirom da je konačni sadržaj hidrofilnih fenola u uljima pod jakim utjecajem endogenih oksidoreduktaza ploda masline kao što su PPO i POX i iako su te razine enzima genetski određene na njihovu aktivnost može se utjecati pravilnim provođenjem tehnoloških operacija (Servili i sur., 2003).

##### 2.4.4.1. Utjecaj opreme

Oprema koja se koristi za mljevenje maslina utječe na temperaturu tijesta zbog mehaničke energije koja je utrošena na lomljenje tkiva masline. Prednost kamenih mlinova i drobilice sa diskovima je ta što ne dolazi do zagrijavanja maslinovog tijesta i time ne dolazi do denaturacije LOX. Mana ove opreme je duga izloženost maslinovog tijesta kisiku što zbog pojačane aktivnosti PPO i POX dovodi do oksidacije fenolnih komponenti. Takva ulja zato

imaju nižu oksidacijsku stabilnost te izostaju note gorčine i pikantosti (Amirante i sur., 2006). Metalni mlinovi čekićari proizvode više topline zbog velike brzine okretaja što inaktivira enzime LOX puta, ali PPO i POX enzimi tu temperaturu toleriraju (Amirante i sur., 2010). Ukoliko se za proizvodnju ulja koristi uređaj koji prethodno uklanja koštice masline, ulje dobiveno mljevenjem samo pulpe okarakterizirano je sa više onih hlapljivih komponenti koje formiraju " zelene" note i note po "svježe pokošenoj travi" jer se smatra kako enzimi LOX puta iz pulpe imaju drugačiju aktivnost u odnosu na enzime LOX puta iz sjemenke (Clodoveo i sur., 2014). Također, studija Luaces i sur. (2007a) ukazuje kako je podrijetlo POX u sorti picual vezana za sjemenku, stoga isključivanje sjemenki može smanjiti enzimsku oksidaciju fenolnih spojeva pulpe.

#### *2.4.4.2. Utjecaj temperature i trajanja procesa miješenja tijekom proizvodnje DMU*

Konačna koncentracija hidrofilnih fenola u DMU ovisi o aktivnosti PPO i POX koji djeluju sinergijski, a kontrolom parametra poput temperature i vremena trajanja procesa kao i prisutnost kisika tijekom proizvodnje DMU, može se utjecati na aktivnost oksidoreduktaza što je pravi način za povećanje koncentracije fenolnih antioksidansa u DMU (Montedoro i sur., 2002). Miješenje je kritičan trenutak procesa proizvodnje DMU kada se u mjesilici, tanku od nehrđajućeg čelika, maslinovo tijesto kontinuirano mijesi prateći temperaturu procesa. Duže trajanje procesa miješenja pak dopušta  $\beta$ -GLU da katalizira reakcije nastajanje fenolnih aglikona no, zbog prisutnosti zraka iz atmosfere dulje trajanje procesa omogućava PPO i POX veći broj reakcija oksidacija fenolnih komponenti što onda rezultira smanjenjem količine fenolnog udjela u DMU (Clodoveo i sur., 2014; Taticchi i sur., 2013). Enzimi LOX puta osjetljiviji su na okolišne uvjete, a pogotovo na temperaturu (Angerosa, 2002). Ukoliko temperatura maslinovog tijesta postane viša od optimalne koja je 30 °C (Ridolfi i sur., 2002), dolazi do denaturacije enzima što posljedično utječe na sve reakcije LOX puta i dovodi do smanjenja C5 i C6 aldehida, alkohola i estera u DMU (Angerosa i sur., 2001). Također, Reboredo-Rodriguez i sur. (2014) su pratili utjecaj temperature i trajanje miješenja na formiranje C5 komponenta u različitim sortama, ali dobili suprotne efekte.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Kao materijal u ovom diplomskom radu korišteni su plodovi četiriju autohtonih hrvatskih sorti maslina Oblice, Levantinke, Rosulje i Istarske bjelice. Masline su brane u tri roka berbe (28.10, 2 i 3.11. te 9.11.2021.) te unutar 24 sata od branja samljevene koristeći mlin čekićar koji je dio poluindustrijske uljare OLEUM 30 COMPACT (Enotecnica Pillan, Camisano Vicentino, Italija). Za izolaciju lipoksigenaze (LOX) i određivanje njezine aktivnosti korišteno je tijesto maslina koje je odmah nakon mljevenja brzo zamrznuto uranjanjem u tekući dušik.  $\beta$ -glukozidaza ( $\beta$ -GLU), polifenoloksidaza (PPO) i peroksidaza (POX) izolirale su se iz acetonskih prahova pripremljenih iz svježije samljevenih plodova maslina.

##### 3.1.1. Popis kemikalija

|   |  |
|---|--|
| Benzamid (>95,0 %, Sigma-Aldrich)                 | Aldrich)   |
| Borna kiselina (Kemika)                           | Natrij-acetat (Sigma)  |
| Butilhidroksitoluen (Sigma- Aldrich)              | Natrij-dihidrogenfosfat-2- hidrat (Kemika)   |
| Coomassie Brilliant blue G 250 (Sigma-Aldrich)    | n-Heksan (Kemika)  |
| D-(-)-Norleucin (99 %, Alfa Aesar)                | Octena kiselina (>99,8 %, Honeywell  |
| di-natrij-hidrogenfosfat, bezvodni (Kemika)       | Fluka)   |
| DL-Ditiotreitola (>99,0 %, Sigma-Aldrich)         | Polivinilpirolidon (Sigma-Aldrich)   |
| Etanol (96 %, Lach-Ner)                           | Katehol (>=99 %, Sigma-Aldrich)  |
| Etilendiamintetraoctena kiselina (>98,5 %, Sigma) | Izopropanol ( Honeywell, Riedel- de Haen)  |
| Fenil metansulfonilfluorid (>98,5 %, Sigma)       | 4-Nitrofenil B-D-glukopiranozid ( <i>p</i> -nitrofenil glukopiranozid) (Sigma-Aldrich) |
| Gvajakol (98 %, Sigma- Aldrich)                   | <i>p</i> -nitrofenol (Sigma-Aldrich)   |
| Kalij- klorid (Kemika)                            | Triton X-100 (Sigma)   |
| Kalij- fosfat (Kemika)                            | Tween-40 (Fluka)   |
| $\alpha$ - Linolenska kiselina (>99 %, Sigma-     | Vodikov peroksid, otopina min 30 % (T.T.T. d.o.o.)                                     |



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Određivanje indeksa zrelosti ploda maslina

Indeks zrelosti ploda masline procjenjuje se prema pigmentaciji ploda (Uceda i Frias, 1975). Reprezentativan uzorak čini 100 maslina sakupljenih u različitim dijelovima maslinika. S obzirom na stupanj pigmentacije pokožice i pulpe, plodovi se razvrstavaju u 8 kategorija (slika 1 i tablica 1). Indeks zrelosti računa se prema formuli [1].

**Tablica 1.** Prikaz faza i opisa masline u toj fazi

| Broj faze | Opis masline   |
|-----------|--|
| Faza 0    | Zelena maslina                                       |
| Faza 1    | Jako zelena, ne sjaji se, pokožica žuto zelena       |
| Faza 2    | Zeleno-ljubičasto žuta s rozim pigmentima, sjaj      |
| Faza 3    | Boja je promjenjiva, vidi se da može dodatno tamnit  |
| Faza 4    | Tamna maslina, meso oko pokožice više od 50 % bijelo |
| Faza 5    | Tamna maslina, meso do pola bijelo                   |
| Faza 6    | Tamna maslina, meso ljubičasto do koštice            |
| Faza 7    | Tamna maslina, skroz tamno meso                      |

$$IZ = \frac{((0 \cdot n_0) + (1 \cdot n_1) + (2 \cdot n_2) + (3 \cdot n_3) + (4 \cdot n_4) + (5 \cdot n_5) + (6 \cdot n_6) + (7 \cdot n_7))}{100} \quad [1]$$

Gdje je:

IZ= stupanj indeks zrelosti

$n_0, n_1, n_2 \dots n_7$  – zabilježen broj maslina u pojedinoj kategoriji

### 3.2.2. Priprema acetonskog praha iz maslinovog tijesta

Acetonski prah pripremljen je prema modificiranoj metodi Romero-Segura i sur. (2009) gdje se 75 g maslinova tijesta samelje s 1000 mL hladnog acetona (-20 °C) u plastičnoj čaši pomoću Ultraturrax homogenizatora (GLH850, Omni International, Kennesow, SAD) dvije minute. Kruti ostatak se nakon filtracije još u dva navrata ekstrahira s po 200 mL hladnog acetona (-20 °C) pomoću Ultraturrax homogenizatora svaki puta po 1 minutu. Čvrsti ostatak se na kraju ispire s malom količinom (50 mL) dietiletera, suši pod vakuumom te sprema u

plastičnu vrećicu i skladišti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do izolacije enzima. Odmrznuti acetonski ekstrakt koristi se za izolaciju  $\beta$ -GLU, PPO i POX.

### 3.2.3. Određivanje enzimске aktivnosti $\beta$ -glukozidaze

#### 3.2.3.1. Postupak izolacije

$\beta$ -GLU izolira se 60 minutnim miješanjem 3 grama acetonskog praha resuspendiranog u 12 ml otopine za ekstrakciju na magnetskoj miješalici u ledenoj kupelji. Otopina za ekstrakciju enzima pripremljena je u 0,1 mol/L boratnom puferu (pH=9) koji sadrži 5 mmol/L etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), 1 mmol/L fenilmetansulfonil fluorida (PMSF) i 0,25 % (m/V) ditiotreitola (DDT) (Romero- Segura i sur., 2009). Nakon 60 minuta, ekstrakt se prebaci u plastičnu kivetu za centrifugu i centrifugira na 27000 g pri temperaturi od  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 30 minuta (Rotina 380, Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Supernatant se prebaci u plastičnu epruvetu i stavi temperirati na  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

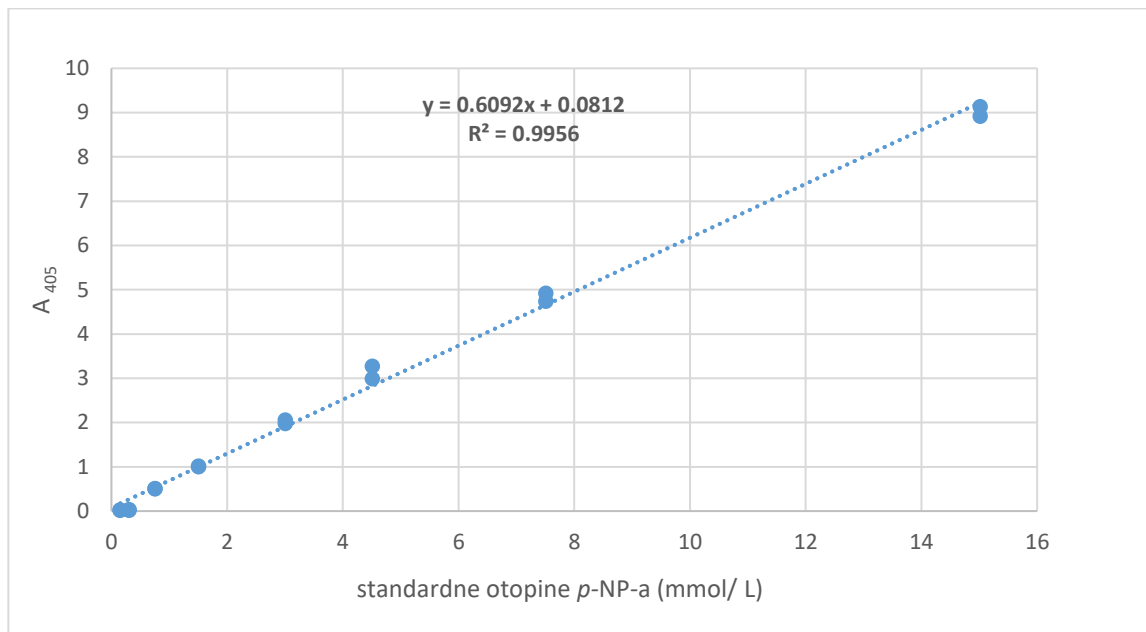
#### 3.2.3.2. Određivanje aktivnosti

Aktivnost  $\beta$ -GLU određuje se prema metodi Romero-Segura i sur. (2009) te se 10ak minuta prije provođenja analize enzimski ekstrakt, supstrat koji je 15 mmol/L otopina *p*-nitrofenil glukopiranozida u acetatnom puferu (0,05 mol/L i pH=5.5) (*p*-NPG) i acetatni pufer (0,05 mol/L, pH=5,5) stave temperirati na  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti  $\beta$ -GLU se sastoji od 500  $\mu\text{L}$  enzimskog ekstrakta i 1,5 mL *p*-NPG-a. Smjesa se promiješa na Vortex-u (LLG Labaware uniTexer, Njemačka) 10 sekundi. Aktivnost enzima se određuje mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom (Secomam 30100, Arles, Francuska) na 405 nm nakon točno jedne minute inkubacije na  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Također, na isti način se pripreme slijepa probe, jedna slijepa proba koji čine 1,5 mL acetatnog pufera i 500  $\mu\text{L}$  enzimskog ekstrakta i druga od 1,5 mL *p*-NPG-a i 500  $\mu\text{L}$  otopine za ekstrakciju.

