Utjecaj lipoksigenaze na sastav hlapljivih tvari u maslinovom ulju autohtonih dalmatinskih sorti

Soldo, Barbara

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:750629

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Barbara Soldo

UTJECAJ LIPOKSIGENAZE NA SASTAV HLAPLJIVIH TVARI U MASLINOVOM ULJU AUTOHTONIH DALMATINSKIH SORTI

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof. dr. sc. Maja Pavela-Vrančić
Doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov

Zagreb, 2016.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Barbara Soldo

INFLUENCE OF LIPOXYGENASE ON THE COMPOSITION OF VOLATILE COMPOUNDS IN OLIVE OILS OF AUTOCHTHONOUS DALMATIAN CULTIVARS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Professor Maja Pavela-Vrančić, PhD
Assistant Professor Ivica Ljubenkov, PhD

Zagreb, 2016.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Splitu, pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Pavele-Vrančić i doc. dr. sc. Ivice Ljubenkova.

Zahvaljujem

Mentorici prof. dr sc. Maji Paveli-Vrančić na susretljivosti, korisnim savjetima koji su omogućili da rad poprimi ovaj oblik.

Mentoru doc. dr. sc. Ivici Lubenkovu, poznavaocu ulja i maslinarstva, od kojeg je i potekla ideja rada, na jednostavnom pristupu, smjernicama i potpori tijekom eksperimentalnog dijela i pisanja rada.

Članovima povjerenstva prof. dr. sc. Tihani Žanić Grubišić, doc. dr. sc. Borisu Mildneru i doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na pažljivom čitanju i korisnim sugestijama koje su omogućile da ovaj rad poprimi svoj konačan oblik.

Posebno hvala kolegama Odjela za kemiju i Odjela za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te kolegama i prijateljima iz Laboratorija za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Splitu, na ugodnoj radnoj atmosferi i podršci tijekom izrade ovog rada. Također, hvala i kolegama s Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša, bez njih ne bi bilo ulja.

Nije bilo lako, ali bez dragih i stručnih ljudi možda bi bilo i nemoguće. Od srca zahvaljujem kolegicama Viljemki Bučević Popović i Matildi Šprung.

Najveća hvala mom suprugu, jednoj djevojčici i dječaku na ohrabrivanju i vjeri u uspjeh. I svakako veliko hvala našim roditeljima, na pomoći koju nesebično pružaju.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **VIII**

ABSTRACT ..... **IX**

§ 1. UVOD **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**

2.1. Lipoksigenaza **4**

2.1.1. Lipoksigenaza u biljaka **4**

2.1.1.1. Unutarstanična lokalizacija LOX enzima *4*

2.1.1.2. Primarna i tercijarna struktura LOX enzima *5*

2.1.1.3. Vezno mjesto za supstrat *7*

2.1.1.4. Specifičnost prema supstratu *8*

2.1.1.5. Reakcijski mehanizam *9*

2.1.1.6. Podjela lipoksigenaza *10*

2.1.1.7. Hipoteze o pozicijskoj specifičnost LOX enzima *12*

2.1.1.8. Stereokemija reakcije *13*

2.2. *Olea europea* L. **15**

2.2.1. Rasprostranjenost maslina **15**

2.2.2. Razvoj i zrenje ploda masline **15**

2.3. Djevičansko maslinovo ulje **18**

2.3.1. Kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja **18**

2.3.2. Fizikalno-kemijske vrijednosti djevičanskog maslinovog ulja **19**

2.3.2.1. Slobodne masne kiseline *20*

2.3.2.2. Peroksidni broj *20*

2.3.2.3. Apsorbancija u UV području *20*

2.4. Hlapljive tvari u djevičanskim maslinovim uljima **21**

2.4.1. Lipoksigenazni put **21**

2.4.2. Enzimi LOX puta **23**

2.5. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti plodova na aktivnost LOX enzima **26**

2.6. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti na količinu ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima **27**

2.7. Utjecaj ukupnih fenolnih spojeva na aktivnost LOX enzima i sastav hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima **28**

2.8. Utjecaj LOX enzima na sastav hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima **28**

2.9. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti na sastav hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima **29**

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 32
3.1. Materijali 32
3.1.1. Istraživane sorte 32
3.1.2. Pokusni nasadi maslina 34
3.2. Metode rada 34
3.2.1. Određivanje stupnja zrelosti plodova maslina 34
3.2.2.1. Priprema plodova za pročišćavanje LOX enzima 36
3.2.2.2. Optimizacija pročišćavanja LOX enzima 36
3.2.2.3. Određivanje koncentracije izoliranih proteina 38
3.2.2.4. Priprema supstrata 39
3.2.2.5. Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti LOX enzima 39
3.2.2.6. Izolacija produkata 9- i 13-Z,E-HPOD 40
3.2.2.7. Kvantifikacija produkata 9- i 13-Z,E-HPOD 40
3.2.4. Prerada plodova u ulje 42
3.2.5. Analize ulja 42
3.2.5.1. Osnovni parametri kvalitete ulja 42
3.2.5.1.1. Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK) 42
3.2.5.1.2. Određivanje peroksidnog broja (PB) 43
3.2.5.1.3. Specifični kojeficijenti apsorbancije u UV području (K-brojevi) 43
3.2.6. Ukupni fenoli 44
3.2.6.1. Izolacija fenolnih spojeva 44
3.2.6.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva 44
3.2.7. Određivanje sastava hlapljivih tvari 45
3.2.7.1. Izolacija hlapljivih tvari 45
3.2.7.2. Analiza hlapljivih tvari u maslinovom ulju 47
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 50
4.1. Rezultati 50
4.1.1. Specifična aktivnosti LOX enzima u plodu maslina sorte Oblica, Levantinka i Lastovka. 51
4.1.1.1. Rokovi berbe i stupanj zrelosti ploda maslina 51
4.1.1.2. Validacija protokola za izolaciju LOX enzima iz ploda maslina 52
4.1.1.3. LOX enzim u plodovima maslina 53
4.1.2. Kemijski sastav djevičanskih maslinovih ulja sorte Oblica, Levantinka i Lastovka. 61
4.1.2.1. Osnovni kemijski parametri 61

4.1.4. Hlapljive tvari djevičanskih maslinovih ulja sorte Oblica, Levantinka i Lastovka 69

4.1.5.Korelacija specifične aktivnosti LOX enzima i sadržaja C_6 i C_5 hlapljivih tvari 85

4.2. Rasprava 89

4.2.1. Specifična aktivnost LOX enzima u plodu maslina sorte Oblica, Levantinka i Lastovka..89

4.2.1.1. Rokovi berbe i stupanj zrelosti ploda maslina 89

4.2.1.2. Validacija protokola za izolaciju LOX enzima iz ploda maslina 90

4.2.1.3. LOX enzim u plodovima maslina.....91

4.2.2. Fizikalno-kemijski sastav djevičanskih maslinovih ulja Oblice, Levantinke i Lastovke.....95

4.2.2.1. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti plodova na fizikalno-kemijski sastav djevičanskih maslinovih ulja 95

4.2.2.2. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti plodova na udio ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima Oblice, Levantinke i Lastovke.....96

4.3. Utjecaj ukupnih fenolnih spojeva na specifičnu aktivnosti LOX enzima 97

4.4. Hlapljive tvari djevičanskih maslinovih ulja sorte Oblica, Levantinka i Lastovka 98

4.2.4.1. Utjecaj sorte i roka berbe na sastav hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima.....98

4.2.4.2. Odnos C_6 i C_5 hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima 103

4.2.5. Utjecaj aktivnosti LOX enzima na sadržaj C_6 hlapljivih tvari 104

§ 5. ZAKLJUČCI 107

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... 110

§ 7. LITERATURNI IZVORI..... 112

§ 8. DODATAK……X

§ 9. ŽIVOTOPIS……..XIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

UTJECAJ LIPOKSIGENAZE NA SASTAV HLAPLJIVIH TVARI U MASLINOVOM ULJU AUTOHTONIH DALMATINSKIH SORTI

Barbara Soldo
Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet
Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split

Enzim lipoksigenaza (LOX) je dio lipoksigenaznog puta koji ima značajan utjecaj na sastav hlapljivih komponenti, kako u plodu masline tako i u ulju. U ovom radu ispitan je utjecaj stupnja zrelosti ploda na aktivnost LOX enzima u plodovima autohtonih dalmatinskih sorti maslina Oblica, Levantinka i Lastovka. Kako bi se aktivnost LOX enzima dovela u vezu sa sintezom poželjnih hlapljivih spojeva, istraživanje je obuhvatilo i sadržaj hlapljivih tvari u sortnim djevičanskim uljima. Također je analiziran sadržaj ukupnih fenolnih spojeva koji pridonose aromi djevičanskog ulja, a utječu na učinkovitost lipoksigenaze. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem, omogućuju uvid u sortne karakteristike maslina i pripadajućeg maslinovog ulja, što ima poseban značaj u proizvodnji ulja poželjnih mirisnih svojstava i pridonosi definiranju bioraznolikosti autohtonih sorti.

(124 stranica, 41 slika, 23 tablica, 130 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: djevičansko maslinovo ulje / fenolni spojevi / hlapljive tvari / lipoksigenaza / sorta / stupanj zrelosti plodova

Mentori: Prof. dr. sc. Maja Pavela-Vrančić
Doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Boris Mildner
Prof. dr. sc. Maja Pavela-Vrančić
Doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov
Prof. dr. sc. Tihana Žanić Grubišić
Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Rad prihvaćen: 01.06.2016.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

INFLUENCE OF LIPOXYGENASE ON THE COMPOSITION OF VOLATILE COMPOUNDS IN OLIVE OILS OF AUTOCHTHONOUS DALMATIAN CULTIVARS

Barbara Soldo
University of Split, Faculty of Science
Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split

Lipoxygenase (LOX) is a part of the lipoxygenase pathway, which has a substantial role regarding the composition of volatile compounds in olive fruit and olive oil. In this thesis LOX activity of Dalmatian autochthonous olive cultivars, namely Oblica, Levantinka and Lastovka, has been explored in response to the degree of olive fruit ripeness. The research included the analysis of volatile compounds in respective olive oils, with correlation to LOX activity. The total amount of phenolic compounds contributing to olive oil flavor has also been determined. The results of this study will give an insight into cultivar-dependent features of Dalmatian olive trees and associated olive oils. This is of importance regarding the production of olive oils displaying desirable flavor characteristics, and in defining olive tree autochthonous cultivar biodiversity.

(124 pages, 41 figures, 23 tables, 130 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: virgine olive oil / phenolic compounds / volatile compounds / lipoxygenase / cultivar / olive fruit ripeness

Supervisors: Professor Maja Pavela-Vrančić, PhD
Assistant Professor Ivica Lubenkov, PhD

Reviewers: Assistant Professor Boris Mildner, PhD
Professor Maja Pavela-Vrančić, PhD
Assistant Professor Ivica Ljubenkov, PhD
Professor Tihana Žanić Grubišić, PhD
Assistant Professor Jasmina Rokov Plavec, PhD

Thesis accepted: 01.06.2016.

§ 1. UVOD

Djevičansko maslinovo ulje je jedan od temelja mediteranskog tipa prehrane te je dobro poznat njegov pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka. Ono je namirnica visoke nutritivne vrijednosti i jedinstvenih senzorskih svojstava.[1] Jedno od osnovnih pozitivnih senzorskih svojstava maslinovog ulja, uz pikantnost i gorčinu, jest i voćnost. Voćnost je ukupnost mirisnih svojstava (ovisno o sorti) karakterističnih za ulje od zdravih i svježih plodova, bilo zelenih ili zrelih, zapaženih izravno ili neizravno, odnosno retronazalno.[2]

Miris maslinovog ulja (voćnost) pripisuje se hlapljivim tvarima koje nastaju tijekom i nakon ekstrakcije ulja iz ploda masline.[3] Za jedinstven miris maslinovog ulja zaslužna je kompleksna mješavina spojeva niske molekulske mase koji brzo hlape na sobnoj temperaturi.[4,5] Analiza hlapljivih tvari, provedena na maslinovom ulju različitih sorti, pokazala je visok sadržaj C_6 hlapljivih tvari, u kojima prevladava hlapljivi aldehid *E*-2-heksenal.[6]–[8]

Preteče poželjnih hlapljivih C_6 tvari su višestruko nezasićene masne kiseline, prvenstveno linolna i linolenska koje se enzimskom hidrolizom oslobađaju iz glicerolipida u staničnim membranama. Biokemijski put započinje lipoksigenaza (LOX), odgovorna za oksidaciju viših masnih kiselina, koje potom cijepa hidroperoksid-liaza čijim djelovanjem nastaju aldehidi. Aldehidi se reduciraju u alkohole djelovanjem alkohol dehidrogenaze, a acil-transferaza ih prevodi u odgovarajuće estere.[3]

Poznavanje biokemijskog puta u kojemu nastaju hlapljive tvari djevičanskog maslinovog ulja važno je za poboljšanje njegovih senzorskih svojstava. Poticanje aktivnosti ili inhibicija enzima u određenoj fazi lipoksigenaznog puta rezultira povećanjem koncentracije poželjnih hlapljivih spojeva.[9,10] Međutim, Pravilnikom o uljima od ploda i komine masline zabranjena je manipulacija enzimskom aktivnošću u proizvodnji ekstra djevičanskog maslinovog ulja.[2] Poznavanje lipoksigenazne aktivnosti tijekom zrenja ploda, njene uloge tijekom dobivanja ulja kao i njene ovisnosti o sortnim karakteristikama, put su do djevičanskog maslinovog ulja poželjnih senzorskih svojstava.

Svrha rada

Svrha ovog rada bila je istražiti povezanost aktivnosti enzima lipoksigenaze iz ploda sa sadržajem poželjnih hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju dobivenom iz hrvatskih autohtonih sorti maslina. Rezultati ovog rada omogućuju da se odredi optimalno vrijeme berbe, kako bi dobiveno ulje sadržavalo što veću količinu poželjnih hlapljivih komponenti. Također, istraživanje je pridonijelo razjašnjavanju postojećih kontradiktornih podataka o promjenama u aktivnosti lipoksigenaze tijekom rasta i zrenja ploda. Praćenjem promjena koncentracije ukupnih fenolnih spojeva i hlapljivih tvari prikupljena su saznanja o razvoju arome i sortnim karakteristikama u, do sada, slabo istraživanim uljima sorti Oblica, Levantinka i Lastovka. Opće je prihvaćeno da Hrvatska na tržištu maslinovog ulja ne može konkurirati količinom nego vrhunskom kvalitetom.

Ova disertacija bi trebala prikupiti podatke i dati preporuke kada brati i kako preraditi plodove najznačajnijih dalmatinskih autohtonih sorti u cilju dobivanja ulja sa što boljim senzorskim svojstvima.

Ciljevi ovog rada bili su:

- odrediti utjecaj stupnja zrelosti ploda na aktivnost lipoksigenaze u autohtonim sortama Oblica, Levantinka i Lastovka;
- ispitati korelaciju između aktivnosti lipoksigenaze i koncentracije fenolnih spojeva te sadržaja hlapljivih tvari u ulju;
- na temelju podataka o lipoksigenaznoj aktivnosti u plodu i sadržaju hlapljivih tvari u ulju, odrediti stupanj zrelosti ploda kod kojega dobivena ulja imaju najveću količinu poželjnih hlapljivih tvari.

Postavljene hipoteze:

- stupanj zrelosti ploda, kao i sorta masline značajno utječu na aktivnost lipoksigenaze i sadržaj hlapljivih komponenti u maslinovom ulju;
- lipoksigenazna aktivnost je niža pri višim koncentracijama fenolnih spojeva;
- ulja poželjnih senzorskih svojstava dobivaju se iz plodova određenog stupnja zrelosti.

U istraživanju su korišteni plodovi maslina sorti Oblica, Levantinka i Lastovka u razdoblju od 2013. do 2015. godine. Plodovi su brani ručno, u pet do šest berbi svaka dva tjedna (rokovi brbe) kroz mjesec listopad, studeni i prosinac. Pošto im je određen stupanj zrelosti (SZ), dio plodova je korišten za ispitivanje aktivnosti LOX enzima, a dio je prerađen u ulje. U laboratorijski proizvedenim uljima određeni su osnovni kemijski parametri kvalitete, te udio ukupnih fenolnih spojeva. Sastav hlapljivih tvari u ulju određen je metodom plinske kromatografije.

Kako bi utvrdili utjecaj zrelosti ploda na sastav hlapljivih tvari u ulju ispitivanjem je obuhvaćeno praćenje promjene aktivnosti lipoksigenaze tijekom procesa zriobe plodova. Proteinski ekstrakti enzima izolirani su po metodi koju su opisali Luaces i sur.[11] Ispititivanje primarnih produkata oksidacije koja uključuje analizu regiospecifičnosti enzima, izradu pH profila i ispitivanje inhibicijskog utjecaja nekompetitivnog inhibitora, provedeno je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s obrnutim fazama.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Lipoksigenaza

Lipoksigenaza (linoleat:kisik 13-oksidoreduktaza, LOX, *EC* 1.13.11.12) pripada ne-hemskim dioksigenazama koje sadrže željezo, te katalizira uvođenje molekule kisika u višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA) s barem jednim (1*Z*,4*Z*)-pentadienskim slijedom. Enzim je prisutan u biljkama i sisavcima, a novija istraživanja potvrđuju njegovu prisutnost u koraljima, gljivama i bakterijama. Nastali produkti, hidroperoksidi masnih kiselina, u biljaka se prevode u hlapljive aldehide i jasmonate, gljive ih metaboliziraju do diola i laktona koji sudjeluju u regulaciji proizvodnje mikotoksina i u razmnožavanju, a stanice sisavaca ih prevode u lipoksine i leukotrijene, medijatore upalnih procesa u stanici te pokretače procesa stanične signalizacije i stanične proliferacije. Produkti LOX enzima u biljaka imaju ulogu signalnih molekula, uključeni su u različite fiziološke procese i u odgovor biljke na stres. Biljni LOX enzim dio je lipoksigenaznog puta (LOX put) koji ima značajnu ulogu u sintezi hlapljivih tvari koje utječu na aromu i miris.

2.1.1. Lipoksigenaza u biljaka

2.1.1.1. Unutarstanična lokalizacija LOX enzima

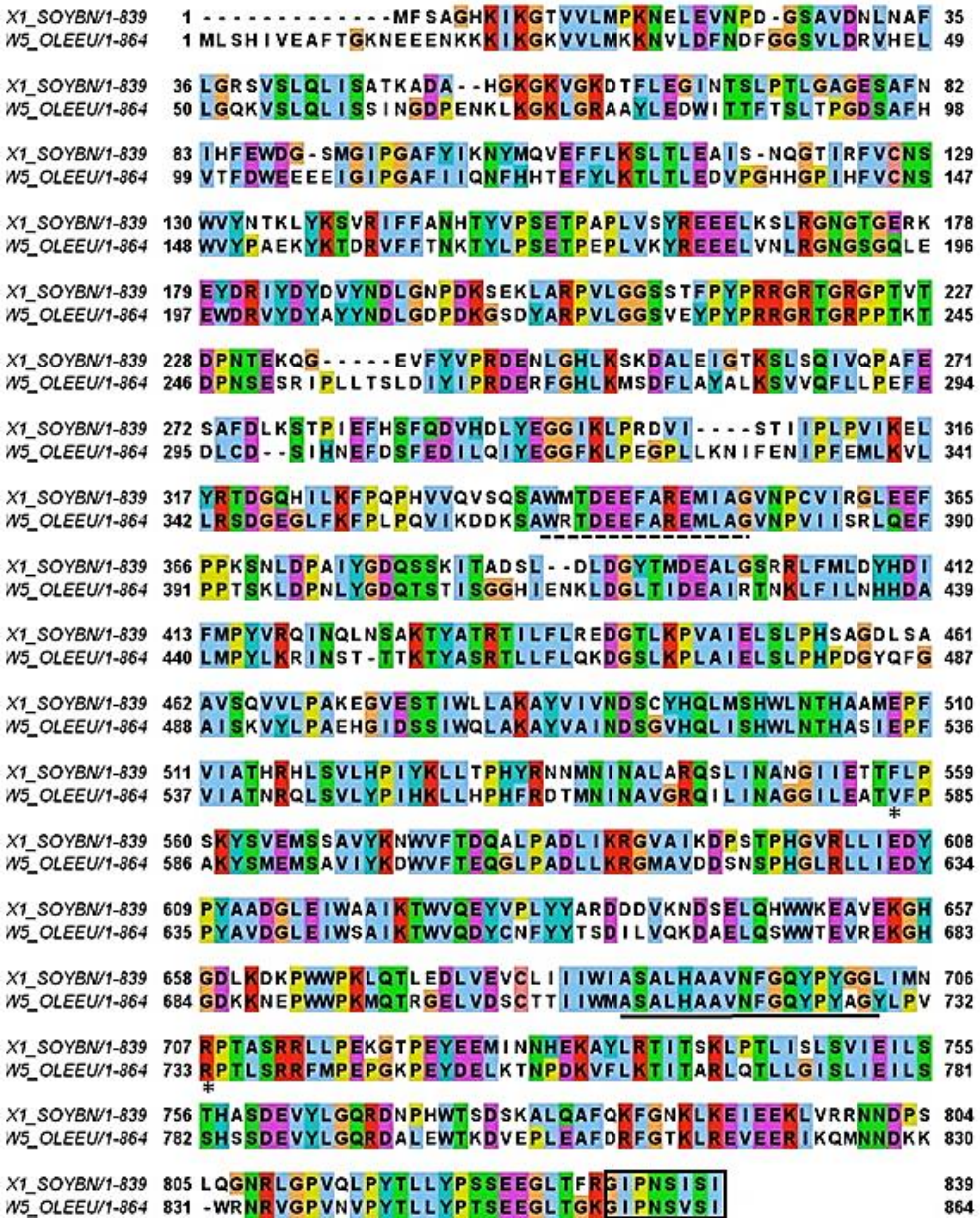
U biljaka, LOX enzim dolazi slobodan u citoplazmi i vezan za membrane staničnih organela. Slobodnu lipoksigenazu nalazimo u vakuolama, kloroplastima, lipidnim tijelima i mitohondrijima biljnih stanica. Enzim vezan za membranu nalazimo na plazmatskoj membrani, tilakoidnim membranama kloroplasta i membrani lipidnih tijela.[12]

2.1.1.2. Primarna i tercijarna struktura LOX enzima

Poravnavanjem aminokiselinskog slijeda biljnih LOX enzima uočena su četiri visoko očuvana motiva koja sudjeluju u katalitičkom procesu. Vezno mjesto za supstrat sačinjava visoko očuvani slijed od petnaest aminokiselinskih ostataka (od Ala339 do Gly353 u LOX-1 enzimu iz soje). Kako je riječ o oksigenazi, svi predstavnici skupine LOX enzima sadrže po jedno vezno mjesto za kisik kojega sačinjava slijed od trinaest aminokiselinskih ostataka (ASALHAAVNFGQY), dok je visoko očuvani motiv GIPNISISI često prisutan na C-terminalnom kraju. U enzimu LOX-1 iz soje, za interakciju iona željeza s enzimom značajno je pet visoko očuvanih aminokiselinskih ostataka, tri histidina (His499, His504 i His690), His694 koji je ponekad zamijenjen serinom ili asparaginom, te na C-terminalnom kraju Ile839.[13]

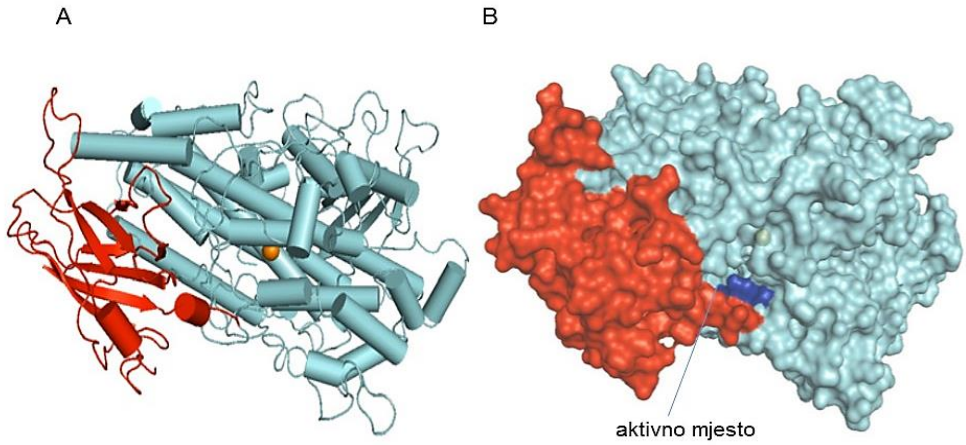
Lipoksigenaze su monomerni enzimi molekulske mase od 94-104 kDa. Polipeptidni lanac tvori dvije domene, manju N-terminalnu (25-30 kDa) i veću C-terminalnu domenu (55-65 kDa). N-terminalna domena izgrađena je od β-nabranih ploča čiju unutrašnjost čine gusto zbijeni hidrofobni bočni aminokiselinski ogranci, nerijetko aromatske prirode. Hidrofobna priroda ove domene očuvana je kod svih predstavnika skupine LOX enzima. Iako do kraja nije potvrđeno, pretpostavlja se da N-terminalna domena posreduje pri vezanju enzima za membranu.[14]

Poravnavanjem primarnog slijeda LOX-1 enzima (Ole1LOX1) iz masline s LOX-1 enzimom iz soje uočava se visoki stupanj homologije (Slika 1.).