Aktivnost  $\beta$ -GLU se izražava kao količina produkta (*p*-nitrofenola (*p*-NP)) koju proizvede 1 mg proteina pri temperaturi od  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Koncentracija *p*-NP-a određuje se iz baždarnog pravca (slika 2).

Baždarni pravac izrađen je pomoću standardnih otopina *p*-NP-a otopljenog u acetatnom puferu (0,05 mol/L, pH=5,5) u rasponu koncentracija od 0,15 do 15 mmol/L. Promjena apsorbancije ( $\Delta A$ ) računa se prema formuli [2], dok se koncentracija *p*-NP u enzimskom

ekstraktu računa pomoću jednadžbe baždarnog pravca [3].



**Slika 2.** Baždarni pravac standardne otopine p- NP-a (mmol/L)

$$\Delta A = A1 - A2 - A3 \quad [2]$$

$$c(p\text{-NP}) = \frac{\Delta A - 0,0812}{0,6092} \quad [3]$$

Gdje je:

A1 – izmjerena apsorbancija supstrata i enzima nakon reakcije

A2 – izmjerena apsorbancija supstrata i otopine za ekstrakciju nakon reakcije

A3 – izmjerena apsorbancija pufera i enzima nakon reakcije

$\Delta A$ - apsorbancija oslobođenog produkta

$c(p\text{-NP})$ - koncentracija p-NP-a (mmol/L).

### 3.2.4. Određivanje enzimske aktivnosti polifenol oksidaze i peroksidaze

#### 3.2.4.1. Postupak ekstrakcije

Aktivnost PPO i POX se određuje iz istih enzimskih ekstrakata prema metodi Conte i sur. (2018). U Erlenmayerovu tikvicu od 15 mL sa brušenim čepom izvaže se 3 grama acetonskog praha i 0,3 g polivinilpirolidona te doda 12 mL otopine za ekstrakciju. Otopina za

ekstrakciju je 0,05 mol/L kalij-fosfatni pufer (pH=6,2) pripremljen standardnim postupkom. Ekstrakcija se provodi sat vremena na magnetskoj miješalici u ledenoj kupelji. Centrifugiranje se provodi u vijalicama volumena 1,5 mL na 21000 g (Rotina 380, Hettich, Tuttlingen, Njemačka), temperaturi 4 °C kroz 30 minuta. Supernatant se prebaci u epruvetu i temperira na 25 °C.

#### 3.2.4.2. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze

Reakcijska smjesa za određivanje PPO sastoji se od 2.5 mL supstrata i 500 µL enzimskog ekstrakta. Otopina supstrata koja se koristi za određivanje aktivnosti je 30 mmol/L otopina katehola u 50 mmol/L natrij-fosfatnom puferu (pH=6,2). Aktivnost PPO određuje se spektrofotometrijski na 420 nm nakon točno 1 minute reakcije. Pripreme se slijepe probe, jedna slijepa proba koju čini 2,5 mL natrij-fosfatnog pufera (0,05 mol/L, pH=6,2) i 500 µl enzimskog ekstrakta i druga koju čini 2,5 ml supstrata i 500 µL otopine za ekstrakciju enzima te se i njima izmjeri apsorbancija na 420 nm nakon 1 minute.

Aktivnost PPO se definira kao količina produkta (*o*- kinona) koju proizvede 1 mg proteina na temperaturi od 25 °C. Promjena apsorbancije ( $\Delta A$ ) računa se prema formuli [2], a koncentracija nastalog produkta dana je Lambert Beerovim zakonom [4].

$$c(\text{produkta}) = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot d} \quad [4]$$

Gdje je :

$c(\text{produkta})$  – koncentracija nastalog produkta (mol/L)

$d$  – duljina puta zrake (1 cm)

$\epsilon$  - molarni ekstinkcijski koeficijent izražen u L/(mol×cm)

Stoga se aktivnost enzima (AE) PPO, izražena kao µmol/mg proteina, računa prema formuli [5].

$$AE = \frac{\Delta A \cdot 1000 \cdot V (\text{reakcijske smjese})}{\epsilon \cdot \gamma (\text{proteina}) \cdot V (\text{enzimskog ekstrakta})} \quad [5]$$

Gdje je:

$\epsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent koji je za *o*-kinon 1623 L/(mol×cm)

$\gamma(\text{proteini})$ - masena koncentracija proteina u enzimskom ekstraktu (mg/mL).

### 3.2.4.3. Određivanje aktivnosti peroksidaze

Aktivnost POX se određuje na 470 nm, a reakcijsku smjesu čini 2 mL supstrata, 500 µL enzimskog ekstrakta i 1 mL 4 mmol/L otopine vodikovog peroksida. Supstrat je 30 mmol/L otopina gvajakola u 50 mmol/L natrij-fosfatnom puferu (pH=6,2). Prvi korak pri određivanju aktivnosti je inkubacija supstrata i enzima 5 minuta, zatim se reakcijskoj smjesi dodaje 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ostavi da reagira još 2 minute te se nakon toga mjeri apsorbancija. Na isti način određuju se apsorbancije slijepih proba. Jednu slijepu probu čini 3 mL natrij fosfatnog pufera (pH=6,2) i 500 µL enzimskog ekstrakta, a drugu 2 mL supstrata, 500 µL otopine za ekstrakciju i 1 mL otopine vodikovog peroksida.

Aktivnost POX se definira se kao količina produkta (tetragvajakola) koju proizvede 1 mg proteina na temperaturi od 25 °C. Promjena apsorbancije računa se prema formuli [2], koncentracija produkta prema formuli [4], a AE POX, izražena kao µmol/mg proteina, računa se prema formuli [6],

$$AE = \frac{\Delta A \cdot V (\text{reakcijske smjese})}{\epsilon \cdot \gamma (\text{proteina}) \cdot V (\text{enzimskog ekstrakta})} \quad [6]$$

Gdje je:

$\epsilon$  – molarni ekstincijski koeficijent koji je za tetragvajakol 26,6 L/mmol×cm  
 $\gamma$ (proteini)- masena koncentracija proteina u enzimskom ekstraktu (mg/mL).

### 3.2.5. Određivanje enzimske aktivnosti lipoksigenaze

#### 3.2.5.1. Postupak izolacije lipoksigenaze

Izolacija enzima lipoksigenaze provodi se iz smrznutog maslinovog tijesta prema modificiranoj metodi Luaces i sur. (2005). U plastičnu kivetu od 50 mL izvaže se 5 grama smrznutog maslinovog tijesta i doda 20 mL otopine za ekstrakciju enzima. Otopina za ekstrakciju se priprema u 0,1 mol/L fosfatnom puferu (pH=6,7) dodatkom 0,1 % Triton X na volumen otopine, 1 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L PMSF, 0,1 mmol/L benzamida i 5 mmol/L D-norleucina. Ekstrakcija na homogenizatoru (GLH850, Omni International, Kennesow, SAD) se provodi u dva ciklusa po minutu s minutom pauze između ciklusa. Tokom ekstrakcije plastične kivete s uzorkom moraju biti uronjene u ledenu kupelj. Vakuum filtracija uzorka pomoću Buchnerovog lijevka se provodi kroz dva Miracloth filter papira (EMD Milipore Corp, Burlington, SAD) u plastičnu kivetu uronjenu u ledenu kupelj. Filtrat se centrifugira (Rotina

380, Hettich, Tuttlingen, Njemačka) na temperaturi od 4 °C na 27 000 g kroz 30 minuta. Supernatant se odvoji u plastičnu kivetu i stavi temperirati na 25 °C.

#### 3.2.5.2. Priprema supstrata, otopine $\alpha$ -linolenske kiseline (ALA)

Supstrat, 25 mmol/L otopina  $\alpha$ -linolenska kiselina, priprema se prema metodi Axelrod i sur. (1981) koristeći destiliranu vodu u koju se prethodno uvodi dušik. U 5 mL vode doda se 192  $\mu$ L  $\alpha$ -linolenske kiseline i 256  $\mu$ L Tween-40. Sadržaj se pažljivo miješa da se ne zapjeni, a otapanje emulzije pospješuje dodatak 600  $\mu$ L 1 mol/L natrijeva hidroksida. Odmjerna tikvica od 25 mL se nadopuni dušikom zasićenom vodom do oznake te se nakon miješanja otopina razdijeli u alikvote i skladišti na -80 °C.

#### 3.2.5.3. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze

Za određivanje ispitivanja aktivnosti LOX korištena je modificirana metoda iz doktorske disertacije Soldo (2016). Dodatkom 500  $\mu$ L supstrata u 500  $\mu$ L enzimskog ekstrakta otopljenog u 4 mL fosfatnog pufera (0,1 mol/L, pH=6,0) započinje sinteza hidroperoksida  $\alpha$ -linolenske masne kiseline (HPOT). Reakcija se provodi na magnetskoj miješalici (Ika Werke RTS- power, Staufen, Njemačka) 30 minuta pri temperaturi od 25 °C. Reakcija se potom prekida zakiseljavanjem smjese do pH=2 dodatkom 3 mol/L klorovodične kiseline.

Izolacija HPOT provodi se pomoću 10 mL otopine heksan:izopropanol u omjeru (95:5; V:V). Prije izolacije, zbog praćenja uspješnosti ekstrakcije hidroperoksida, u reakcijsku smjesu se doda 1 mL internog standarda, 0,25 mmol/L butilhidroksitoluena (BHT), otopljenog u heksanu. Smjesa se miješa na Vortex-u (LLG Labaware uniTexer, Njemačka) 30 sekundi. Nakon odvajanja faza, gornji sloj se odvoji, a ekstrakcija ponovi još 2 puta. Nakon treće ekstrakcije, smjesa se 10 minuta centrifugira na 3000 g (Rotina 380, Hettich).

Otapalo se upari pomoću rotacionog uparivača (Heidolph, Njemačka) do volumena od 2 mL. Uparavanje se provodi na temperaturi od 35 °C i tlaku od 200 mbara. Preostali volumen prebaci se u vijalice od 2 mL te otpari u struji dušika do suha. Označene i začepljene vijalice skladište se na temperaturi od -20 °C do HPLC analize.

Prije same analize na HPLC-u, suhi ostatak iz vijali se resuspendira u 1,5 mL smjese acetonitril/voda (2:1; V:V). Otapanje se pospješi kratkim uranjanjem vijalice u ultrazvučnu kupelj Bandelin sonorex digiplus (Bandelin electronic, Berlin, Germany). Za određivanje

nastalih hidroperoksida korišten je Agilent Technologies LC 1200 HPLC sustav (Santa Clara, SAD) na koji je instalirana C18 nepolarna kolona (Luna 250 mm × 4,6 mm, 5 μm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) temperirana na 35 °C. Kao mobilne faze korištene su 0,25 % otopina octene kiseline u vodi (mobilna faza A) i acetonitril (mobilna faza B) ukupnog protoka 1 mL/min kroz čitavo vrijeme trajanja analize, a korišteni gradijent prikazan je u tablici 2. U sustav je injektirano 10 μL pripremljenog uzorka hidroperoksida. Kromatogrami su snimljeni pomoću DAD detektora (Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, SAD) pri 234 nm uz širinu pojasa (bandwidth, BW) od 8 nm te korekciju pri referentnoj valnoj duljini od 350 nm, BW 50 nm. Čitavo vrijeme analize snimani su i UV spektri od 190 do 400 nm.