Slika 1. Poravnavanje aminokiselinskog slijeda LOX-1 enzima iz soje i LOX-1 enzima (Ole1LOX1) iz masline. Na prikazu su označeni visoko očuvani aminokiselinski sljedovi, vezno mjesto za supstrat (podcrtano isprekidanom crtom), vezno mjesto za kisik (podcrtano punom crtom), motiv na C-terminlanom kraju (uokvireno). Zvjezdicom su označeni apsolutno očuvani Arg s dna aktivnog mjesta i očuvani Phe/Val ostaci važni za sintezu 9- i/ili 13-hidroperoksidnih produkata. Poravnavanje aminokiselinskih sljedova je izrađeno koristeći aplikaciju u proteinskoj bazi podataka Clustal X, a prikaz poravnatih sljedova pomoću alata Jalview.

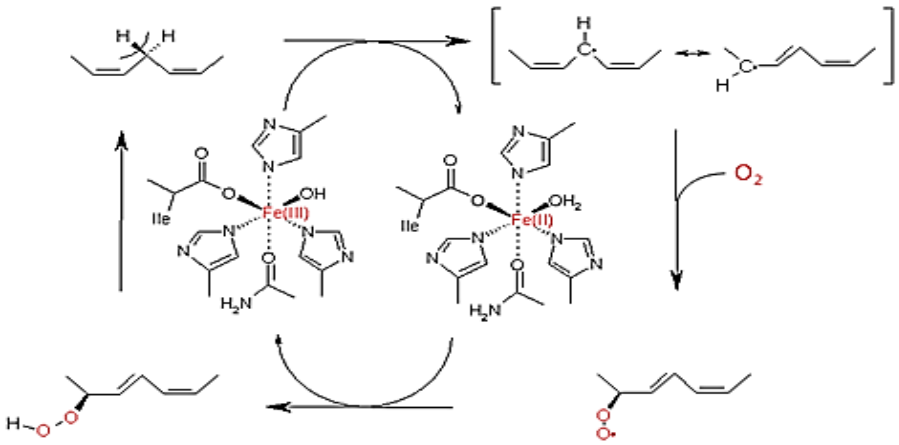
Kristalna struktura LOX-1 enzima iz masline za sada nije poznata, stoga su se Palmieri-Thieris i sur. za izradu trodimenzionalne strukture LOX-1 enzima iz masline (Ole1LOX1) poslužili kristalnom strukturom LOX-1 enzima iz soje (PDB:1YGE) (Slika 2.).



Slika 2. Hipotetski model LOX-1 enzima iz masline. (A) Prikazane su dvije domene: N-terminalna domena (crveno) izgrađena od β-nabranih ploča, te C-terminalna domena (tirkizno) uglavnom izgrađena od α-uzvojnica. Ion željeza (narančasto) nalazi se u katalitičkom mjestu. (B) Prikaz površine enzima s naznačenim aktivnim mjestom (tamno plavo).[15]

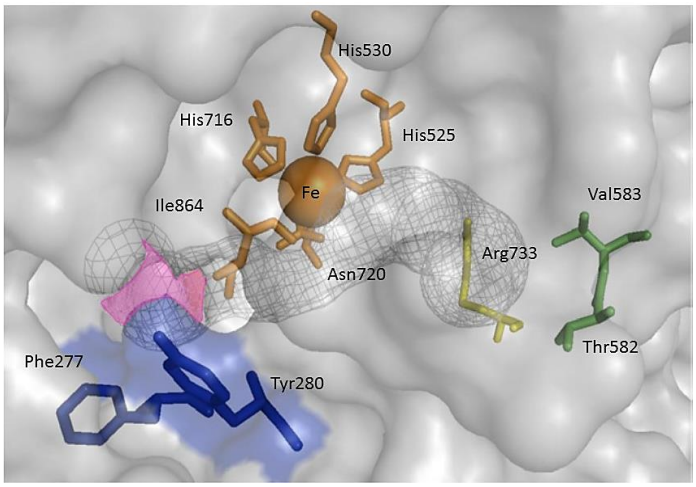
2.1.1.3. Vezno mjesto za supstrat

C-terminalnom domenom LOX enzima dominiraju α-uzvojnice. U katalitičkom mjestu C-terminalne domene nalazi se ne-hemski vezan ion željeza. Ion željeza je oktaedarski kordiniran s pet aminokiselinskih ostataka (tri His, Asn i Ile), te vodom ili hidroksilnim ligandom (Slika 3.).[14]



Slika 3. Kordinacijske veze iona željeza za vrijeme katalitičkog ciklusa LOX-1 enzima iz soje.[14] Izoleucin koji sudjeluje u kordinacijskoj vezi s ionom željeza, potječe s C-terminalnog kraja proteina i kordinaciju ostvaruje preko karboksilne skupine.

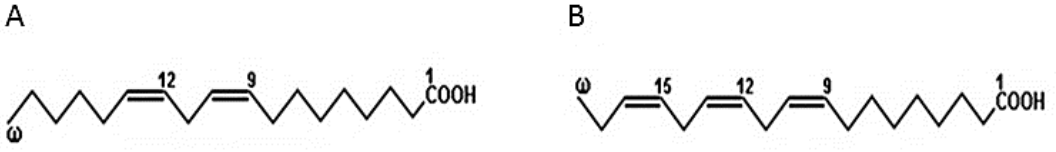
U LOX-1 enzimu iz masline (Oep1LOX1), pri dnu veznog džepa nalazi se Arg733, a na ulazu u džep smješteni su visoko očuvani Phe277 i Tyr280 (Slika 4.). Palmieri-Theris i sur. su u svom radu ispitali ulogu Phe277 i Tyr280, te uočili da je dostupnost supstratu u aktivno mjesto LOX-1 enzima određena ovim aminokiselinskim ostacima.[15]



Slika 4. Hipotetski model aktivnog mjesta LOX-1 iz masline. Na ulazu u aktivno mjesto (ružičasto) nalaze se Phe277 i Tyr280, a pri dnu aktivnog mjesta smješten je pozitivno nabijeni Arg733 (žuto). U aktivnom mjestu prikazan je ion željeza Fe(III) s pripadajućim ligandima (narančasto), te aminokiselinski ostaci Val583 i Thr582 odgovorni za sintezu 9- i/ili 13-hidroperoksidnih produkata (zeleno).[15]

2.1.1.4. Specifičnost prema supstratu

Biljni LOX enzimi mogu oksidirati dvostruko ili višestruko nezasićene masne kiseline koje sadrže barem jedan (1*Z*,4*Z*)-pentadienski slijed. U plodu masline, najzastupljenije nezasićene masne kiseline su linolna (18:2, ω-6) i α-linolenska (18:3, ω-3) kiselina (Slika 5.).

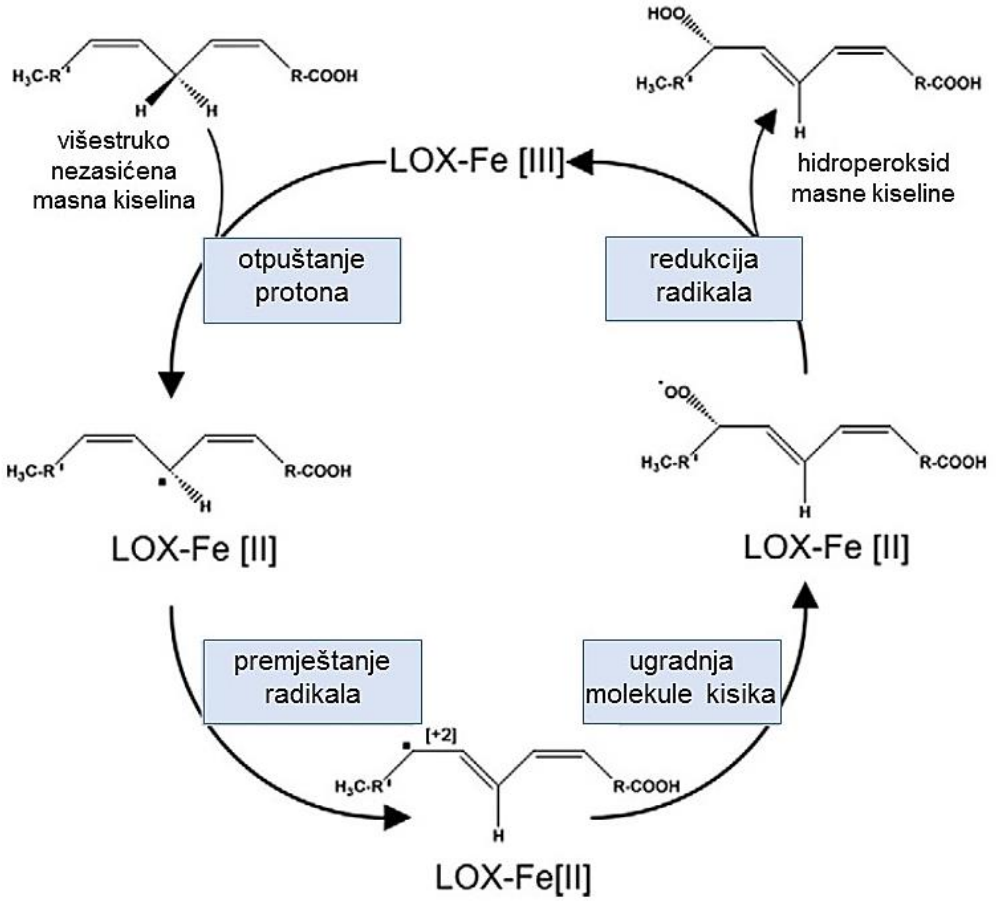


Slika 5. Strukturna formula linolne kiseline, 9*Z*,12*Z*-oktadekadienska kiselina (A) i linolenske kiseline, 9*Z*,12*Z*,15*Z*-oktadekatrienska kiselina (B).

Prijavljeni su različiti rezultati o specifičnosti LOX enzima izoliranog iz ploda masline. Razlog je vjerojatno činjenica da postoje četiri izoenzima, što tada još nije bilo poznato. Lorenci i sur. prvi su pročistili LOX enzim iz masline diferencijalnim centrifugiranjem i hidrofobnom kromatografijom. Navode da enzim pokazuje veću specifičnost prema linolnoj (K_m = 82,5 μmol L^{-1}) u usporedbi s linolenskom kiselinom (K_m = 306,3 μmol L^{-1}).[16] Ridolfi i sur. izolirali su protein taloženjem s amonijevim sulfatom iz ekstrakta tkiva masline, te su općenito rezultati ispitivanja specifičnosti LOX enzima prema supstratu u različitim sortama maslina potvrdili veći afinitet LOX enzima prema linolnoj kiselini (K_m = 20-96 μmol L^{-1}).[17] Za razliku od njih, Salas i sur. prijavili su veću specifičnost LOX enzima prema linolenskoj kiselini. Međutim, za razliku od prethodnih istraživača koji su za ispitivanje koristili zrele plodove, Salas i sur. su koristili zelene plodove masline.[18] Poznato je da LOX enzim iz fotosintetskog tkiva pokazuje veću specifičnost prema linolenskoj kiselini, dok je enzim izoliran iz nefotosintetskog tkiva specifičniji prema linolnoj kiselini.[19]

2.1.1.5. Reakcijski mehanizam

LOX enzim katalizira reakciju oksigenacije višestruko nezasićenih masnih kiselina kroz četiri uzastopna i stereokemijski strogo kontrolirana reakcijska koraka. Prva reakcija započinje otpuštanjem protona i premještanjem elektrona na ion željeza koji se pritom reducira. Nastali radikal masne kiseline može se rezonantno stabilizirati premještanjem elektrona u smjeru metilnog kraja masne kiseline (+2) ili suprotno, prema karboksilnom kraju (-2). Slijedi treći korak, ugradnja kisika, a reakcijski se niz završava redukcijom peroksidnog radikala prijenosom elektrona sa željeza, koji se time regenerira za novi reakcijski ciklus. Reakcija, dakle, završava protoniranjem peroksidnog radikala, odnosno nastankom hidroperoksida masne kiseline (Slika 6.).[20]



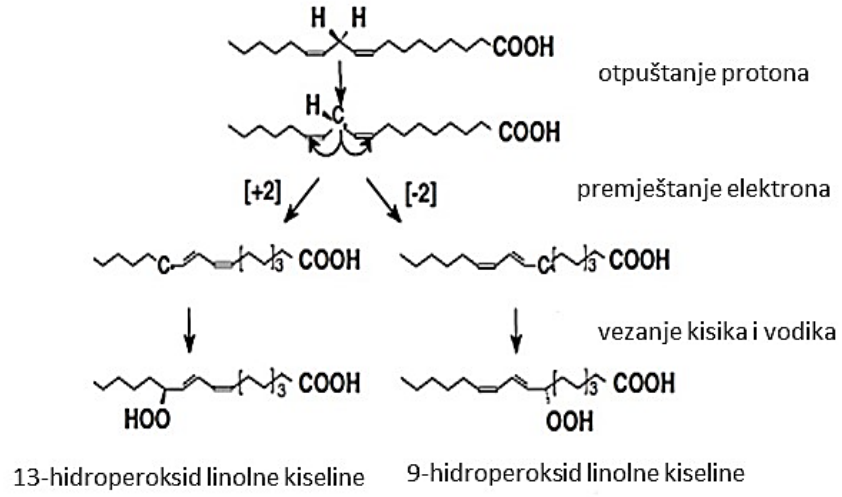
Slika 6. Reakcijski mehanizam LOX enzima. Prikazan je slijed reakcija kojima se iz višestruko nezasićene masne kiseline sintetizira odgovarajući hidroperoksid. Reakcije započinju otpuštanjem protona, popraćeno redukcijom željeza, a nastali radikal masne kiseline se rezonantno stabilizira. Slijedi ugradnja molekule kisika, a oksidacijom iona željeza omogućava se završetak reakcije, odnosno protoniranje hidroperoksidnog radikala.[20]

2.1.1.6. Podjela lipoksigenaza

Godinama su se LOX enzimi dijelili prema optimalnom pH području u kojemu postižu maksimalnu aktivnost. Takvom podjelom, grupi 1-LOX pripadaju izoenzimi kojima odgovaraju bazični uvjeti, dok izoenzimima iz grupe 2-LOX odgovaraju neutralni uvjeti.[21] Danas se LOX enzimi dijele prema unutarstaničnom položaju i pozicijskoj specifičnosti (regio-specifičnosti) s obzirom na mjesto uvođenja kisika u linolnu kiselinu. Podjele se temelje na poravnavanju primarnih sljedova, po kojoj biljni LOX enzimi čine dvije superobitelji. Enzimi

iz superobitelji LOX-1 ne sadrže plastidni tranzitni peptid i pokazuju visoku homologiju u aminokiselinskom slijedu (> 75 % podudarnosti), dok predstavnici LOX-2 superobitelji sadrže plastidni tranzitni slijed, te pokazuju djelomičnu homologiju u aminokiselinskom slijedu (> 35 %).[22] Feng i sur. su na temelju rezultata analize gena za LOX enzime viših biljaka potvrdili postojanje ovih dviju superobitelji.[23]

Biljni LOX enzimi mogu vezati kisik na dva mjesta unutar ugljikovodičnog lanca linolne kiseline. Vezanjem kisika na ugljik broj 9 (9-LOX) nastaje 9-hidroperoksid linolne kiseline, dok 13-hidroperoksid linolne kiseline nastaje vezanjem kisika na ugljik broj 13 (13-LOX) (Slika 7.).[24]



Slika 7. Pozicijska specifičnost reakcijskog mehanizma LOX enzima. Shematski prikaz nastanka 13-hidroperoksida, odnosno 9-hidroperoksida linolne kiseline.[14]

U novije vrijeme otkrivene su i ne-tradicionalne biljne lipoksigenaze[25,26], za koje je značajno da ne pokazuju predviđenu produktnu specifičnost, već sintetiziraju smjesu 9- i 13-hidroperoksida. Palmieri-Thiers i sur. su klonirali i karakterizirali ne-tradicionalnu lipoksigenazu Oep1LOX1 iz masline, koja pripada superobitelji LOX-1 enzima. Ispitivanja produktne specifičnosti na rekombinantnom proteinu dala su 9- i 13-hidroperokside linolne kiseline (9- i 13-*Z,E*-HPOD) u omjeru 2:1.[27] Padilla i sur. su klonirali Oep2LOX1, drugog predstavnika superobitelji LOX-1. Rezultati istraživanja produktne specifičnosti koja je provedena na ovom rekombinantnom proteinu potvrdili su da, kada se kao supstrat koristi linolna kiselina, enzim također stvara smjesu 9- i 13-hidroperoksidnih produkata, ali u omjeru

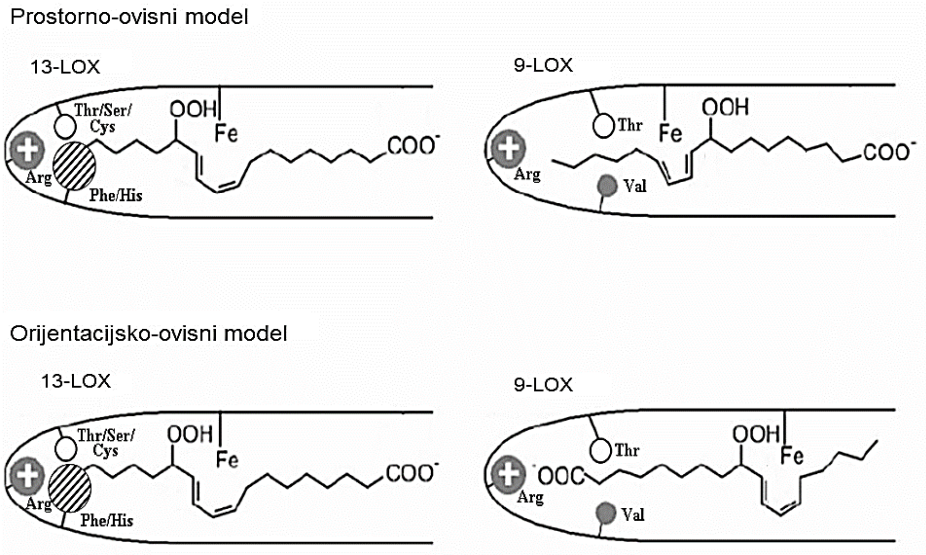
4:1 u korist 9-*Z*,*E*-HPOD.[28] Isti istraživači klonirali su i dva predstavnika superobitelji LOX-2 (Oep1LOX2 i Oep2LOX2). Ispitivanja produktne specifičnosti na rekombinantnim proteinima, predstavnicima LOX-2 superobitelji, pokazala su da enzimi sintetiziraju isključivo 13-hidroperokside masnih kiselina.[29]

2.1.1.7. Hipoteze o pozicijskoj specifičnost LOX enzima

Liavonchanka i Feussner ponudili su dva modela za razjašnjavanje pozicijske specifičnosti LOX enzima.[24]

Prostorno-ovisni model, temelji se na pretpostavci da supstrat (linolna kiselina) ulazi hidrofobnim krajem u aktivno mjesto, pri čemu stupanj njegovog prodiranja određuju aminokiselinski ostaci u aktivnom mjestu i položaj iona željeza. Kod 13-LOX enzima, pri dnu veznog džepa nalazi se visoko očuvani His ili Phe koji sterički zaklanja Arg, aminokiselinski ostatak prisutan kod svih biljnih LOX enzima u dnu veznog džepa. Stoga se supstratu onemogućuje dublje prodiranje, što za posljedicu ima da se umetanje molekule kisika odvija na udaljenijem C_{13} atomu, a kao produkt reakcije nastaje 13-hidroperoksid linolne kiseline. Međutim, u veznom džepu biljnih 9-LOX enzima na ovom mjestu nalazi se visoko očuvani Val (Val583 kod Oep1LOX1), koji sterički ne zaklanja Arg (Arg733 kod Oep1LOX1), pa supstrat prodire dublje u aktivno mjesto te se umetanje molekule kisika odvija na C_9 atomu (Slika 8.).

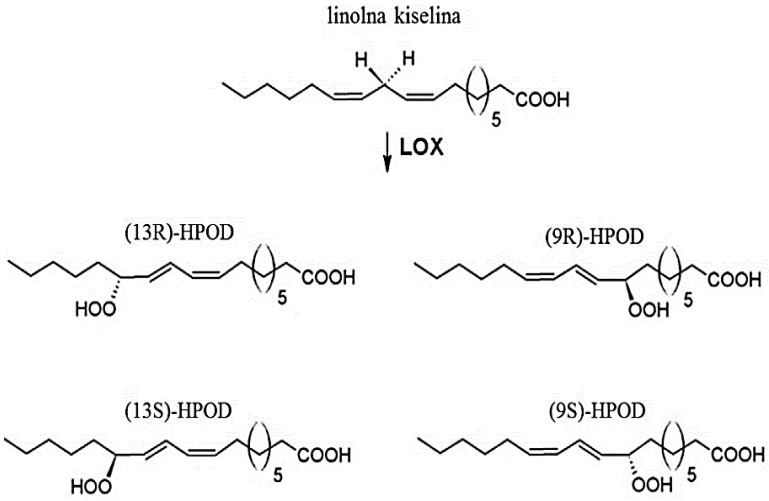
Orijentacijsko-ovisni model se temelji na pretpostavci da se kod 13-LOX enzima supstrat smješta u aktivno mjesto hidrofobnim metilnim krajem, dok se kod 9-LOX enzima smješta hidrofilnim karboksilnim krajem (Slika 8.). U ovom modelu, problem može biti visoka energetska barijera prilikom smještanja karboksilne skupine u hidrofobno okruženje veznog džepa. Pretpostavlja se da enzim snižava energetsku barijeru uspostavom ionskog mosta između Arg s dna veznog džepa i karboksilne skupine masne kiseline.[14]



Slika 8. Model aktivnog mjesta usmjeren na pozicijsku specifičnost biljnih LOX enzima. Prostorno-ovisni model temelji se na pretpostavci da supstrat uvijek u aktivno mjesto ulazi metilnim krajem. U slučaju orijentacijski-ovisnog modela, navedena pretpostavka vrijedi za 13-LOX enzim, dok se za 9-LOX enzima smatra da masna kiselina ulazi karboksilnom krajem. U oba modela dubinu ulaska supstrata kontrolira Phe ili His kod 13-LOX, odnosno Val kod 9-LOX enzima.[14]

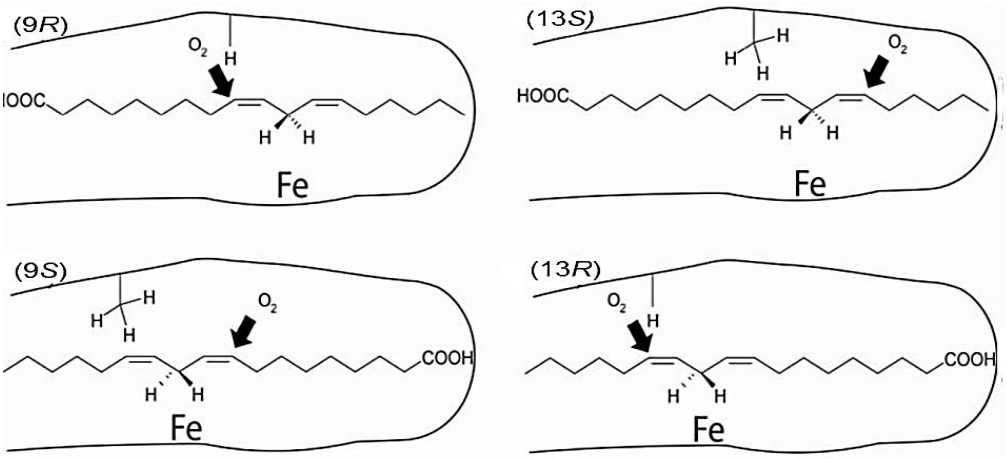
2.1.1.8. Stereokemija reakcije

LOX enzimi omogućavaju sintezu četiriju izomera, odnosno dva enantiomerna para, u strogo kontroliranoj reakciji (Slika 9.).