**Tablica 2.** Prikaz promjene gradijenta otapala B (acetonitril) u ovisnosti o vremenu

| Vrijeme<br>(min) | Volumni udio otopine B<br>(%) |
|------------------|-------------------------------|
| 0                | 63                            |
| 17               | 63                            |
| 20               | 80                            |
| 32               | 80                            |
| 35               | 63                            |
| 45               | 63                            |

Za identifikaciju hidroperoksida korišten je komercijalno dostupan standard 13(S)-hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienske kiseline (HPOT) koji je injektiran pod istim uvjetima kao i uzorci uz BHT kao interni standard (Slika 3). Množine formiranih hidroperoksida izražene u μmol izračunate su iz površina ispod pikova detektiranih hidroperoksida prema formulama [7] do [10], a AE izražena u μmol/mg izračunata je po formuli [11].

$$n(\text{HPOT}) = \frac{\sum A \cdot RRF_{\text{BHT/HPOT}} \cdot n_{\text{BHT}}}{A_{\text{BHT}}} \quad [7]$$

Gdje je:

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

$\sum A$  – suma površina ispod pikova hidroperoksida

$A_{\text{BHT}}$  - površina ispod pika BHT-a

$n_{\text{BHT}}$  – množina BHT-a ( $\mu\text{mol}$ ) dodanog u uzorak dodatkom 1 mL otopine internog standarda

$\text{RRF}_{\text{BHT/HPOT}}$  – korekcijski faktor za izražavanje rezultata preko hidroperoksida  $\alpha$ -linolenske masne kiseline (HPOT) (formula [8])

$$\text{RRF}_{\text{BHT/HPOT}} = \frac{\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT})}{\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{HPOT})} \quad [8]$$

Gdje je

$\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT})$  – faktor odziva BHT-a koji se računa po formuli [9]

$$\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{BHT}) = \frac{\text{površina pika BHT}}{\mu\text{mol injektiranog BHT}} \quad [9]$$

$\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{HPOT})$  - faktor odziva HPOT koji se računa po formuli [10]

$$\text{RF}_{1\mu\text{mol}}(\text{HPOT}) = \frac{\text{površina pika HPOT}}{\mu\text{mol injektiranog HPOT}} \quad [10]$$

$$\text{AE} = \frac{n(\text{HPOT})}{\gamma(\text{proteina}) \cdot V} \quad [11]$$

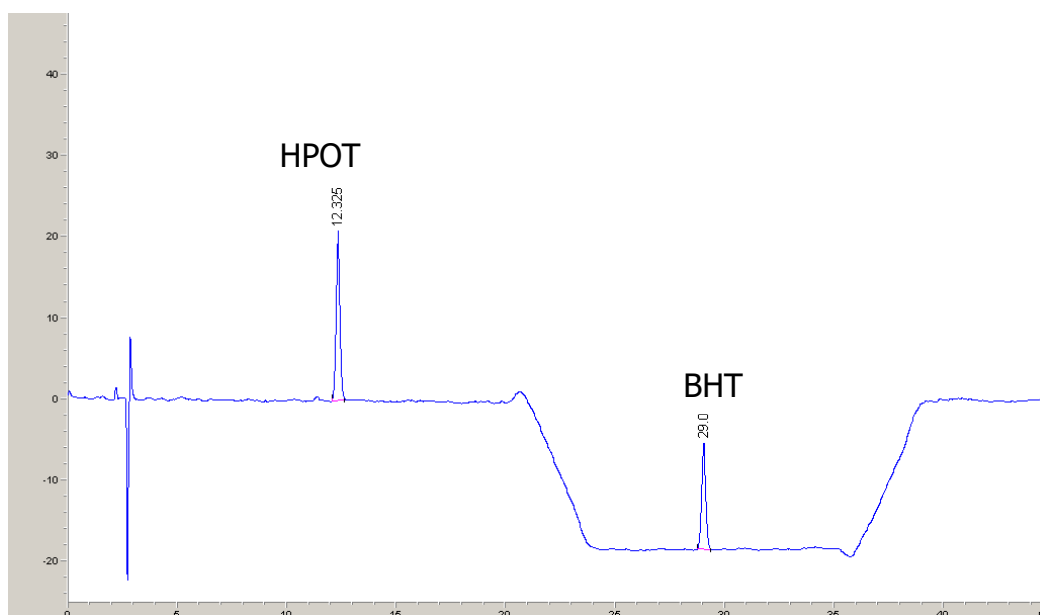
Gdje je:

AE – aktivnost enzima ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )

$n(\text{HPOT})$  – koncentracija nastalih hidroperoksida (mmol)

$\gamma(\text{proteina})$  – koncentracija proteina u otopini enzima ( $\text{mg}/\text{mL}$ )

V – volumen enzimskog ekstrakta korišten u reakciji (mL)



**Slika 3.** Kromatogram 13(S)-hidroperoksi-9(Z),11(E),15(Z)-oktadekatrienolne kiseline (HPOT) uz butilhidroksidtoluen (BHT) kao interni standard

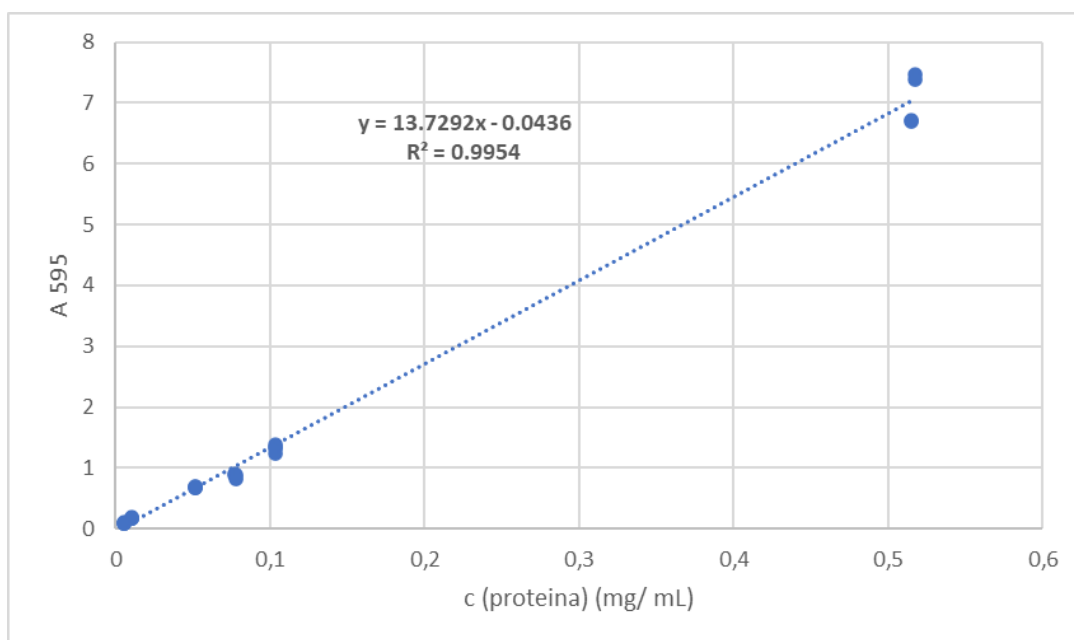


### 3.2.6. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Kako bi se aktivnost enzima mogla izraziti po količini izoliranih proteina u ekstraktima, svakom enzimskom ekstraktu kojem se određuje aktivnost mora se odrediti i koncentracija proteina metodom po Bradfordu prema metodi Bonjoch i Tamayo (2001).

U polimernu mikrokivetu doda se 0,3 mL otopine enzimskog ekstrakta i 1,2 mL Bradfordovog reagensa te se mikrokiveta poklopi i promiješa. Dodatak reagensa označava početak reakcije na sobnoj temperaturi. Nakon 5 minuta izmjeri se apsorbancija na 595 nm uz slijepu probu (0,3 mL otopine za ekstrakciju korištene za pojedini enzim i 1,2 mL Bradfordovog reagensa). Očitane apsorbancije trebaju biti u rasponu od 0,2 do 0,8. Za apsorbancije veće od gornje granice treba enzimski ekstrakt razrijediti i ponoviti mjerenje.

Baždarna krivulja za određivanje proteina u enzimskim ekstraktima pripremljena je pomoću standardne vodene otopina proteina albumina goveđeg seruma u rasponu koncentracija od 0,005 do 0,5 mg/mL (slika 4).



**Slika 4.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije ( $A_{595}$ ) o koncentraciji proteina ( $c$ )

Udio proteina u enzimskom ekstraktu računa se preko jednačbe baždarnog pravca [12],

$$c(\text{proteina}) = \frac{A + 0,0436}{13,7292} \quad [12]$$

Gdje je

A- apsorbancija pri 595 nm

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

### **3.3. OBRADA PODATAKA**

Kako bi se utvrdio utjecaj sorte i indeksa zrelosti te njihove interakcije korištena je dvosmjerna analiza varijance s ponovljenim mjerenjima, odnosno ANOVA *Two Factor With Replication* s razinom vjerojatnosti od 95 %. Osim toga, određene su i korelacije između indeksa zrelosti i aktivnosti enzima. Statistička obrada podataka provedena je u MS Excelu (Microsoft Corporation, 2019).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati istraživanja aktivnosti endogenih enzima u hrvatskim autohtonim sortama podijeljeni su u tri cjeline. U prvom potpoglavlju prikazani su rezultati utjecaja roka berbe na promjene indeksa zrelosti maslina sorti oblica, levantinka, istarska bjelica i rosulja. U drugom potpoglavlju prikazani su i raspravljani rezultati aktivnosti endogenih enzima istraživanih sorti u ovisnosti o stupnju zrelosti plodova. Rezultat aktivnosti enzima predstavlja srednju vrijednost četiriju paralelnih određivanja. U trećem dijelu prikazani su rezultati statističke obrade u kojoj su kao nezavisne varijable uzete sorta i indeks zrelosti te se pratio njihov pojedinačni utjecaj kao i njihova interakcija na aktivnosti endogenih enzima u ispitivanim hrvatskim sortama. Također, prikazana je i korelacija indeksa zrelosti i aktivnosti endogenih enzima, neovisno o sorti.

Za izolaciju endogenih enzima ( $\beta$ -glukozidaze, polifenol oksidaze i peroksidaze) korišteni su acetonski prahovi obzirom da Romero-Segura i sur. (2009) smatraju kako se upotreba acetonskog praha pokazuje vrlo korisnom za pročišćavanje proteina masline jer se uzorci proteina izoliraju bez pigmenata, fenola i lipida, koji inače ometaju daljnje korake pročišćavanja. Lipoksigenaza je izolirana direktno iz zamrznutog tijesta maslina prema metodi Luaces i sur. (2005) koja se pokazala kao najefikasnija u usporedbi s još pet metoda za izolaciju lipoksigenaze iz ploda masline (Soldo, 2016).

### 4.1. INDEKS ZRELOSTI MASLINA

U tablici 3. prikazani su indeksi zrelosti plodova autohtonih sorti maslina koje su korištene za ovo istraživanje, a izračunati su prema metodi objavljenoj u radu Uceda i Frias (1975). Iz prikazanih rezultata može se zaključiti kako u svim sortama indeks zrelosti linearno raste dozrijevanjem plodova. Uspoređujući dalmatinske sorte, vidljivo je da tijekom dozrijevanja brzina promjene pigmentacije plodova sorte oblice između rokova berba je sporija nego brzina promjene pigmentacije plodova levantinke. Obje sorte imaju sličan početni indeks zrelosti no, unutar tjedan dana razmaka, indeks zrelosti oblice povećao se za 1,07, a levantinke za 1,63. U sljedećih tjedan dana trend bržeg sazrijevanja levantinke je nastavljen te se između druge i treće berbe njezin indeks zrelost povećao za 2 dok se indeks zrelosti oblice povećao samo za 1,3. Brže sazrijevanje plodova levantinke u odnosu na plodove oblice pokazano je i u doktorskoj disertaciji Soldo (2016) u sve tri uzastopne godine istraživanja.