Slika 9. Stereokemija reakcijskog mehanizma LOX enzima.[14]

Coffa i sur. primijetili su da je samo jedan visoko očuvani aminokiselinski ostatak u aktivnom mjestu odgovoran za ovaj reakcijski korak. Kod S-specifičnih LOX enzima nalazimo u tzv. „Coffa mjestu“ očuvani Ala, dok se kod R-specifičnih LOX enzima na tom mjestu nalazi Gly. Istraživanje na LOX-1 enzimu iz soje, koji linolnu kiselinu prevodi isključivo u (13S)-HPOD, provedeno je zamjenom Ala542 s Gly, što je za posljedicu imalo oksigenaciju u požaju 13 (13S u iskorištenju od 60 %), odnosno u položaju 9 uz promjenu kiralnosti (9R) u iskorištenju od 40 %).[30] Nastalu promjenu produktne specifičnosti Coffa objašnjava modelom tzv. inverzne orijentacije supstrata. Model pretpostavlja da kod (9R)-LOX i (13S)-LOX enzima supstrat u vezni džep ulazi metilnim krajem. Kako se u „Coffa mjestu“ kod (13S)-LOX enzima nalazi Ala koji sterički ometa inserciju kisika na položaj C_9 masne kiseline, vezanje kisika usmjereno je u položaj (-2). Različito tome, kod (9R)-LOX enzima na tom mjestu nalazi se Gly koji omogućava nesmetano uvođenje molekule kisika u položaj C_9. Za razliku od spomenutih modela, model za (9S)- i (13R)-LOX enzim pretpostavlja da supstrat pristaje karboksiknim krajem u aktivno mjesto, te C_{13} položaj kod (9S)-LOX enzima sterički štiti Ala rezultirajući sintezom (9S)-HPOD (Slika 10.).[14]



Slika 10. Model aktivnog mjesta koji objašnjava stereo-specifičnost LOX enzima. Model se temelji na inverznoj orijentaciji supstrata. Kod (*S*)-LOX enzima u „Coffa mjestu“ nalazi se Ala ostatak koji sterički usmjeruje atom kisika u položaj 13 kod (13S)-LOX, odnosno u položaj 9 kod (9S)-LOX enzima. Kod (R)-LOX enzima u „Coffa mjestu“ nalazi se Gly, što omogućuje nesmetanu inserciju kisika u položaj 9 kod (9R)-LOX, odnosno u položaj 13 kod (13R)-LOX enzima.[14]

2.2. *Olea europea* L.

2.2.1. Rasprostranjenost maslina

Maslina (*Olea europea* L.) je jedna od najraširenijih kultiviranih voćaka u svijetu, te se u zadnjih četrdesetak godina utrostručilo područje uzgoja ove uljarice. U 2009. godini, po izvješću FAOSTAT-a. (engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), godišnja proizvodnja maslina u svijetu prelazila je 19 milijuna tona. Uljarsku proizvodnju predvode Španjolska, Italija i Grčka sa 72 % od ukupne svjetske proizvodnje, dok se Hrvatska smjestila na 17. mjesto s proizvodnjom nižom od 1 %. Prema najnovijim podacima danas poznajemo oko 1200 sorti maslina. Više od 90 % sorti uzgaja se u vodećim maslinarskim zemljama, od kojih po broju sorti prednjači Italija, a slijede Španjolska, Turska, Sirija, Grčka, Tunis, Alžir, Portugal i Maroko.[31]

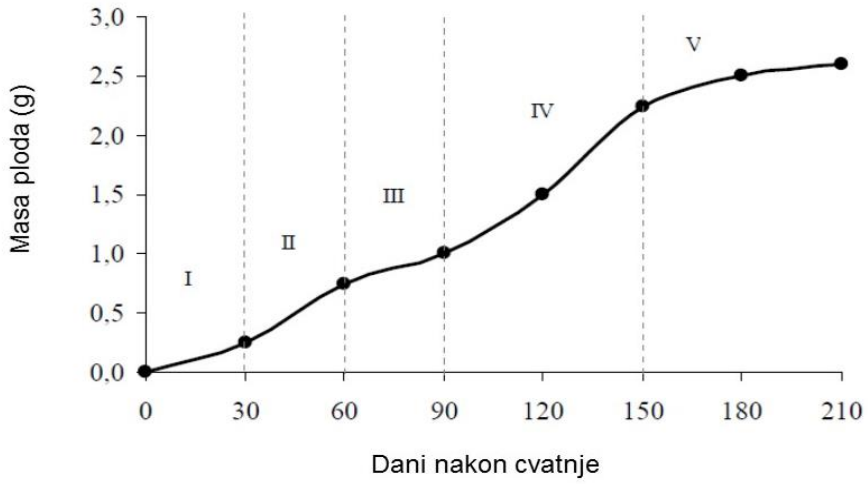
Procjenjuje se da se danas u Hrvatskoj uzgaja oko 6 milijuna stabala maslina. Uzgojno područje maslina prostire se duž 1000 km, od Savudrije na sjeveru do Prevlake na jugu. Zbog različitih uvjeta, pedoklimatskih, kulturoloških i tradicijskih, koji rezultiraju različitim sustavom gospodarenja, cijelo maslinarsko područje je podijeljeno na šest podregija. Prema strukturi sortimenata u Hrvatskoj je identificirana 61 autohtona sorta, a u svakoj podregiji postoji različita sortna struktura. Oblica je najrasprostranjenija i zastupljena je s visokih 75 % u cjelokupnom sortimentu. U području srednje Dalmacije pored Oblice, najzastupljenije sorte su Levantinka i Lastovka. Levantinka je glavna sorta otoka Šolte i prema procjeni struke zauzima 5-10 % od ukupnog broja stabala u srednjoj Dalmaciji. Sorta Lastovka uglavnom se uzgaja južno od Trogira, glavni centri uzgoja su otoci Korčula i Hvar, a u podregiji središnja Dalmacija predstavlja 5-10 % od ukupnog broja stabala.[32]

2.2.2. Razvoj i zrenje ploda masline

Plod masline je koštunica ovalnog oblika na kojoj se razlikuju tri dijela: kožica (epikarp), pulpa (mezokarp) i koštica (endokarp) u kojem se nalazi jedna ili rijetko dvije sjemenke (endosperm). U pulpi se nalazi 70-90 % ukupne težine ploda, na košticu otpada 2-27 %, dok težina sjemenke ne prelazi 3 %. Od ukupne količine ulja najviše ga ima u pulpi 96-98 %, dok se preostalih 2-4

% nalazi u koštici ploda. Svježi plod pored ulja sadrži vodu, šećere, proteine, organske kiseline, fenole i koloidne tvari.[33]

Razvoj i zrenje ploda predstavlja kombinaciju biokemijskih i fizioloških procesa karakterističnih za svaku sortu i ovisi o okološkim čimbenicima.[31] Razvojem ploda uočavaju se promjene u njegovoj veličini, sastavu, boji, teksturi, aromi i osjetljivosti na patogene. Razvoj i rast ploda odvija se kroz 4-5 mjeseci, a u tom razdoblju plod prolazi kroz 5 glavnih faza (Slika 11.).



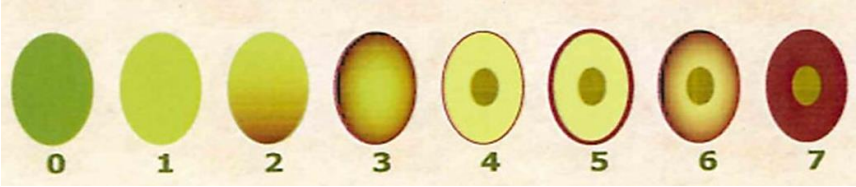
Slika 11. Faze rasta, razvoja i zrenja ploda masline. Prva faza (I) oplodnja i zametanje ploda, druga faza (II) formiranje sjemenke, treća faza (III) očvršćivanje koštice, četvrta faza (IV) razvoj pulpe i peta faza (V) zrioba.[31]

Faza oplodnje i zametanja ploda (I) traje tridesetak dana nakon cvatnje. Za ovu fazu karakteristična je nagla dioba stanica što stvara preduvjete brzog napredovanja embrija. Slijedi faza (II) razvoja sjemenke i period intenzivnijeg rasta ploda. Tijekom ove faze odvija se intenzivna dioba i rast stanica endokarpa, te manjim dijelom stanica mezokarpa. Plod usporava s rastom u trećoj fazi (III), stanice endokarpa se prestaju dijeliti i očvrsnu. Razvoj mezokarpa predstavlja dugotrajniju fazu (IV) rasta ploda koja je popraćena intenzivnim razvojem pulpe, a proširenjem postojećih stanica ostvaruju se preduvjeti za akumulacija ulja. Zadnju fazu (V) zrenja, karakterizira promjena boje ploda od zelene, preko žućkaste do crveno-ljubičaste i crne.

Ova faza traje i po nekoliko mjeseci i u njoj se, više no kod ostalih faza, ispoljavaju sortne osobine i utjecaj okolišnih čindbenika.[31]

Izbor optimalnog vremena berbe plodova maslina ima presudnu ulogu u proizvodnji ulja visoke kvalitete i zadovoljavajućeg prinosa. Kako bi se optimiziralo vrijeme berbe i u konačnom proizvodu osigurale visoke nutritivne i senzorske vrijednosti, potrebno je poznavati karakteristike zrenja ploda pojedine sorte. Zrenjem ploda nastaju promjene u težini ploda, količini i sastavu ulja, te aktivnosti enzima. Promjene u sastavu ulja nastaju zbog promjena sastava masnih kiselina, te količine polifenola, tokoferola, sterola i pigmenata. Intezitet promjena značajno je pod utjecajem okolišnh čimbenika, stoga se ista sorta različito razvija i zrije na različitim područjima uzgoja.[34]

Za određivanje optimalnog vremena berbe plodova maslina koristimo indeks stupnja zrelosti. Uceda i Frias razvili su pouzdanu i jednostavnu metodu određivanja indeksa stupnja zrelosti, koja se temelji na praćenju promjena u boji potkožice i pulpe plodova tijekom procesa zrenja (Slka 12.).[35]



Slika 12. Shematski prikaz ploda masline i pripadajućeg stupnja zrelosti. Stupnjevi zrelosti ploda (0-3) temelje se na promjeni boje potkožice. Plodovi stupnja zrelosti od 4-7 razlikuju se po obojanosti pulpe. Preuzeto sa http://www.oliveyourfavourites.com/learnmore.php.

Ulja proizvedena od plodova niskog stupnja zrelosti sadrže visoku koncentraciju fenolnih spojeva koji utječu na senzorska svojstva (pikantnost i gorčina). Ova ulja pokazuju visoku oksidacijsku stabilnost.[36–38] Više autora navodi da se najbolji rezultati u kvaliteti i količini ulja, koja se odražava u sadržaju fenolnih spojeva, poželjnih hlapljivih tvari te iskorištenju proizvodnog procesa, dobiju preradom plodova stupnja zrelosti oko 3.[39,40] Od plodova visokog stupnja zrelosti dobivaju se ulja s nižom koncentracijom ukupnih fenolnih spojeva i višestruko nezasićenih masnih kiselina.[41] Ovakve promjene u ulju značajno utječu na njegova komercijalna svojstva, snižena im je oksidacijska stabilnost i sadržaj poželnjnih hlapljivih tvari.

2.3. Djevičansko maslinovo ulje

Djevičansko maslinovo ulje dobiva se preradom plodova masline uz primjenu isključivo mehaničkih postupaka. Pravilnikom o uljima od ploda i komine maslina iz 2009. nije dozvoljena nikakva promjena prirodnog sastava ovog proizvoda[2], stoga se u djevičanskom ulju zadržavaju sva izvorna svojstva ploda masline. Ono je jedan od temelja mediteranskog tipa prehrane[42] i dobro je poznat njegov pozitivan učinak na zdravlje.[43]–[46]

2.3.1. Kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja

Kemijski gledano, djevičansko maslinovo ulje sadrži osapunjivi i neosapunjivi dio. Trigliceridi, masne kiseline od C_{14}-C_{24}, gliceridi, esteri masnih kiselina (voskovi i sterolni esteri), terpenski alkoholi i neesterificirane masne kiseline čine više od 98 % svih spojeva u ulju. Za ovu veliku grupu osapunjivih spojeva značajno je da sadrže barem jednu masnu kiselinu, koja se pri alkalnoj hidrolizi oslobađa u vidu alkalne soli, odnosno sapuna. Neosapunjivi, negliceridni dio (> 2 %) čini grupa spojeva koji su uglavnom sekundarni metaboliti i mogu koristiti u karakterizaciji ulja. Ovoj heterogenoj skupini spojeva pripadaju ugljikovodici, terpenski alkoholi, steroli, tokoferoli, fenoli, pigmenti i hlapljivi aromatski spojevi.[47,48]

Komponente maslinovog ulja koje povezujemo s posebnošću njegove prehrambene vrijednosti jesu nezasićene masne kiseline, te količina pojedinih vitamina i antioksidansa. Jednostruko nezasićena oleinska kiselina visoko je zastupljena u sastavu masnih kiselina djevičanskog maslinovog ulja, od 55 do 83 %, i jedan je od kriterija za određivanje njegove autentičnosti. U maslinovom ulju uz oleinsku kiselinu zastupljene su palmitinska, palmitoleinska, stearinska, linolna i linolenska kiselina.[49]