**Tablica 3.** Indeksi zrelosti za svaku pojedinu sortu po rokovima berbe

| <b>Sorte</b>            | <b>1. rok<br/>(28.10.2021.)</b> | <b>2.rok<br/>(2. i 3.11.2021.)</b> | <b>3.rok<br/>(9.11.2021.)</b> |
|-------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Oblica</b>           | 1,03                            | 2,10                               | 3,45                          |
| <b>Levantinka</b>       | 1,08                            | 2,71                               | 4,78                          |
| <b>Istarska bjelica</b> | 0,48                            | 2,11                               | 3,04                          |
| <b>Rosulja</b>          | 2,56                            | 2,89                               | 3,72                          |

U istarskim sortama brzina pigmentacije plodova razlikuje se od brzine pigmentacije dalmatinskih sorti (tablica 3.). Pokožica plodova rosulje u prvom roku berbe počinje poprimati ljubičaste tonove dok je pokožica istarske bjelice potpuno zelena. Obzirom da se bjelica navodi kao kasna sorta čiji plodovi na granama mogu ostati do kraja siječnja (Maslinar, 2022) niži indeks zrelosti u prvom roku berbe za razliku od ostalih sorti nije začuđujući. Povećanje indeksa zrelosti bjelice između prva dva roka berbe je za 1,6, a između drugog i trećeg približno 1. Prema ovim podacima brzina promjene pigmentacije plodova istarske bjelice je brža između prva dva roka berbe nego između drugog i trećeg. S druge strane, indeks zrelosti rosulje u prvom terminu berbe je značajno viši u odnosu na sve ostale sorte upućujući na to je ona rana sorta. Ipak, plodovi rosulje u praćenom periodu zriju značajno sporije od istarske bjelice, ali i od dalmatinskih sorti te je indeks zrelosti rosulje u trećem roku berbe usporediv s indeksom zrelosti oblice.

Iako su plodovi brani u isto vrijeme, indeksi zrelosti plodova međusobno se razlikuju kroz sorte, što je očekivano za sortno specifično svojstvo. Svrha računanja indeksa zrelosti je određivanje optimalnog vremena berbe plodova masline i time da dobiveno ulje ima zadovoljavajuću kvalitetu i prinos kao i aromu i oksidacijsku stabilnost (Mailer i sur., 2007).

## 4.2. AKTIVNOSTI ENDOGENIH ENZIMA

### 4.2.1. Aktivnost $\beta$ -glukozidaze

Obzirom da u eksperimentu aktivnost  $\beta$ -GLU nije detektirana u mnogim analiziranim uzorcima, rezultate nije bilo moguće statistički obraditi no, prikazani su u tablici 4. Tablica 4. prikazuje rezultate četiri paralelnih mjerenja za svaku sortu. Protokol Romero- Segura i sur. (2009) koji je korišten za izolaciju enzima iz acetonskih prahova pojedinih sorti u svim stupnjevima zrelosti nije funkcionirao. Razlog tome može biti manjak enzima prisutnih u ekstraktima zbog heterogenosti ploda masline, ali i ometanja drugih komponenti prilikom izolacije enzima.

**Tablica 4.** Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) u hrvatskim sortama prema rokovima berba

| Sorte                   | 1. rok    | 2.rok    | 3. rok   |
|-------------------------|-----------|----------|----------|
| <b>Oblica</b>           | IZ*= 1,03 | IZ= 2,10 | IZ= 3,45 |
|                         | n.d.**    | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
| <b>Levantinka</b>       | IZ= 1,08  | IZ= 2,71 | IZ= 4,78 |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
| <b>Istarska bjelica</b> | IZ= 0,48  | IZ= 2,11 | IZ= 3,04 |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
| <b>Rosulja</b>          | IZ= 2,56  | IZ= 2,89 | IZ= 3,72 |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |
|                         | n.d.      | n.d.     | n.d.     |

**Tablica 4.** Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) u hrvatskim sortama prema rokovima berba- *nastavak*

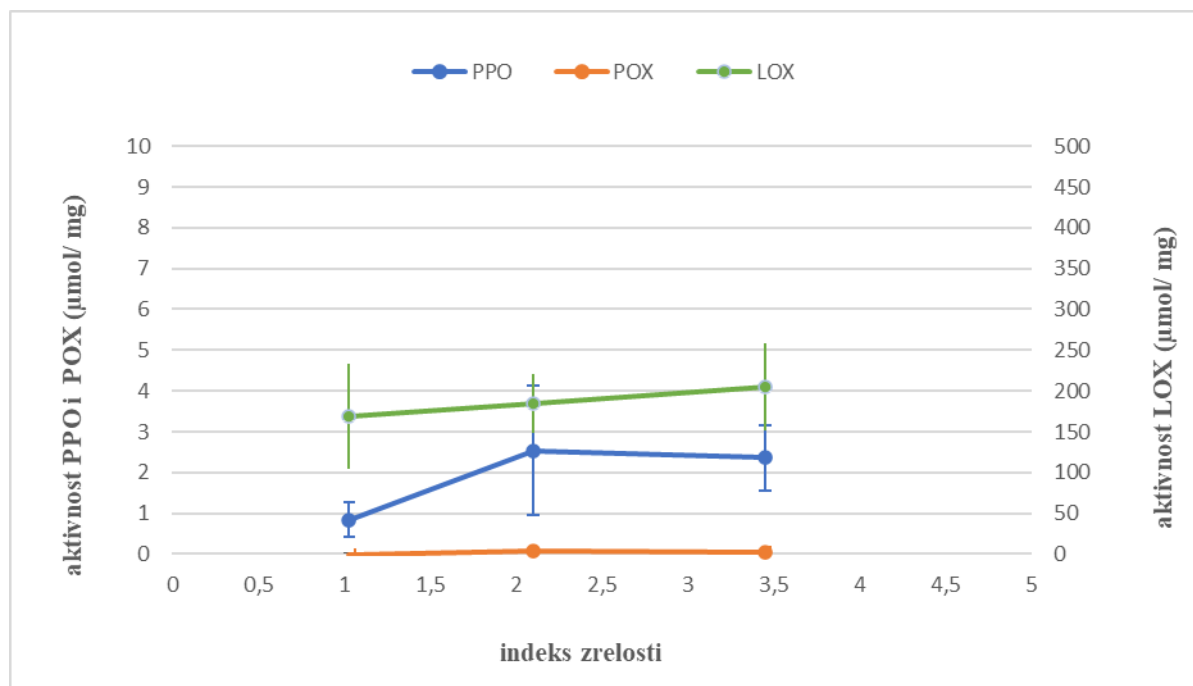
|  |      |      |      |
|--|------|------|------|
|  | n.d. | n.d. | n.d. |
|--|------|------|------|

\*IZ- indeks zrelosti

\*\* - n.d. -nije detektirana

Protokol koji se koristio za izolaciju  $\beta$ -GLU iz hrvatskih sorti potrebno je modificirati, usporediti s drugim protokolima izolacije enzima i ponovno testirati s drugačijim parametrima te provjeriti dolazi li do pozitivnih vrijednosti za aktivnost. Obzirom da se protokol Romero-Segura i sur. (2009) koristio u više istraživanja kao što su Hachicha Hbaieb i sur. (2017a; 2017b; 2015) i Velázquez-Palmero i sur. (2017) koji su izmjerili aktivnost  $\beta$ -GLU u različitim stupnjima zrelosti, protokol ne treba odbaciti već testirati na većem broju uzoraka i plodovima drugih sorti maslina. Osim toga, kao supstrat reakcije za određivanje aktivnosti  $\beta$ -GLU bi se mogao koristiti *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid. Također, mogla bi se koristiti osjetljivija metoda poput HPLC-a i testirati protokol prema Jemai i sur. (2009) koji su na taj način odredili aktivnost  $\beta$ -GLU tijekom sazrijevanja plodova sorte dhokar i kao supstrat reakcije koristili oleuropein koji i je primarni supstrat  $\beta$ -GLU u plodovima masline.

#### 4.2.2. Aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze u oblici



**Slika 5.** Aktivnost endogenih enzima (PPO-polifenol oksidaze; POX-peroksidaze; LOX-lipoksigenaze) izražena u  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteina u plodovima oblice različitih indeksa zrelosti

Prema slici 5. enzimsko aktivnost PPO u oblici raste od  $0,8362 \mu\text{mol}/\text{mg}$  proteina do maksimalne vrijednosti ( $2,5401 \mu\text{mol}/\text{mg}$  proteina) u srednjem stupnju zrelosti, a daljnjim sazrijevanjem aktivnost PPO se smanjuje. Trend porasta aktivnosti PPO do drugog stupnja zrelosti u oblici sličan je porastu aktivnosti PPO koji su zabilježili Hachicha Hbaieb i sur. (2017b) u plodovima sorti chemali i chetoui sa sličnim indeksima zrelosti od 0,6 do 1,6. S druge strane, isti su autori objavili da se u navedenim sortama, ali u drugoj godini uzgoja, aktivnost PPO kontinuirano smanjivala povećanjem indeksa zrenja (Hachicha Hbaieb i sur., 2017a). Stoga se može zaključiti kako aktivnost PPO ovisi i o uvjetima tijekom rasta, razvoja i zrenja samog ploda. Veću aktivnost PPO u plodovima sa nižim indeksom zrelosti nakon kojeg slijedi smanjenje aktivnosti PPO u kasnijim fazama zrelosti zabilježili su i García-Rodríguez i sur. (2011) u sorti picual.

Na slici 5. može se uočiti kako je aktivnost POX vrlo niska u svim stupnjevima zrelosti oblice dok u plodovima sa najnižim indeksom zrelosti nije ni detektirana. Obzirom da je aktivnost POX ograničena dostupnim  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji nastaje uslijed oštećenja tkiva ploda, može se reći kako su ubrani plodovi bili zdravi i neoštećeni te kako nije došlo do izražene auto-

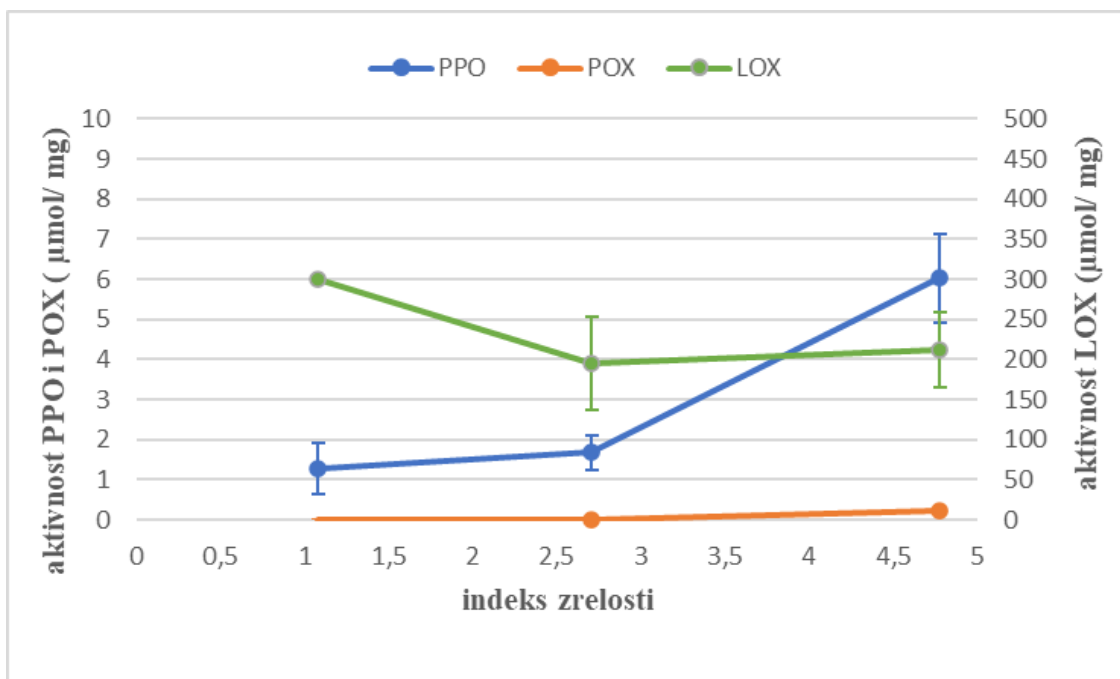
oksidacije (Gajhede, 2001). Kako je u istraživanju García-Rodríguez i sur. (2011) o utjecaju aktivnosti POX na formiranje fenolnih komponenti pokazano da je aktivnost POX izraženija u sjemenki masline, enzimske ekstrakte su pripremili isključivo od mljevenih koštica maslina i zabilježili sličan trend aktivnosti POX kao i u oblici. U plodovima s najnižim stupnjem zrelosti izmjerena je najmanja aktivnost POX koja onda raste s porastom stupnja zrelosti dok ne dosegne maksimum nakon kojeg se aktivnost smanjuje daljnjim dozrijevanjem. Isti trend aktivnosti zabilježen je u sorti oueslati (Hachicha Hbaieb i sur., 2022).