Djevičansko maslinovo ulje bogato je fenolnim spojevima koji djeluju kao primarni antioksidansi, sprječavajući oksidaciju ulja, i utječu na specifična senzorska svojstva što ova ulja izdvaja od ostalih biljnih ulja.[37,50] Fenolne spojeve u djevičanskom ulju dijelimo u nekoliko grupa: fenolne kiseline, fenolne alkohole, flavonoide i lignanane, te sekoiridide koji su pronađeni samo u porodici *Oleaceae*. Oleuropein, demetiloleuropein i ligstrozid su najznačajniji fenolni spojevi grupe sekoiridida, a odgovorni su za karakterističan pikantan i gorak okus djevičanskog maslinovog ulja. Plod masline, pored navedenih sadrži i jednostavne fenolne spojeve, tirosol, hidroksitirosol, glikozide flavanola i složeniji verbaskozid.[38] Maseni

udio ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima varira od 50 do1000 mg kg^{-1}.[51]

Tokoferoli su lipofilni fenolni antioksidansi, visoke efikasnosti zbog sposobnosti da doniraju vodikov atom s hidroksilne skupine, što za posljedicu ima inaktivaciju slobodnog radikala, dok se novonastali fenolatni radikal rezonantno stabilizira. Ovim mehanizmom izravno pridonose usporavanju oksidacijskog kvarenja ulja.[52] Maseni udio ukupnih tokoferola u djevičanskim maslinovim uljima kreće se u rasponu od 55 do 650 mg kg^{-1}. Unutar ove skupine lipofilnih tvari s vitaminskim i antioksidacijskim djelovanjem najzastupljeniji je α-tokoferol (oko 90 %). U djevičanskom maslinovom ulju, u manjoj koncentraciji, prisutni su i njegovi izomerni oblici β-, γ- i δ- tokoferol.[53]

2.3.2. Fizikalno-kemijske vrijednosti djevičanskog maslinovog ulja

Poražavajući je podatak iznio Luchetti, po kojemu je samo 6 % tadašnje godišnje proizvedenog ulja u Svijetu pripadalo u skupinu ekstra djevičanskog maslinovog ulja.[54] U svrhu utvrđivanja kvalitete i čistoće maslinovog ulja, provode se fizikalno-kemijske analize parametara po kojima se maslinovo ulje klasificira prema propisanim vrijednostima koje je uspostavila Europska komisija (EC Reg No 1989/2003).[55] Međunarodno vijeće za maslinovo ulje u propisu "Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils" (COI/T.15/NC No 3/Rev. 7, 2012) propisalo je opće zahtjeve kakvoće ulja od ploda i komine masline koja se stavljaju na tržište radi prodaje krajnjem potrošaču[56] (Tablica 1.).

Tablica 1. Kriteriji kvalitete maslinovog ulja prema COI "Trgovački standardi za maslinovo ulje i ulje komine masline", COI/T.15/NC No 3/Rev. 7, 2012.[56]

	Slobodne masne kiseline %	Peroksidni broj		K_{232}	K_{270}	Senzorska ocjena	
		$mmol.O_2\ kg^{-1}$	$mekv.O_2\ kg^{-1}$			mane	voćnost
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	< 0,8	≤ 10	≤ 20	≤ 2,5	≤ 0,22	0	> 0
Djevičansko maslinovo ulje	≤ 2,0	≤ 10	≤ 20	≤ 2,6	≤ 0,25	≤ 3,5	> 0
Maslinovo ulje „lampante"	> 2,0	-	-	-	-	> 3,5	-

Maslinovo ulje "lampante" - djevičansko ulje neprihvatljivih organoleptičkih svojstava (senzorska ocjena: uočljive mane, utvrđeno panel testom) i/ili sadržajem slobodnih masnih kiselina višim od 2,0 % oleinske kiseline. Nije za konzumaciju.

2.3.2.1. Slobodne masne kiseline

Slobodne masne kiseline, nastaju hidrolitičkim djelovanjem lipaza prisutnih u plodu masline. Lipaze cijepaju trigliceride što za posljedicu ima povećanje koncentracije ukupnih masnih kiselina i promjenu okusa ulja. Ulja dobivena od zdravih plodova imaju niski sadržaj SMK, za razliku od ulja dobivenih preradom oštećenih plodova, npr. napadom maslinove muhe (*Bactrocera oleae*), ili neadekvatnim rukovanjem i duljim skladištenjem prije prerade.[53] Sadržaj ukupnih masnih kiselina izražava se kao postotak slobodne oleinske kiseline.

2.3.2.2. Peroksidni broj

Određivanje peroksidnog broja, daje nam uvid u stupanj oksidacije ulja. Peroksidni broj, predstavlja količinu tvari u uzorku, koja oksidira kalijev jodid u propisanim uvjetima, a izražava se u milimolima (ili miliekvivalentima) aktivnog kisika po kilogramu ulja. Izlaganjem ulja atmosferilijama, prvenstveno kisiku, započinje proces oksidacije, koji se očituje uvođenjem molekule kisika u višestruko nezasićene masne kiseline što za posljedicu ima nastajanje odgovarajućih hidroperoksidnih spojeva. Mehanizam ove reakcije uključuje nastanak slobodnih radikala i odvija se kroz tri standardna koraka, inicijacija, propagacija i terminacija. Oksidacijski kapacitet ulja očituje se u sposobnosti ulja da odolijeva oksidacijskim promjenama.[38] Prisutnost antioksidansa (fenolni spojevi) pridonosi oksidacijskoj stabilnosti maslinovog ulja.[57]

2.3.2.3. Apsorbancija u UV području

Određivanjem apsorbancije u UV području dobije se informacija o stupnju oksidacije ulja. Apsorpcija propisane valne duljine posljedica je prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih spojeva. Apsorpcija u UV području kod valne duljine od 232 nm uzrokovana je nastankom hidroperoskida te ova reakcija predstavlja prvi stupanj oksidacije ulja. Apsorbancija na valnoj duljini od 270 nm uzrokovana je nastankom karbonilnih spojeva uslijed kidanja lanaca masnih kiseline na mjestu vezivanja kisika, što predstavlja drugi stupanj oksidacije ulja.

Kod valne duljine od 270 nm apsorbiraju i konjugirani trieni koji nastaju pri rafiniranje ulja. Stoga, povećana apsorbancija na 270 nm može ukazati na moguće miješanje maslinovog ulja s rafiniranim uljem.[58]

2.4. Hlapljive tvari u djevičanskim maslinovim uljima

Delikatan miris maslinovog ulja (voćnost) pripisuje se hlapljivim tvarima koje nastaju tijekom i nakon ekstrakcije ulja iz ploda maslina.[3] Udisanjem i/ili konzumacijom DMU, hlapljive tvari prelaze u olfaktorni epitel nosne šupljine, vežu se za proteinske receptore i daju osjet mirisa.[4]

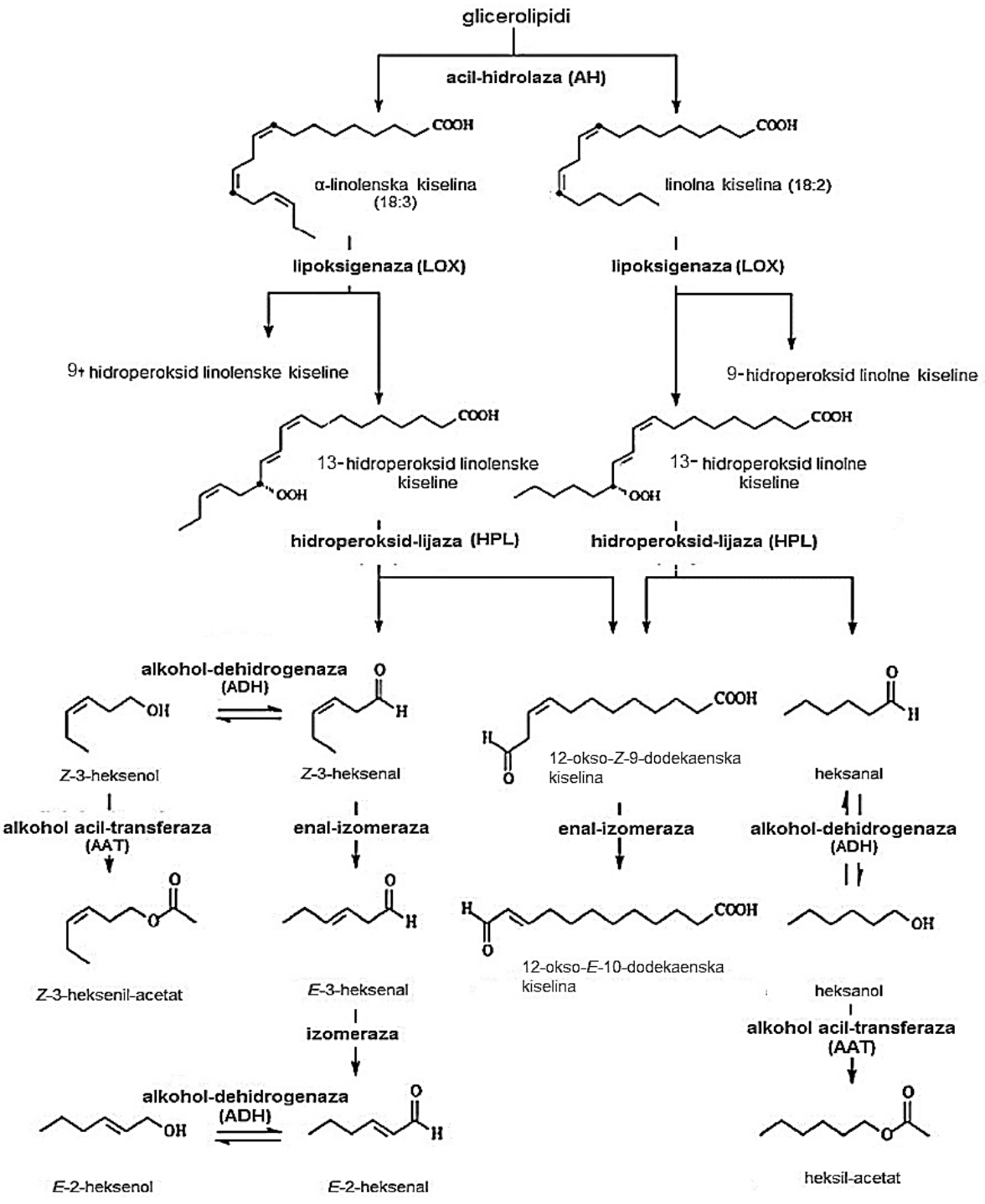
Za miris maslinovog ulja zaslužna je kompleksna mješavina koju čini više od 120 spojeva niske molekulske mase (> 300 Da) koji brzo hlape na sobnoj temperaturi.[4,5,59] Većina hlapljivih tvari koje pridonose mirisu ulja pripada aldehidima, alkoholima, esterima, ugljikovodicima, ketonima i furanima. Među spomenutim spojevima najzastupljenije su dvije grupe spojeva, C_6 i C_5 hlapljivi spojevi. Analiza hlapljivih tvari provedena na maslinovim uljima različitih talijanskih i španjolskih sorti pokazala je da C_6 aldehidi (heksanal, *Z*-3-heksenal, *E*-2-heksenal), C_6 alkoholi (heksanol, *Z*-3-heksenol, *E*-2-heksenol) i njihovi acetatni esteri (heksil-acetat i *Z*-3-heksenil-acetat) čine 60 do 80 % ukupnih hlapljivih tvari.[6] Isto takvo istraživanje, provedeno na autohtonim sortnim uljima Istre i srednje Dalmacije, ukazalo je na visoki udio C_6 hlapljivih tvari, od kojih je najzastupljeniji *E*-2-heksenal.[60,61]

Sadržaj hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju značajno ovisi o sorti, stupnju zrelosti ploda, geografskom području uzgoja, agronomskim faktorima, te o načinu prerade plodova.[40,48]

Utjecaj sorte i stupnja zrelosti na sadržaj hlapljivih tvari, predmet su brojnih istraživanja s ciljem poboljšanja kvalitete djevičanskih maslinovih ulja.

2.4.1. Lipoksigenazni put

Hlapljive tvari s poželjnim mirisnim svojstvima nastanu u nizu biokemijskih reakcija poznatim kao lipoksigenazni put (LOX put). Enzimi LOX puta oslobađaju se tijekom procesa prerade nakon što se ošteti tkivo ploda masline. Enzimski LOX put započinje acil-hidrolazom (AH) koja oslobađa kiseline iz glicerolipida, zatim lipokisgenaza (LOX) oksidira dvostruko i višestruko nezasićene masne kiseline do hidroperoksida, koje potom cijepa hidroperoksid-liaza (HPL) čijim djelovanjem nastaju hlapljivi aldehidi. Aldehidi se reduciraju u alkohole djelovanjem alkohol-dehidrogenaze (ADH), a acil-transferaza (ATT) ih prevodi u odgovarajuće estere[3,62] (Slika 13.).