Sazrijevanjem plodova oblice aktivnost LOX se linearno povećava (slika 5.), a isti trend porasta aktivnosti LOX je uočen u istraživanju Soldo (2016) u sve tri godine istraživanja (2013., 2014. i 2015.). Iako su izmjerene vrijednosti za aktivnost LOX slične u različitim stupnjevima zrelosti, najveća izmjerena je u najzrelijim plodovima što je suprotno onome što se navodi u literaturi za druge sorte. Rezultati Salas i sur. (1999) koji su mjerili aktivnost LOX u sorti picual u različitim fazama razvoja i sazrijevanja plodova su pokazali visoku aktivnost LOX u ranim fazama razvoja, a zatim stabilno smanjenje u sljedećih 14 tjedana ispitivanja. Slični rezultati zabilježeni su i u rajčici i papru te impliciraju presudnu ulogu LOX u fiziološkom odgovor na stres u ranim fazama razvoja ploda (Clodoveo i sur., 2014).

#### 4.2.3. Aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze u levantinki

U 1. roku berbe indeksi zrelosti oblice i levantinke su veoma slični ( IZ oblice iznosi 1,03, a IZ levantinke 1,08), a izmjerena aktivnost PPO u tom stupnju zrelosti za oblicu iznosi 0,8362 $\mu$ mol/ mg proteina dok za levantinku 1,2808 $\mu$ mol/ mg proteina i obje aktivnosti blago rastu do drugog stupnja zrelosti. No, za razliku od aktivnosti PPO u oblici koja pokazuje blagi pad dodatnim povećanjem IZ kod levantinke je zabilježen značajan porast. Takav porast u aktivnosti PPO u zrelijim plodovima sa IZ od 3,0 do 3,7 za sortu chetoui i u plodovima sorte chemali sa IZ od 4,0 do 4,5 izmjerili su Hachicha Hbaieb i sur. (2017b). S druge strane, prema slici 6. u levantinki dozrijevanjem plodova aktivnost PPO raste pa je trend aktivnosti PPO suprotan onom u tuniškim sortama chemali i chetoui u kojima je najveća aktivnost izmjerena u plodovima sa IZ= 0,5-1 (Hachicha Hbaieb i sur., 2017a). Isti trend smanjivanja aktivnosti PPO porastom indeksa zrelosti plodova je zabilježen u sorti oueslati (Hachicha Hbaieb i sur., 2022). Nadalje, aktivnosti PPO u sortama manzanilla i morisca se smanjuje od indeksa zrelosti 0-1 do indeksa zrelosti plodova 3-4, 2011. godine (Sainz i sur., 2019) kao i u sorti picual koju su mjerili Ortega- García i sur. (2008) i Cirilli i sur. (2017) u sorti frantoio. To pokazuje kako je aktivnost PPO sortna karakteristika (Clodoveo i sur., 2014).





**Slika 6.** Aktivnost endogenih enzima (PPO-polifenol oksidaze; POX-peroksidaze; LOX-lipoksigenaze) izražena u  $\mu\text{mol/mg}$  proteina u plodovima levantinke različitih indeksa zrelosti

Aktivnost POX je kao i kod oblice, u ovoj dalmatinskoj sorti nižih vrijednosti u odnosu na aktivnosti ostalih endogenih enzima i također nije detektirana u najranijem stupnju zrelosti. Također, može se uočiti kako je u najzrelijem plodovima s  $IZ = 4,78$  izmjerena aktivnost POX viša nego u najzrelijim plodovima oblice s  $IZ = 3,45$ . Ti rezultati nisu skladu s rezultatima istraživanja Hachicha Hbaieb i sur. (2022) u kojem nakon proporcionalnog povećanja aktivnosti POX povećanjem indeksa zrelosti, u plodovima sa  $IZ = 3,9$  se aktivnost POX smanjuje.

Najveća aktivnost LOX odgovara najnižem indeksu zrelosti levantinke što se poklapa s mjerenjima Salas i sur. (1999) i činjenicom da je ta visoka aktivnost LOX fiziološki odgovor stanice na stres u ranim razvojem ploda (Clodoveo i sur. 2014). No, ovi su rezultati u suprotnosti s već objavljenima za aktivnosti LOX u plodovima sorte levantinka iz prijašnjih godina (Soldo, 2016). Rezultati toga istraživanja pokazuju kako aktivnost LOX u levantinki slijedi isti trend kao i kod oblice, odnosno da raste povećanjem stupnja zrelosti plodova. Iako je aktivnost LOX u plodovima oblice i levantinke najnižeg indeksa zrelosti značajno različita (slika 5. i 6.), aktivnost LOX u obje sorte raste od drugog do trećeg stupnja zrelosti.

Uzevši u obzir rezultate aktivnosti istraživanih endogenih enzima prikazanih na slikama 5. i 6., moglo bi se preporučiti da se berba i prerada plodova ovih dalmatinskih sorti započne

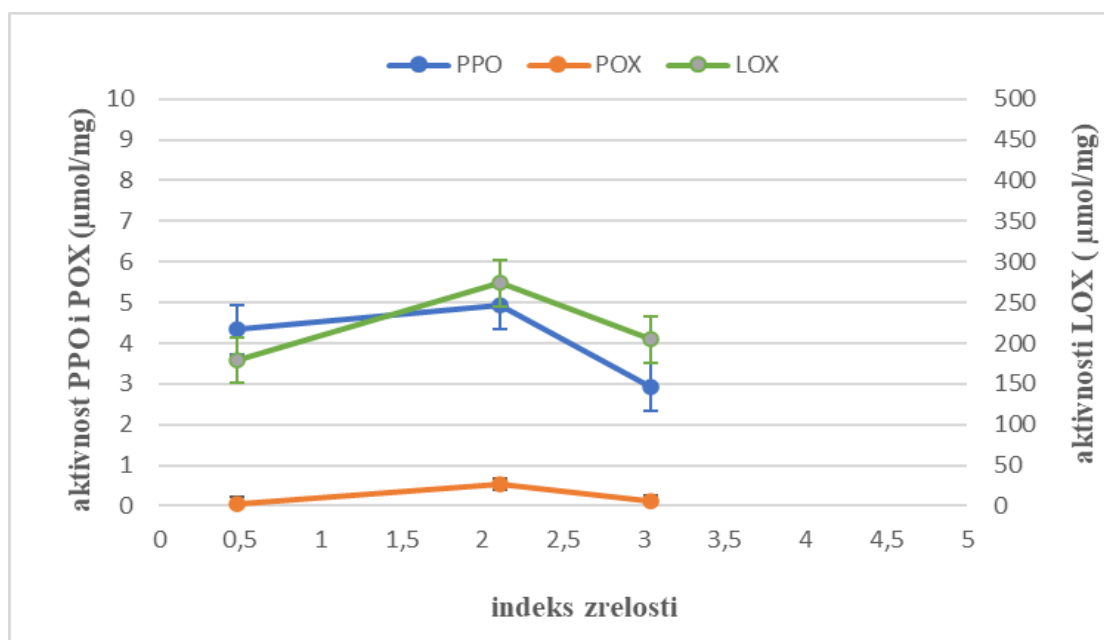
kada je indeks zrelosti plodova oko 1. Razlog tome je niska aktivnost PPO u odnosu na plodove s višim indeksima zrelosti, a aktivnost POX nije ni detektirana. Osim toga, u oblici je porast aktivnosti LOX dozrijevanjem plodova minimalan, a u levantinki je aktivnost LOX u prvom stupnju zrelosti najveća što bi moglo pozitivno utjecati na senzorske karakteristike proizvedenog djevičanskog maslinovog ulja.

#### 4.2.4. Aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze u istarskoj bjelici

Aktivnosti svih endogenih enzima u plodovima istarske bjelice prate isti trend tijekom promatranog perioda zrenja plodova (slika 7.). Izmjerene vrijednosti aktivnosti endogenih enzima rastu u prvoj fazi sazrijevanja plodova, odnosno porastom indeksa zrelosti od 0,48 do 2,11 pri kojem su izmjerene maksimalne vrijednosti aktivnosti svih enzima, a njihova se aktivnost smanjuje daljnjim povećanjem indeksa zrelosti do vrijednosti 3,04. Trend aktivnosti PPO tijekom sazrijevanja plodova isti je kao i u oblici, no vrijednosti aktivnosti PPO su u ovoj istarskoj sorti više.

Aktivnost POX raste u plodovima do srednjeg stupnja zrelosti (slika 7.), a potom se aktivnost smanjuje što su slično zabilježili Sainz i sur. (2019) u sortama manzanilla i morisca kao i Hachicha Hbaieb i sur. (2017a, 2022) u sorti chemali i oueslati te García-Rodríguez i sur. (2011) u sortama arbequina i picual.

Aktivnost LOX pokazuje drugačiji trend u odnosu na aktivnost LOX u dalmatinskim sortama istraživanim u ovom radu, oblici i levantinki. Najviši porast aktivnosti LOX u istarskoj bjelici zabilježen je porastom indeksa zrelosti na 2,11 (slika 7.). Palmieri-Thiers i sur. (2009) su zaključili da se aktivnost LOX povećava do indeksa zrelosti 2,0-2,5, odnosno kada se boja ploda mijenja iz zelene u crveno-ljubičastu. Smanjenje aktivnosti LOX dodatnim povećanjem indeksa zrelosti plodova sličan je kao i u sorti farge (Criado i sur., 2006).

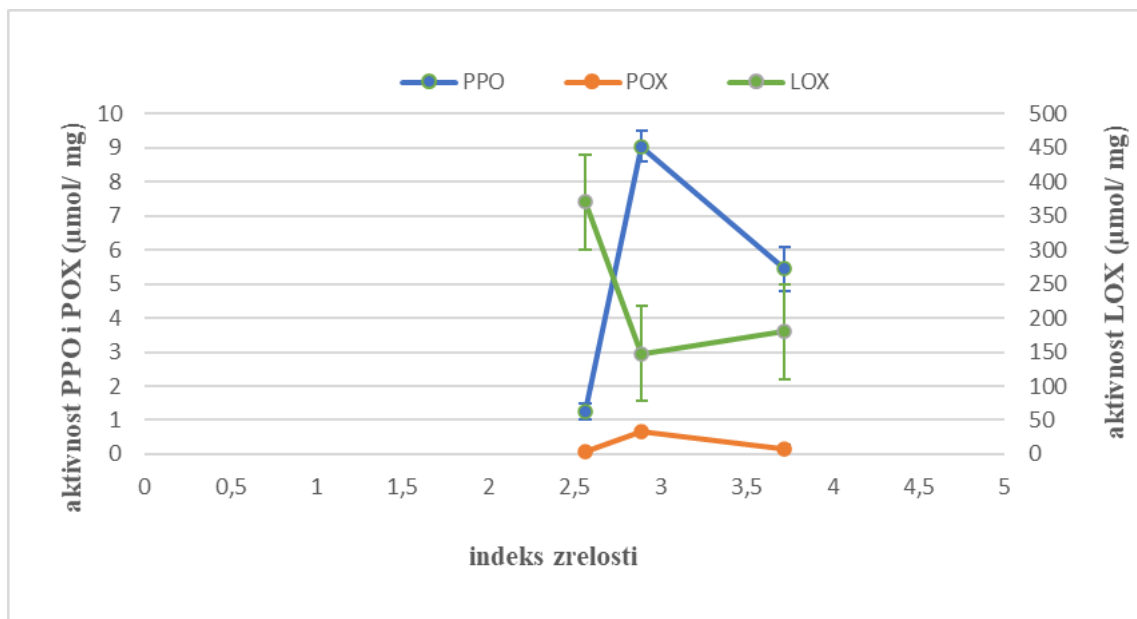


**Slika 7.** Aktivnost endogenih enzima (PPO-polifenol oksidaze; POX-peroksidaze; LOX-lipoksigenaze) izražena u  $\mu\text{mol/mg}$  proteina u plodovima istarske bjelice različitih indeksa zrelosti

Kako bi se očuvala oksidacijska stabilnost ulja kao i antioksidacijske komponente, a ulje se želi obogatiti voćnim i zelenim mirisnim notama moglo bi se preporučiti da se prerada plodova istarske bjelice provode u kasnijem stupnju zrelosti kada je indeks zrelosti oko 3 jer su tada aktivnosti PPO i POX niže, a aktivnost LOX malo viša nego u prvom stupnju zrelosti.