Slika 13. LOX put, shematski prikaz enzimski kataliziranе sinteze tvari s poželjnim mirisnim svojstvima u djevičanskom maslinovom ulju.[62]

2.4.2. Enzimi LOX puta

Da bi se osigurali uvjeti za djelovanje LOX enzima, neophodna je prethodna aktivacija acil-hidrolaze (AH). Lipolitička skupina acil-hidrolaza uključuje lipaze, fosfolipaze i galaktolipaze. AH hidrolizira trigliceride i fosfolipide, oslobađaju se masne kiseline, od kojih su dvostruko i višestruko nezasićene linolna (18:2) i linolenska (18:3) kiselina preteče poželjnih hlapljivih C_6 tvari. Panzanaro i sur. pratili su enzimsku aktivnost tijekom procesa zriobe ploda maslina i ustanovili da enzim pokazuje različitu aktivnost ovisno o fazi zrenja ploda. Porast enzimske aktivnosti uočava se porastom stupnja zrelosti ploda i najviši je u razdoblju tamnjenja ploda, dok se u završnoj fazi zrenja, kod prezrelih plodova, opaža pad aktivnosti. Obzirom da dva izvora navode različite pH vrijednosti kod kojih enzim postiže najvišu aktivnost, pretpostavlja se da su u maslinama zastupljene kisela i bazična izoforma.[63,64]

Djelovanjem LOX enzima u strogo kontroliranoj prostorno i stereo-specifičnoj reakciji nastaju odgovarajući hidroperoksidi masnih kiselina. Iz ploda masline izolirane su četiri izoforme LOX enzima, po dva predstavnika LOX-1 i LOX-2 superobitelji. Izoforme LOX-1 razlikuju se po afinitetu prema linolnoj kiselini i sintetiziraju 9- i 13-*Z,E*-HPOD u omjeru 2:1, odnosno 4:1, dok oba predstavnika LOX-2 superobitelji pokazuju veći afinitet prema linolenskoj kiselini, te je dominantniji produkt 13-hidroperoksid masnih kiselina. Ispitivanje termičke stabilnosti enzima uključenih u sintezu hlapljivih tvari u plodu masline, proveli su Luaces i sur. te su prijavili prisutnost termostabilne i termolabilne lipoksigenaze.[11] Padilla i sur. potvrdili su u radu s rekombinantnim proteinima da termolabilni enzim pripada skupini LOX-1, dok dva termostabilna enzima pripadaju LOX-2 superobitelji.[65] Na prisutnost izoenzima upućivali su i rezultati ispitivanja enzimske aktivnosti kod različitih pH vrijednosti.[66] LOX enzim pokazuje aktivnost u širokom rasponu pH vrijednosti od 4,5 do 8,5, dok najviše autora prijavljuje maksimalnu enzimsku aktivnost kod pH 6,0.[17,64,67]

Pored ovog glavnog djelovanja, LOX enzim može cijepati nastale hidroperokside masnih kiselina, a oslobođeni alkoksi radikali sudjeluju u kemijskim reakcijama čiji su produkti C_5 hlapljive tvari kao što su pentanal, *E*-2-pentenal, 1-penten-2-ol, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, *Z*-2-penten-1-ol i *E*-2-penten-1-ol. Od navedenih spojeva, jedino 1-penten-3-on samostalno doprinosi poželjnim mirisnim svojstvima DMU, dok ostali C_5 spojevi doprinose aromi kroz sinergijski učinak s drugim hlapljivim spojevima.[62]

Hidroperoksid-lijaza (HPL) katalizira cijepanje hidroperoksida masnih kiselina oslobađajući hlapljive aldehide i okso-kiseline. Cijepanjem 13-hidroperoksida linolne ili linolenske kiseline, HPL oslobađa C_6 aldehide i C_{12} ω-okso-kiseline, dok se cijepanjem 9-hidroperoksida ovih masnih kiselina oslobađaju C_9 aldehidi i C_9 ω-okso-kiseline. U biljnom svijetu, najzastupljenija je izoforma HPL koja pokazuje supstratnu specifičnost prema 13-hidroperoksidima masnih kiselina. Ova izoforma odgovorna je za poželjne "zelene" mirise djevičanskog maslinovog ulja[68] Cijepanjem 13-hidroperoksida masnih kiselina oslobađaju se C_6 aldehidi, zasićeni heksanal iz linolne i nezasićeni *Z*-3-heksenal iz linolenske kiseline. *Z*-3-heksenal nestabilan je i brzo izomerizira u stabilniji *E*-2-heksenal, a reakciju katalizira *Z*-3-*E*-2-enal izomeraza.[69] Istraživanje u kojemu je praćena aktivnost enzima u razdoblju od 13 do 34 tjedna nakon cvatnje, pokazalo je visoku aktivnost enzima HPL u zelenim maslinama ranog stupnja razvoja, daljnjim razvojem ploda aktivnost je blago opadala da bi se njen ponovni rast zabilježilo tijekom zriobe.[70] Izneseni podaci upućuju da razina aktivnosti enzima HPL nije ograničavajući faktor u sintezi hlapljivih aldehida, a razlog opadanja C_6 hlapljivih tvari u uljima dobivenih iz zrelih plodova maslina trebalo bi tražiti u količini raspoloživog supstrata, odnosno13-hidroperoksida linolne i linolenske kiseline. Salas i sur. su prijavili veću supstratnu specifičnost HPL enzima (oko 30%) prema 13-*Z*,*E*-hidroperoksidu linolne u usporedbi s 13-*Z*,*E*,-hidroperoksidom linolenske kiseline. Kao i LOX, HPL pokazuje najvišu aktivnost kod pH 6,0.[70] Hidroperoksid-lijaza je termolabilan enzim; maksimalna enzimska aktivnosti prijavljena je na temperaturi od 15 °C, te se povećanjem temperature iznad 35 °C snižava enzimska aktivnost. Ispitivanje promjene aktivnosti enzima LOX i HPL prilikom izlaganja plodova visokim temperaturama, ukazalo je na djelomičnu enzimsku inaktivaciju kod temperature iznad 60 °C, što se manifestiralo kao redukcija sinteze poželjnih C_6 i C_5 spojeva.[71]

Alkohol-dehidrogenaza (ADH) katalizira reverzibilnu redukciju alifatskih aldehida u alkohole. Enzim je rasprostranjen u biljnom carstvu i zaslužan je za nastanak hlapljivih alkohola koji doprinose aromi biljnih proizvoda. Iz ploda masline izolirana su tri izoenzima, jedna NAD^+-ovisna ADH i dvije $NADP^+$-ovisne ADH. Ispitivanje kinetičkih parametara izdvojilo je $NADP^+$-ADH II kao izoformu koja pokazuje visoki afinitet prema aldehidima iz LOX puta. Salas i Sanchez pratili su aktivnosti $NADP^+$-ADH II tijekom razvoja i zrenja ploda masline. Najvišu enzimsku aktivnost zabilježili su u zelenim plodovima, u razdoblju kada se akumulira više od polovice ulja, a slijedi opadanje aktivnosti tijekom zrenja kada se boja ploda mijenja u ljubičastu.[72] Ovo podupiru analitička opažanja opadanja razine C_6 alkohola u DMU tijekom

dozrijevanja ploda. ADH zadržava aktivnost u širokom rasponu pH vrijednosti od 5,0 do 8,5 s optimalnom vrijednošću kod 6,8.[64]

Alkoholi nastali djelovanjem ADH mogu se prevesti u hlapljive estere. Jednu od tih reakcija katalizira alkohol acil-transferaza (AAT). AAT katalizira reakciju sinteze acetatnih estera uz pomoć derivata acetil-CoA. Hlapljivih estera u DMU ima znatno manje u usporedbi s hlapljivim aldehidima i alkoholima, međutim važan je njihov doprinos mirisnim svojstvima. U maslinovom ulju, etil-propionat i heksil-acetat su značajne komponente slatkih i voćnih mirisnih svojstava.[68,69] AAT iz maslina ne pokazuje aktivnost prema metanolu i etanolu, dok slabu aktivnost pokazuje koristeći butanol i 3-metilbutanol kao supstrat.[68] Salas je ovaj nedostatak enzimske aktivnosti prema alkoholima kratkog lanca, ponudio kao objašnjenje za nisku koncentraciju heksil-acetata u uljima, iako njegove preteče (heksanol, *Z*-3-heksenol i *E*-2-heksenol) prevladavaju među hlapljivim alkoholima.[72] Budući da raniji enzimi LOX puta osiguravaju visoku količinu C_6 hlapljivih alkohola, AAT predstavlja usko grlo, a njihovo nakupljanje može se smatrati odgovorno za izražene travnate i nepoželjne užegle note maslinovog ulja.[9] Supstratnu specifičnost ATT enzim pokazuje prema heksanolu i *Z*-3-heksenolu, dok je slabije izražena prema *E*-2-heksenolu. Istraživanja u kojima je praćena aktivnost AAT tijekom zrenja ploda nisu do sada prijavljena, mada je zamijećeno da ulja dobivena preradom plodova višeg stupnja zrelosti sadrže veće koncentracije hlapljivih estera.[73] Enzim pokazuje aktivnost u neutralnom i blago lužnatom području kod pH 7,5.[9] Maksimalnu aktivnost AAT pokazuje pri temperaturi od 35 °C.[64]

Budući su hlapljivi esteri odgovorni za poželjne, voćne i slatke mirise, prilikom proizvodnje ulja potrebno je osigurati uvjete pri kojima bi AAT bila što aktivnija. Savjetuje se modificiranje proizvodnog procesa preradom plodova na nižim temperaturama kako bi se spriječila inaktivacija enzima i povećala esterifikacija. Povećanje aktivnosti AAT moguće je izvesti i kroz selekciju sorti.[9,74] Studija sastava hlapljivih tvari, provedena na talijanskim, španjolskim i marokanskim ekstra djevičanskim uljima pokazala je visoku zastupljenost C_6 hlapljivih tvari u talijanskim sortnim uljima, ali i nedostatak estera (etil-izobutirat, etil-butirat, etil-2-metilbutirat, etil-3-metilbutirat) zaslužnih za voćna mirisna svojstva, kojima su bogata marokanska ulja.[75]

LOX put odgovoran je za nastanak hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju. Njegovo poznavanje važno je za poboljšanje senzorskih svojstava ovog proizvoda. Poticanje

aktivnosti ili inhibicija enzima u određenoj fazi LOX puta rezultira povećanjem koncentracije poželjnih hlapljivih spojeva, međutim prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina iz 2009. te se metode ne smiju primjenjivati u proizvodnji ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Poznavanje aktivnosti enzima uključenih u LOX put, osobito lipoksigenaze, tijekom zrenja ploda, njene uloge tijekom dobivanja ulja kao i njene ovisnosti o sortnim karakteristikama, put su do djevičanskih maslinovih ulja poželjnih senzorskih svojstava.

2.5. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti plodova na aktivnost LOX enzima

Dosadašnja, malobrojna istraživanja u kojima je praćena aktivnost LOX enzima tijekom razvoja i zrenja ploda dala su kontradiktorne rezultate. Salas i sur. prijavili su veću aktivnost enzima u plodovima niskog stupnja razvoja, 13.-ti tjedan nakon oprašivanja. Ovako visoku aktivnost LOX enzima u ranoj fazi razvoja ploda, ovi istraživači su povezali s fiziološkim odgovorom enzima na stres, kojega nisu dodatno opisali. Kontinuirani pad enzimske aktivnosti, u vrijeme prerade plodova u razdoblju od 25 do 35 tjedna, povezuju s padom koncentracije C_6 hlapljivih spojeva zabilježenim u većini DMU.[18] U vremenskom razdoblju od 13. do 35. tjedna, Criado i sur. su pratili promjene u koncentraciji pigmenta i aktivnosti LOX enzima u plodu. Udio ukupnih pigmenata, naročito klorofilnih, smanjuje se dozrijevanjem plodova. Ispitivanje je provedeno na sortama Arbequina i Farga i vidljiv je utjecaj sorte na aktivnost enzima. Kod sorte Arbequina, enzimska aktivnost blago raste u crnim plodovima maslina, dok je kod sorte Farge zabilježen kontinuiran pad aktivnosti.[76] Rezultati istraživanja aktivnosti LOX enzima tijekom razvoja i zrenja ploda masline, provedenog na četiri sorte, Sabina (Korzika), Germaine (Korzika), Leccino (Italija) i Arbequina (Španjolska), bilježili su očekivane razlike enzimske aktivnosti lipoksigenaze u pojedinim sortama. Najviša aktivnost izmjerena je u sorti Leccino (783 nmol min^{-1} mg^{-1}), slijede Arbequina (549 nmol min^{-1} mg^{-1}) i Sabina (554 nmol min^{-1} mg^{-1}), te Germaine (217 nmol min^{-1} mg^{-1}). Navedene su sorte u različito vrijeme dosegle maksimalnu enzimsku aktivnost, ali značajno je da je najviši porast enzimske aktivnosti kod ispitivanih sorti zabilježen u fazi zrenja kada se boja ploda mijenja iz zeleno-žute u crveno-ljubičastu. Budući su sorte uzgojene u istom nasadu, a plodovi brani u istoj fazi razvoja (stupnju zrelosti), razlike u enzimskoj aktivnosti mogu se pripisati sortnim karakteristikama.[13] U prilog utjecaju sorte na aktivnosti LOX enzima idu ispitivanja na talijanskim sortama Ghiaccilo i Nostrana, te se i ovdje jasno uočava razlika u enzimskoj

aktivnosti lipoksigenaze među sortama.[77] Istraživanja Palmieri-Teris i sur. te Padilla i sur. rezultirala su spoznajom da se u razdoblju zriobe maslina povećava ekspresija barem dva od četiri gena za LOX enzim.[27,29] Njihovim se produktima obogaćuje LOX put, što bi moglo utjecati i na veću koncentraciju hlapljivih spojeva u ulju.