#### 4.2.5. Aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze u rosulji

Između prva dva roka berbe rosulje razlika u izračunatom indeksu zrelosti je najmanja (tablica 3.), ali je zato razlika u enzimskoj aktivnosti PPO najveća (slika 8.). Maksimum aktivnosti PPO je pri indeksu zrelosti 2,56 i izmjerena vrijednost aktivnosti PPO je najveća u odnosu na vrijednosti aktivnosti PPO u ostalim istraživanim sortama. Mjerenje aktivnosti PPO bi trebalo ponoviti u sljedećih par godina kako bi se provjerilo ponavlja li se ovaj trend i doseže li se aktivnost PPO u tom stupnju zrelosti ploda zaista tu vrijednost i ako da pripisati ju sortnoj karakteristici rosulje. Takav veliki porast u aktivnosti PPO zabilježili su Hachicha Hbaieb i sur. (2017b) u kasnijem stupnju zrelosti (3,7) sorte chetoui.



**Slika 8.** Aktivnost endogenih enzima (PPO-polifenol oksidaze; POX-peroksidaze; LOX-lipoksigenaze) izražena u  $\mu\text{mol/mg}$  proteina u plodovima rosulje različitih indeksa zrelosti

Kao i u preostalim istraživanim hrvatskim sortama, aktivnost POX je najniža u usporedbi s aktivnosti ostala dva endogena enzima (slika 8.). Od sve 4 istraživane sorte u ovom diplomskom radu jedino je u rosulji zabilježena pozitivna vrijednost aktivnosti POX u najranijem stupnju zrelosti plodova. No razlog tome može se pronaći u značajno višem indeksu zrelosti rosulje u prvom roku berbe (2,56) u odnosu na ostale istraživane sorte ( $\text{IZ} \leq 1$ ). Najveća aktivnost POX je izmjerena u drugom stupnju zrelosti rosulje kada je  $\text{IZ} = 2,89$  što je slično izmjereno u chetoui plodovima sa indeksom zrelosti oko 3 (Hachicha Hbaieb i sur., 2017a). Nakon dosegnutog maksimuma, aktivnost POX se u rosulji smanjuje kao i u sorti picual (García-Rodríguez i sur., 2011; Hachicha Hbaieb i sur., 2015). Obzirom da je maksimum aktivnosti PPO i POX u plodovima srednjeg stupnja zrelosti i da te dvije oksidoreduktaze djeluju sinergijski, stupanj oksidacije fenolnih komponenti bi bio značajan i ulje proizvedeno od takvih plodova moglo bi imati nižu vrijednost oksidacijske stabilnosti te narušenih organoleptičkih svojstva.

LOX ima najveću aktivnost u najnižem izmjenom indeksu zrelosti i aktivnost se do drugog stupnja zrelosti ( $\text{IZ} = 2,89$ ) smanjila. Kao i kod levantinke u ovom istraživanju i arbequine u istraživanju Criado i sur. (2006), u plodovima rosulje daljnjim dozrijevanjem ( $\text{IZ} = 3,72$ ) je zabilježen blagi porast aktivnosti LOX. Salas i sur. (1999) su zabilježili maksimalnu vrijednost aktivnosti LOX-a u 13. tjednu od oprašivanja pa se daljnjim dozrijevanjem ploda

aktivnost smanjivala da bi u periodu zriobe od 30. do 35. tjedna ponovno zabilježili blagi porast. Ovaj ponovni porast enzimske aktivnosti LOX kao i porast zabilježen u istraživanju Salas i sur. (1999) se ne slaže sa mjerenjima i rezultatima istraživanja Kalua i sur. (2007) koji govore kako se enzimska aktivnost LOX smanjuje sazrijevanjem plodova uslijed degradacije enzima.

Prema rezultatima prikazanim na slikama 7. i 8. moglo bi se preporučiti da branje i prerada istarske bjelice bude u kasnijem stupnju zrelosti plodova, a rosulje u ranijem stupnju. Vrijednosti aktivnosti oksidoreduktaza u tim stupnjevima su niže, a vrijednosti aktivnosti lipoksigenaze više nego u drugim stupnjevima zrelost što je optimalno da konačan proizvod bude odgovarajućih senzorskih karakteristika. Naravno, mjerenje treba ponoviti kroz više godina i provjeriti trend aktivnost endogenih enzima tijekom dozrijevanja plodova istarskih sorti.

### 4.3. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE

Ukoliko se želi utvrditi postoji li statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina većeg broja primjenjuje se analiza varijance. Dvosmjerna analiza varijance (two way ANOVA) je statistička metoda koja se koristi ukoliko se želi promatrati utjecaj dvije nezavisne varijable na vrijednost zavisne kao i međusobnu interakciju promatranih faktora na zavisnu varijablu. Ukoliko se testira utjecaj nezavisnih varijabli na promjenu zavisne varijable prethodno se postavljaju hipoteze: 1. *Nulta hipoteza* koja kaže da nema jakih statističkih dokaza da su razlike značajne, 2. *Alternativna hipoteza* koja kaže da su razlike statistički značajne. Za prihvatanje i odbijanje hipoteza prati se p- vrijednost. Što je p-vrijednost manja, to je veća vrijednost da je razlika značajna i ukoliko je njena vrijednost manja od 0,05 odbacuje se nulta hipoteza i prihvaća alternativna. Zaključak analize je da u 95 % pouzdanosti razlika među promatranim vrijednostima je statistički značajna (Papić, 2014).

Složena odnosno dvosmjerna ANOVA daje odgovor na 3 pitanja:

1. Postoji li statistički značajan utjecaj 1. faktora na zavisnu varijablu i pritom zanemarujući mogući utjecaj 2. faktora?
2. Postoji li statistički značajan utjecaj 2. faktora na zavisnu varijablu i pritom zanemarujući mogući utjecaj 1. faktora?
3. Utječu li "istovremene" promjene u oba faktora statistički značajno na

promjenu zavisne varijable?

Nezavisne varijable su sorta i indeks zrelosti te se dvosmjernom analizom varijance želi pokazati njihov utjecaj na aktivnost endogenih enzima hrvatskih sorti maslina, pojedinačno i istovremeno.

#### 4.3.1. Utjecaj sorte i indeksa zrelosti na aktivnost polifenol oksidaze

Rezultati ANOVA testa o utjecaju istraživanih varijabli, sorte i indeksa zrelosti, na aktivnost PPO prikazana je u tablici 5. te se može uočiti kako je p-vrijednost za sortu manja od 0,05 što znači da postoji statistički značajni utjecaj sorte na aktivnost PPO, pritom zanemarujući mogući utjecaj indeksa zrelosti. Nadalje, p-vrijednost za indeks zrelosti također iznosi manje od 0,05 što znači da postoji statistički značajan utjecaj indeksa zrelosti na aktivnost PPO. Također, prema tablici 5. može se uočiti kako je i p- vrijednost za interakciju manja od 0,05 dakle, i u ovom slučaju se nulta hipoteza može odbaciti i prihvatiti alternativna. Drugim riječima, utjecaj "istovremene" promjene u sorti i indeksu zrelosti statistički značajno utječe na promjenu aktivnosti PPO.

**Tablica 5.** Prikaz rezultata dvosmjerene ANOVA-e o utjecaju istraživanih varijabli, sorte i indeksa zrelosti, kao i njihove interakcije na aktivnost polifenol oksidaze

| <i>Izvor varijabilnosti</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-vrijednost</i> | <i>F krit</i> |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|---------------------|---------------|
| <b>Sorta</b>                | 73,56564  | 3         | 24,52188  | 38,30167 | <0,001              | 2,866266      |
| <b>Indeks zrelosti</b>      | 64,74291  | 2         | 32,37146  | 50,56222 | <0,001              | 3,259446      |
| <b>Interakcija</b>          | 128,0501  | 6         | 21,34168  | 33,3344  | <0,001              | 2,363751      |
| <b>Unutar</b>               | 23,04828  | 36        | 0,64023   |          |                     |               |
|                             |           |           |           |          |                     |               |
| <b>Ukupno</b>               | 289,4069  | 47        |           |          |                     |               |

#### 4.3.2. Utjecaj sorte i indeksa zrelosti na aktivnost peroksidaze

Rezultati ANOVA testa o utjecaju istraživanih varijabli, sorte i indeksa zrelosti, na aktivnost POX prikazana je u tablici 6. i prema njoj obje varijable imaju značajan utjecaj na aktivnost

POX. P- vrijednosti obje nezavisne varijable manja je od 0,05 stoga se nulta hipoteza odbacuje i prihvaća alternativna prema kojoj postoji statistički značaj utjecaja sorte i indeksa zrelosti na aktivnost POX. Također, prema tablici 6. može se uočiti kako postoji statistički značajna interakcija sorte i indeksa zrelosti na aktivnost POX.

**Tablica 6.** Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA o utjecaju istraživanih varijabli, sorte i indeksa zrelosti, kao i njihove interakcije na aktivnost peroksidazu

| <i>Izvor varijabilnosti</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i>   | <i>F</i> | <i>P- vrijednost</i> | <i>F krit</i> |
|-----------------------------|-----------|-----------|-------------|----------|----------------------|---------------|
| <b>Sorta</b>                | 0,559212  | 3         | 0,186403874 | 152,3085 | <0,001               | 2,866266      |
| <b>Indeks zrelosti</b>      | 0,700188  | 2         | 0,35009387  | 286,0578 | <0,001               | 3,259446      |
| <b>Interakcija</b>          | 0,835207  | 6         | 0,139201108 | 113,7397 | <0,001               | 2,363751      |
| <b>Unutar</b>               | 0,044059  | 36        | 0,001223857 |          |                      |               |
|                             |           |           |             |          |                      |               |
| <b>Ukupno</b>               | 2,138665  | 47        |             |          |                      |               |

#### 4.3.3. Utjecaj sorte i indeksa zrelosti na aktivnost lipoksigenaze

P- vrijednost prve varijable, sorte, je veća od 0,05 (tablica 7.) što znači da se prihvaća nulta hipoteza, odnosno može se zaključiti kako testirana razlika nije statistički značajna. Dakle, ne postoji statistički značajan utjecaj sorti ispitivanih u ovom radu na aktivnost LOX. P- vrijednost druge varijable, indeksa zrelosti je manja od 0,05 što znači da postoji statistički značajan utjecaj indeksa zrelosti na aktivnost LOX u hrvatskim sortama maslina. Ipak, p- vrijednosti indeksa zrelosti na aktivnost LOX u usporedbi sa p- vrijednostima indeksa zrelosti na aktivnost PPO i POX (tablica 5., 6.) je veća, što znači da je manja vjerojatnost da je razlika značajna.

Interakcija dva faktora na promjenu aktivnosti LOX prema tablici 7. i p- vrijednosti je statistički značajna.

**Tablica 7.** Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA utjecaju istraživanih varijabli, sorte i indeksa zrelosti, kao i njihove interakcije na aktivnost lipoksigenaze

| <i>Izvor varijabilnosti</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-vrijednost</i> | <i>F krit</i> |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|---------------------|---------------|
| <b>Sorta</b>                | 10202,94  | 3         | 3400,978  | 2,37347  | 0,12141973          | 3,490295      |
| <b>Indeks zrelosti</b>      | 15885,95  | 2         | 7942,973  | 5,54323  | 0,01972166          | 3,885294      |
| <b>Interakcija</b>          | 65248,08  | 6         | 10874,68  | 7,589205 | 0,00155596          | 2,99612       |
| <b>Unutar</b>               | 17194,97  | 12        | 1432,914  |          |                     |               |
|                             |           |           |           |          |                     |               |
| <b>Ukupno</b>               | 108531,9  | 23        |           |          |                     |               |

#### 4.3.4. Korelacije između aktivnosti enzima i indeksa zrelosti

Korelacijska analiza utvrđuje brožčani pokazatelj jakosti i smjera veze između varijabli računajući tzv. koeficijent korelacije. Pozitivna vrijednost koeficijenta korelacije ukazuje na proporcionalnu vrijednost varijabli x i y, odnosno da rast jedne varijable uzrokuje rast druge i obrnuto. Negativna vrijednost koeficijenta ukazuje na obrnutu proporcionalnost varijabli, tj. da rast jedne varijable uzrokuje pad druge i obrnuto (Papić, 2014). U tablici 8. prikazana je jačina povezanosti između varijabli.

**Tablica 8.** Jačina povezanosti između varijabli ovisno o apsolutnoj vrijednosti koeficijenta korelacije (Papić, 2014)

| <b>Apsolutna vrijednost koeficijenta korelacije</b> | <b>Jačina povezanosti između varijabli</b> |
|---|--|
| $ r^*  = 1$   | potpuna korelacija                         |
| $0,8 \leq  r  < 1$                                  | jaka korelacija                            |
| $0,5 \leq  r  < 0,8$                                | srednje jaka korelacija                    |
| $0,2 \leq  r  < 0,5$                                | relativno slaba korelacija                 |
| $0 \leq  r  < 0,2$                                  | slaba korelacija                           |
| $ r  = 0$   | nema korelacije                            |

\*r- oznaka za koeficijent korelacije



**Tablica 9.** Prikaz koeficijena korelacije srednjih vrijednosti aktivnosti endogenih enzima u plodovima svih sorti i u svim stupnjevima zrelosti

| Aktivnost endogenih enzima | Koeficijenti korelacije |
|----------------------------|-------------------------|
| <b>Polifenol oksidaza</b>  | 0,41                    |
| <b>Peroksidaza</b>         | 0,27                    |
| <b>Lipoksigenaza</b>       | -0,19                   |

Za izračun korelacije indeksa zrelosti (neovisno o sorti) i srednje vrijednosti aktivnosti endogenih enzima izračunati su Pearsonovi koeficijenti linearne korelacije (tablica 9.). Ova analiza provedena je zbog činjenice da sve analizirane sorte dozrijevaju različitim brzinama, i cilj je bio utvrditi može li se aktivnost enzima direktno povezati s indeksom zrelosti, bez obzira na sortu. Uspoređujući rezultate iz tablice 9. s jačinama korelacije prikazanim u tablici 8. može se reći kako postoji relativno slaba korelacija indeksa zrelosti s aktivnost PPO i POX u svim hrvatskim sortama. Razlog relativno slabim korelacijama može se pronaći u činjenici kako je aktivnost ta dva enzima, velikim dijelom uvjetovana sortom (tablica 5. i 6.), te enzimi ne pokazuju isti trend promjene s indeksom zrelosti u svim sortama (slike 5.-8.). Koeficijenti korelacije ta dva enzima su pozitivne vrijednosti što znači da povećanjem indeksa zrelosti dolazi do povećane aktivnost PPO i POX. S druge strane, koeficijent korelacije za LOX govori o negativnoj slaboj korelaciji između indeksa zrelosti i aktivnosti LOX odnosno postoji slab linearan odnos između indeksa zrelosti i aktivnosti enzima. Iako se u slučaju LOX pokazalo kako sorta nema značajan utjecaj na aktivnost enzima (tablica 7.) koeficijent korelacija indeksa zrelosti i aktivnosti enzima izrazito je niski zbog različitih trendova promijene aktivnosti LOX s dozrijevanjem plodova (slike 5.-8.).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze nije detektirana zbog čega nije bilo moguće utvrditi utjecaj sorte i indeksa zrelosti na njenu aktivnost.
2. U plodovima oblice aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze raste do srednjeg stupnja zrelosti plodova nakon čega se aktivnost tih enzima smanjuje daljnjim sazrijevanjem plodova. Aktivnost lipoksigenaze blago raste porastom indeksa zrelosti plodova.
3. Aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze u levantinki raste povećanjem indeksa zrelosti. Taj porast aktivnosti daljnjim dozrijevanjem je blag za peroksidazu međutim nagao za polifenol oksidazu. S druge strane, aktivnost lipoksigenaze se smanjuje do drugog stupnja zrelosti, ali također raste u plodovima s najvišim indeksom zrelosti.
4. Aktivnosti polifenol oksidaze, peroksidaze i lipoksigenaze izmjerene u plodovima istarske bjelice prate isti trend, blago rastu do drugog stupnja zrelosti plodova i potom se blago smanjuju.
5. Između prva dva stupnja zrelosti plodova rosulje aktivnost polifenol oksidaze i peroksidaze raste, ali taj porast aktivnosti kao i izmjerene vrijednosti su puno veće za polifenol oksidazu. Maksimalna aktivnost lipoksigenaze izmjerena je u prvom stupnju zrelosti plodova pa se smanjuje do drugog stupnja i potom ponovno blago raste.
6. Postoji statistički značajan utjecaj indeksa zrelosti kao i utjecaja interakcije sorte i indeksa zrelosti na aktivnost sva 3 enzima. Sorta ima statistički značaj utjecaj samo na polifenol oksidazu i peroksidazu.
7. Istraživanje treba ponoviti i vidjeti ponavlja li se sličan trend aktivnosti endogenih enzima. Prema ovom istraživanju oblica, levantinka i rosulja bi se trebale brati u ranom stupnju, a istarska bjelica u zadnjem stupnju zrelosti. Tada su aktivnosti polifenol oksidaze i peroksidaze najniže, a lipoksigenaze relativno visoke i dozrijevanjem se smanjuju.

## 6. LITERATURA

Agroklub (2021) Buža- bujna, ali osjetljiva istarska sorta. Agroklub.<https://www.agroklub.com/vocarstvo/buza-bujna-ali-osjetljiva-istarska-sorta/68582/>  
Pristupljeno 08.veljače 2023

AgroPortal (2019) Leccino- najraširenija sort na svijetu. AgroPortal.hr.  
<https://www.agroportal.hr/maslinarstvo/25335> Pristupljeno 08.veljače 2023.

Amirante P, Clodoveo ML, Leone A, Tamborrino A, Paice A (2010) Influence of the crushing system: phenol content in virgin olive oil produced from whole and de-stoned pastes. U: Preedy VR, Watson RR (ured.) *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Academic Press Ltd, Elsevier Science Ltd. London, Engleska, str. 69–76

Amirante P, Clodoveo ML, Dugo G, Leone A, Tamborrino A (2006) Advance technology in virgin olive oil production from traditional and de-stoned pastes: influence of the introduction of A, heat exchanger on oil quality. *Food Chem* **98**(4), 797–805.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.040>

Angerosa F, Basti C (2003). The volatile composition of samples from the blend of monovarietal olive oils from the processing of mixtures of olive fruits. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 327–332. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390069>

Angerosa F (2002) Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur J Lipid Sci Tech* **104**(9–10), 639–60.  
[https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<639::AID-EJLT639>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<639::AID-EJLT639>3.0.CO;2-U)

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)

Artajo LS, Romero MP, Motilva MJ (2006) Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit. *J Sci Food Agric* **86**(4), 518-527.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2384>

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

- Beltrán G, Del Río C, Sánchez S, Martínez L (2004) Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process. *J Sci Food Agric* **84**,1783–1790.
- Braidot E, Petrusa E, Micolini S, Tubaro F, Vianello A, Macri F (2004) Biochemical and immunochemical evidences for the presence of lipoxygenase in plant mitochondria. *J Exp Bot* **55**, 1655-1622. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh197>
- Bonjoch NP, Tamayo PR (2001) Protein Content Quantification by Bradford Method.U: Handbook of Plant Ecophysiology Techniques [online] Reigosa Roger MJ (ured.), Springer, Dodrecht, str. 283-295.
- Chazarra S, García-Carmona F, Cabanes J (2001) Hysteresis and Positive Cooperativity of Iceberg Lettuce Polyphenol Oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **289**(3), 769-775. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6014>
- Cirilli M, Caruso G, Gennai C, Urbani S, Frioni E, Ruzzi M i sur. (2017) The role of polyphenoloxidase, peroxidase, and  $\beta$ -glucosidase in phenolics accumulation in *Olea europea* L. Fruits under different water regimes. *Front Plant Sci* **8**: 717. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00717>
- Clodoveo ML, Hbaieb RH, Kotti F, Mugnozza GS, Gargouri M (2014) Mechanical Strategies to Increase Nutritional and Sensory Quality of Virgin Olive Oil by Modulating the Endogenous Enzyme Activities. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **13**(2) 135-154. doi: 10.1111/1541-4337.12054
- Criado MN, Motilva MJ, Ramo T, Romero MP (2006) Chlorophyll and carotenoid profile and enzymatic activities (chlorophyllase and lipoxygenase) in olive drupes from the fruit-setting period to harvest time. *J Am Soc Hortic Sci* **131**, 593–600. <https://doi.org/10.21273/JASHS.131.5.593>
- Conte P, Squeo G, Difonzo G, Caponio F, Fadda C, Del Caro A i sur. (2018) Change in quality during ripening of olive fruits and related oils extracted from three minor autochthonous Sardinian cultivars. *Emir J Food Agric* **31**(3), 196-205. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i3.1923>
- Ertürk Kara H, Sinan S, Turan Y (2011) Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *J Chromatogr B* **879**(19), 1507-1512. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.036>

Gajhede M (2001) Plant peroxidases: substrate complexes with mechanistic 633 implications. *Biochem Soc Trans* **29**(2), 91-98. <https://doi.org/10.1042/bst0290091>

García-Rodríguez R, Romero-Segura C, Sanz C, Sánchez-Ortiz A, Pérez A (2011) Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res Int* **44**(2), 629–635. doi:10.1016/j.foodres.2010.12.023

Gencer N, Sinan S, Arslan O (2012) Kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from various olives (*Olea europaea* L.) *Asian J Chem* **24**(5), 2159–2161.

Hachicha Hbaieb R, Kotti F, Paduano A, Crupi P, Clodoveo ML, Sacchi R i sur. (2022) Profile of enzyme in drupe of oueslati's cv. olives during ripening phases: A support method implementation in the production of extra virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* **99**(6), 457–468. doi:10.1002/aocs. 12584

Hachicha Hbaieb, Kotti F, Vichi S, Gargouri M (2017a) Evolution of endogenous enzyme activities and virgin olive oil characteristics during Chetoui and Chemlali olive ripening *Eur J Lipid Sci Technol* **119** (5) doi: 10.1002/ejlt.201600150

Hachicha Hbaieb R, Kotti F, Valli E, Bendini A, Toschi TG, Gargouri M (2017b) Effect of Tunisian olive ripeness on endogenous enzymes and virgin olive oil phenolic composition. *J Food Compos Anal* **62**, 43-50 doi: 10.1016/j.jfrc.2017.04.016

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

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

Hornero-Mendez D, Gallardo-Guerrero L, Jaren-Galan M, Minguez-Mosquera MI (2002) Differences in the activity of superoxide dismutase, polyphenol oxidase and Cu-Zn content in the fruits of Gordal and Manzanilla olive varieties. *Z Naturforschung C* **57**(1–2):113–20. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-1- 220>

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu: Hrvatska baza podataka biljnih genetskih izvora (HAPIH), (2022)

[https://cpgrd.hapih.hr/gb/fruit/main/accessions\\_list?has\\_document=OLEA&order\\_by=accession\\_number&page=2](https://cpgrd.hapih.hr/gb/fruit/main/accessions_list?has_document=OLEA&order_by=accession_number&page=2) Pristupljeno 03. siječnja 2023.

Huang S, Wang Q, Wang Y, Ying R, Fan G, Huang M, Agyemang M (2020) Physicochemical characterization and antioxidant activities of Chongqing virgin olive oil: effects of variety and ripening stage. *J Food Meas Charact* **14** (4), 2010-2020. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00447-8>

Jemai H, Bouaziz M, Sayadi S (2009) Phenolic Composition, Sugar Contents and Antioxidant Activity of Tunisian Sweet Olive Cultivar with Regard to Fruit Ripening. *J Agric Food Chem* **57**(7), 2961-2968. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.033>

Jusup N (2021) Dalmatian Couple Share an Award-Winning Oblica with The World- Olive Oil Times. <https://www.oliveoiltimes.com/production/dalmatian-couple-share-an-award-winning-oblica-with-the-world/100123> Pristupljeno 03. siječnja 2023.

Ferreira J (1979) Explotaciones olivaderas colaboradoras. Ministarstvo poljoprivrede, Madrid.

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>

Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* **77**(3):215–27. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)

Kiritsakis A, Markakis P (1988). Olive Oil: A Review. *Adv Food Res* **31**, 453–482. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60170-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60170-6)

Koprivnjak O, Krisko A, Valic S, Caric, D, Krapac M, Poljuha D (2016) Antioxidants, radical-scavenging and protein carbonylation inhibition capacity of six monocultivar virgin olive oils in Istria (Croatia). *Acta Aliment Hung* **45**(3), 427-433. DOI 10.1556/AAlim.2015.0018

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

Koprivnjak O, Conte L, Totis N (2002) Influence of olive fruit storage in bags on oil quality and composition of volatile compounds. *Food Technol Biotech* **40**(2), 129–134.

Kotti F, Jaziri K, Arab F, Mater Y, Sifi S, Fares N i sur. (2010) Lipoxygenase: Optimization of Extraction and Evaluation of its Contribution to Virgin Olive Oil Aroma, *Food Biotechnol* **24**, 95-105. <https://doi.org/10.1080/08905430903562658>

Luaces P, Sanz C, Perez AG (2007a) Thermal stability of lipoxygenase and hydroperoxide lyase from olive fruit and repercussion on olive oil aroma biosynthesis. *J Agric Food Chem* **55** (15), 6309–13. <https://doi.org/10.1021/jf070326s>

Luaces P, Romero C, Gutierrez F, Sanz C, Perez AG (2007b) Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *J Sci Food Agric* **87**(14), 2721–7. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3049>

Luaces P, Pérez AG, Sanz C (2005) Effect of cold storage of olive fruits on the lipoxygenase pathway and volatile composition of virgin olive oil. *Acta Horti* **682**, 993–998. doi:10.17660/actahortic.2005.682.

Lukić M (2022) Utjecaj sorte, stupnja zrelosti plodova masline i temperature čuvanja djevičanskog maslinovog ulja na sastav i koncentracije sterola te alifatskih i triterpenskih alkohola (doktorski rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.

Lukić I, Žanetić M, Špika Jukić M, Lukić M, Koprivnjak O, Brkić Bubola K (2017) Complex interactive effects of ripening degree, malaxation duration and temperature on Oblica cv. virgin olive oil phenols, volatiles and sensory quality. *Food Chem* **232**, 610-620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.047>

Mailer RJ, Ayton J, Conlan D (2007 Influence of harvest timing on olive (*Olea europaea*) oil accumulation and fruit characteristics under Australian conditions). *J Food Agric Environ* **5**(3 i 4) 58-63.

Maslinar (2022) Istarska bjelica kasno rađa. Maslinar, časopis za maslinare i uljare, <https://www.maslinar.com/istarska-bjelica-kasno-rada/> Pristupljeno 27. veljače 2023.

Maslinar (2020) Buža – najrasprostranjenija istarska sorta. Maslinar, časopis za maslinare i uljare. <https://www.maslinar.com/sorte-maslina-buza-najrasprostranjenija-istarska-sorta/> Pristupljeno 08. veljače 2023.

- Mazduca S, Spadafora A, Innocenti AM (2006) Cell and tissue localization of b-glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. *Plant Sci* **171** (6), 726-733. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.07.006>
- Medved I (2019) Levantinka, sorta koja redovito i obilno rađa, Agroportal.hr. <https://www.agroportal.hr/maslinarstvo/25801> Pristupljeno 03. siječnja 2023.
- Medved I (2018) Lastovka. Agroportal.hr <https://www.agroportal.hr/maslinarstvo/25369> Pristupljeno 08. veljače 2023.
- Microsoft Corporation (2019) Microsoft Office Home and Student (Verzija 2301) Dostupno na: <https://office.microsoft.com/excel> Pristupljeno 27.2. 2023.
- Milović A, Šetić E, Peršurić Đ, Poljuha D, Sladonja B, Bršćić K (2005): Identification and characterization of autochthonous olive varieties in Istria (Croatia), *Annales Ser Hist Nat* **15**, 251-256.
- Mladar N, Kovačević I, Vojković M (1987) Štete od niskih temperatura na maslini u Dalmaciji i na Kvarnerskim otocima. *Agronomski glasnik*, **6**, 65–80.
- Montedoro G, Baldioli M, Selvaggini, R, Begliomini AL, Taticchi A, Servili M (2002) Relationships between phenolic composition of olive fruit and olive oil: the importance of the endogenous enzymes. *Acta Horti* **586**, 551–556. 10.17660/ActaHortic.2002.586.115
- Ortega-García F, Blanco S, Peinado MA, Peragon J (2008) Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiol* **28**, 45–54. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.1.45>
- Palmieri-Thiers C, Brunini- Bronzini de Caraffa V, Lorenzi V, Gambotti C, Giannettini J, Berti L i sur. (2009) Biochemical and molecular aspects of olive lipoxygenase U: Berti L, Maury JU (ured.) *Advances in Olive Resources*, 2. izd. 1–22. Transworld Research Network, Kerala, Indija.
- Panzanaro S, Nutricati E, Miceli A, De Bellis L (2010) Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol Bioch* **48**(9) 741–745. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.05.004>
- Papić M (2014) Primijenjena statistika u ms excelu + cd - za ekonomiste, znanstvenike i neznalice, 5. Izd, Naklada Zoro, Zagreb.



- Patui E, Braidot C, Peresson F, Tubaro M, Mizzau Z, Rabiei L i sur. (2010) Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in two olive varieties from Northern Italy. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**(7) 780–790. doi:10.1002/ejlt.200900167
- Peres F, Martins L, Mourato M, Conceição V, Antunes P (2016) Phenolic compounds of ‘Galega Vulgar’ and ‘Cobrançosa’ olive oils along early ripening stages. *Food Chem* **211**, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.022>
- Peres MFP (2015) Influence of Enzymes and Technology on the Composition of Cobrançosa and Galega Vulgar Virgin Olive Oils. Diss.(disertacija). Sveučilište u Lisabonu, Portugal.
- Poljuha D, Sladonja B, Šetić E, Milotić A, Bandelj D, Jakše J, Javornik B (2008a): DNA fingerprint of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers, *Sci Hort* **115**, 223-230.
- Poljuha D, Sladonja B, Brkić Bubola K, Radulović M, Brščić K, Šetić E i sur. (2008b). A multidisciplinary Approach to the Characterization of Autochthonous Istrian Olive (*Olea europaea* L.) Varieties, *Food Technol Biotech* **46**, 347-354.
- 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)
- Reboredo-Rodríguez P, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J (2014) Improvements in the malaxation process to enhance the aroma quality of extra virgin olive oils. *Food Chem* **158**, 534-545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.140>
- Ridolfi M, Terenziani S, Patumi M, Fontanazza G (2002) Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *J Agric. Food Chem* **50**(4), 835–9. <https://doi.org/10.1021/jf0109118>
- Romero- Segura C, García- Rodriguez R, Sanchez- Ortiz A, Sanz C, Perez A (2012) The role of olive  $\beta$ -glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res Int* **45**, 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.024>
- Romero- Segura C, Sanz C, Perez AG (2009) Purification and Characterization of an Olive Fruit  $\beta$ -Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics. *J Agric Food Chem* **57**(17), 7983-7988. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.023>

- Sainz JA, Farrido I, Hernandez M, Montaña A, Llerena JL, Espinosa F (2019) Influence of cultivar, irrigation, ripening stage and annual variability on the oxidant/ antioxidant systems of olives as determined by MDS-PT. *PLoS ONE* **14**(4), 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215540>
- Salas JJ, Williams M, Harwood JL, Sanchez J (1999) Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *J Am Oil Chem Soc* **76**, 1163–1168.
- Salas JJ, Sánchez J (1998) Lipoxygenase activity from the pulp tissues of olive (*Olea europea*).U: Sánchez J, Cerdá-Olmedo E i Martínez-Force E (ured.), *Advances in Plant Lipid*, str .297-299. Secretariado de Publicaciones, Sveučilište u Seville, Sevilla, Španjolska
- Sanchez- Ortiz, Aymen Bejaoui M, Quintero- Flores A, Jimenez A, Beltran 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>
- Saraiva JA, Nunes CS, Coimbra MA (2007) Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase—Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chem* **101**(4), 1571–1579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.012>
- Segovia-Bravo KA, Jaren-Galan M, García-García P, Garrido-Fernandez A (2007) Characterization of polyphenol oxidase from the Manzanilla cultivar (*Olea europaea pomiformis*) and prevention of browning reactions in bruised olive fruits. *J Agric Food Chem* **55**(16), 6515–20. <https://doi.org/10.1021/jf063675f>
- Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G (2003) Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time of exposure of olive pastes to air contact during the mechanical extraction process. *J Agric Food Chem* **51**(27), 7980–7988. <https://doi.org/10.1021/jf034804k>
- Servili M, Montedoro G (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Tech* **104**(9–10), 602–13. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X)
- Skodra C, Styliani Titeli V, Michailidis M, Bazakos C, Ganopoulos I, Molassiotis A i sur. (2021) Olive Fruit Development and Ripening: Break on through to the “-Omics” Side. *Int J Mol Sci* **22**(11) 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms22115806>

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

Strikić F, Bandelj Mavsar D, Perica S, Cmelik Z, Satovic Z (2009) The main Croatian olive cultivar, 'Oblica', shows high morphological but low molecular diversity. *J Hortic Sci Biotechnol* **84** (3), 345–349. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512529>

Šarolić M, Gugić M, Friganović E, Tuberoso CI, Jerković I (2015) Phytochemicals and other characteristics of Croatian monovarietal extra virgin olive oils from Oblica, Lastovka and Levantinka varieties. *Molecules* **20**(3), 4395-409. <https://doi.org/10.3390/molecules20034395>

Taticchi A, Esposito S, Veneziani G, Urbani S, Selvaggini R, Servili M (2013) The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chem* **136**(2), 975-983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.071>

Uceda M, Frias L (1975) Harvest dates: Evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality. U: In Proceedings of the 2nd Seminario Oleícola Internacional, Kordoba, Španjolska, str. 125–128.

Velázquez-Palmero D, Romero-Segura C, García-Rodríguez R, Hernández ML, Vaistij FE, Graham IA i sur. (2017) An Oleuropein  $\beta$ -Glucosidase from Olive Fruit Is Involved in Determining the Phenolic Composition of Virgin Olive Oil. *Front Plant Sci* **8**:1902. doi: 10.3389/fpls.2017.01902

Zawistowski J, Biliaderis C, Eskin M (1991). Polyphenol Oxidase. U: Robinson DS, Eskin NAM (ured.) Oxidative Enzymes in Foods, Elsevier Applied Science, Ltd. London i New York, 217-273.