O aktivnosti LOX enzima, kao i promjenama u njegovoj aktivnosti tijekom razdoblja zriobe plodova maslina, kod hrvatskih autohtomih sorti nema literaturnih podataka.

2.6. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti na količinu ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima

Tous i sur. i Gallina-Toschi i sur., neovisno jedni o drugima, potvrdili su da je sorta u najvećoj mjeri odgovorna za udio ukupnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju.[78] Iz dvije nezavisne studije sastava fenolnih tvari u DMU hrvatskih sorti uočava se značajna razlika u sastavu i masenim udjelima fenolnih spojeva[49,79] Ispitivanja provedena na Oblici i Leccinu ukazuju da povećanjem stupnja zrelosti ploda udio hidrofilnih fenolnih spojeva i α-tokoferola u ulju opada.[37] Brkić Bubola potvrđuje u svom radu pad masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva u ulju kasnog roka berbe, što je u podudarnosti s rezultatima ranijih istraživanja na sortama Buža, Bianchera i Leccino.[80,81] Istraživanje koje su proveli Kalua i sur., odredivši sastav fenolnih spojeva u uljima različitih stupnjeva zrelosti, ukazalo je da ulja dobivena preradom plodova niskog stupnja zrelosti sadrže viši maseni udio tirosola i derivata oleuropeina.[82] Pad udjela ukupnih secoiridoida tijekom zriobe zabilježili su Bonoli i suradnici.[83] Ovi autori navode kako udio ukupnih sekoiridida prati udjele ukupnih fenola, iako unutar skupina postoje razlike ovisno o stupnju zrelosti ploda. Snižavanje udjela ukupnih fenolnih spojeva tijekom perioda sazrijevanja zabilježeno je i kod DMU sorte Chemlal.[84]

Biokemijske promjene koje se odvijaju tijekom zrenja ploda masline, odražavaju se na udio i sastav fenolnih spojeva.

2.7. Utjecaj ukupnih fenolnih spojeva na aktivnost LOX enzima i sastav hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima

De Gregorio i sur. ponudili su objašnjenje za porast aktivnosti LOX enzima tijekom razvoja i zrenja ploda. Uz enzimsku aktivnost pratili su i promjene masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva u plodu sorte Kalamata. Najviši porast enzimske aktivnosti uočava se u vrijeme kada u plodu opada udio fenolnih spojeva, što oni dovode u vezu s njihovim inhibicijskim djelovanjem na enzim.[66] Naime, poznato je da tijekom zriobe ploda masline, količina fenolnih spojeva u plodu i ulju opada (Poglavlje 2.6). Majetić Germak i sur. su proučavali utjecaj egzogenih fenolnih spojeva iz ploda masline na sintezu hlapljivih tvari u DMU. Dodatkom fenolnih spojeva u maslinovo tijesto sorte Buža, značajno je smanjio maseni udio *Z*-3-heksenala i heksenala, te *E*-2-heksenola i heksanola. Moguće objašnjenje snižavanja vrijednosti udjela navedenih C_6 aldehida i alkohola, ovi autori vide u nižoj aktivnosti LOX enzima, što za posljedicu ima usporavanje cijelog LOX puta.[85]

O utjecaju ukupnih fenolnih spojeva na aktivnost LOX enzima tijekom perioda zriobe plodova maslina, kod hrvatskih autohtomih sorti nema literaturnih podataka.

2.8. Utjecaj LOX enzima na sastav hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima

Uloga lipoksigenaze, prvog enzima u kaskadnom LOX putu, jest sinteza hidroperoksida masnih kiselina. Njenom aktivnošću se osiguravaju supstrati za sintezu alkohola, prvih hlapljivih tvari s poželjnim mirisnim svojstvima u LOX putu. Na ekspresiju i aktivnost LOX enzima pored sorte utječe i stupanj zrelosti ploda.[86] Očita veza između aktivnosti LOX enzima i sinteze hlapljivih tvari nije često bila predmet proučavanja. Razlog tome možemo tražiti u propisima (Codex Alimentarius, EU-propisi i propisi Republike Hrvatske) koji zabranjuju dodatak bilo kakvih tvari u postupku dobivanja DMU.

Ispitivanje provedeno na tri talijanske sorte, koje je uključivalo određivanje enzimske aktivnosti lipoksigenaze u plodu i analizu C_6 i C_5 hlapljivih komponenti u ulju, ukazalo je na pozitivnu korelaciju između enzimske aktivnosti i sinteze poželjnih hlapljivih tvari. Sorte su se među sobom razlikovale po aktivnosti LOX enzima i sadržaju hlapljivih tvari. U sorti FS17 izmjerena je najviša enzimska aktivnost i najviši maseni udio hlapljivih tvari, dok je sorta

Ascolanta Tenera pokazala znatno nižu aktivnost LOX enzima i niži sadržaj hlapljivih tvari. Između ove dvije sorte, smjestila se sorta Kalamata. Korelaciju između sadržaja C_6 i C_5 hlapljivih tvari i aktivnosti LOX enzima, Ridolfi i sur. navode kao dokaz o sudjelovanju ovog enzima u sintezi poželjnih hlapljivih tvari u DMU.[17] U prilog prethodnom istraživanju idu rezultati eksperimenta osmišljenog kako bi se pobliže razjasnila uloga LOX enzima u sintezi poželjnih hlapljivih tvari. Uspoređivao se sadržaj hlapljivih tvari iz dva uzorka ulja Tuniske sorte Chetoui. Jedan uzorak ulja dobiven je standardnim načinom, dok je u drugo maslinovo tijesto dodan egzogeni LOX enzim (13-LOX iz soje). Viši sadržaj hlapljivih spojeva kao što su *E*-2-heksenal, *Z*-3-heksenal, 2-*E*-heksen-1-ol i 6-metil-5-heptan-2-on, koji doprinose svježem i voćnom mirisu, detektiran je u ulju dobivenom uz dodatak egzogenog enzima.[87] Ideju prethodnog eksperimenta oplemenila je grupa istraživača s ciljem da se ponude dokazi kako i u kojem dijelu proizvodnog ciklusa aktivnost LOX enzima predstavlja ograničavajući faktor u sintezi hlapljivih tvari u DMU. U tu svrhu, odvojeno su ispitana dva utjecaja. Prvi je izazvan dodatkom egzogenog LOX enzima (13-LOX iz soje), a drugi inhibitora (derivat fenola) u maslinovo tijesto tijekom mljevenja i miješanja kod sorti Arbequina i Picula. Aktivnost lipoksigenaze kao ograničavajućeg faktora u sintezi hlapljivih tvari bila je izraženija kod sorte Picula, ulja koje je sadržavalo manji maseni udio poželjnih hlapljivih tvari od ulja sorte Arbequina. Dodatak inhibitora za vrijeme mljevenja plodova, odrazio se na sniženje aktivnosti lipoksigenaze, a time i masenih udjela hlapljivih tvari u dobivenim uljima. Većina poželjnih hlapljivih tvari sintetizira se već u tom početnom koraku prerade.[88]

O utjecaju aktivnosti LOX enzima na sastav hlapljivih tvari u razdoblju zriobe plodova maslina, kod hrvatskih autohtonih sorti nema literaturnih podataka.

2.9. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti na sastav hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima

Poznavanje osobina neke sorte maslina i pripadajućeg maslinovog ulja, važno je zbog odabira optimalnog vremena berbe plodova, kao i zbog osobina ulja po kojima je ono specifično i razlikuje se od ulja neke druge sorte. Ovakva ulja imaju poseban značaj u očuvanju bioraznolikosti autohtonih sorti, dodanu vrijednost na tržištu te predstavljaju izuzetan doprinos turističkoj i gastronomskoj ponudi.[89] Ispitivanja sastava hlapljivih tvari u sortnim uljima predmet su interesa u maslinarskim zemljama, prvenstveno Španjolskoj, Italiji, Tunisu,

Portugalu i Grčkoj. Već je spomenuto da u europskim DMU dominira *E*-2-heksenal.[5,90] Angerosa i sur., pretpostavljaju da se uvidom u maseni udio *E*-2-heksenala mogu razlikovati ulja pojedinih sorti.[91] Usporedbom hlapljivih tvari u talijanskim sortnim uljima utvrđeni su različiti maseni udjeli *E*-2-heksenala, vrijednosti su mu se kretale u širokom rasponu od 2,74 do 144,79 mg kg^{-1}.[92] Karakterizacijom 39 sortnih ulja dobivenih preradom plodova ubranih u istom nasadu i istog stupnja zrelosti, te prerađenim jednakim postupkom, utvrđena je jasna razlika u sastavu hlapljivih tvari analiziranih ulja. Iako su ulja pojedine sorte karakterističnog sastava hlapljivih tvari, Luna i sur. dijele ih u dva klastera: prvi obuhvaća ulja bogatija C_6 alkoholima (heksan-1-ol i *Z*-3-heksen-1-ol) s niskim sadržajem *E*-2-heksenala, a u drugom su ulja u kojima dominira *E*-2-heksenal, s nižim sadržajem C_6 alkohola.[93] Hlapljive spojeve u uljima dalmatinskih sorti Krvavica, Lastovka, Levantinka, Mašnjača i Oblica ispitala je Šarolić. Ispitivana sortna ulja imala su različite profile hlapljivih tvari, a zajednička osobina im je visoka zastupljenost *E*-2-heksenala. Nadalje navodi da je odsustvo *Z*-3-heksenala karakteristika ulja Lastovke, dok je odsustvo heksanala karakteristika ulja Levantinke.[79]

Da bi se potpunije opisao utjecaj sorte na sastav hlapljivih tvari, trebalo bi istraživanje provoditi kroz razdoblje zrenja plodova maslina, kako bi se uzeo u razmatranje i način zriobe koja ovisi o klimatskim i okolišnim uvjetima, a ujedno je neodvojiva od enzimske aktivnosti u plodu. Angerosa i Basati su prijavili da većina C_6 hlapljivih aldehida doseže svoj maksimum u razdoblju promjene boje potkožice ploda iz zeleno-žute u ljubičastu, a napredovanjem zriobe bilježe gubitak inteziteta svježih i zelenih mirisnih svojstava. Isti autori navode da je u ranijim razdobljima berbe sadržaj C_6 aldehida usporediv sa sadržajem C_6 alkohola.[94] S navedenim trendom promjene masenih udjela glavnih hlapljivih tvari europskih DMU, ne slažu se svi autori. Aparico i Morales zabilježili su konstantan pad masemog udjela *E*-2-heksenala povećanjem stupnja zrelosti ploda, kod tri od četiri ispitivane sorte, dok je kod sorte Coratina udio *E*-2-heksenala oponašao sorte koje su prethodno opisali Angerosa i Basti. Nadalje, Aparico i Morales su utvrdili snižavanje masenih udjela većine C_6 aldehida, iznimku je predstavljao *E*-3-heksenal, naime napredovanjem zriobe plodova zabilježili su linearni porast njegovog masenog udjela u DMU.[73] Kalua i sur. navode da pad udjela C_6 aldehida iz LOX puta, do kojega dolazi povećanjem stupnja zrelosti plodova, nije karakteristika svih sortnih ulja.[3] Do istog zaključka došli su Benincasa i sur. Zapazili su da sadržaj *E*-2-heksenala raste dozrijevanjem sorte Nocellara de Belice, dok kod sorte Coratina pokazuje obrnuti trend. Razlike su primijetili i u sadržaju heksanola koji se u sortnom ulju Nocellara de Belice dozrijevanjem

snižava, dok je u sortnom ulju Coratina zabilježen suprotan trend.[95] Aparico i Morales kao glavne hlapljive komponente dozrijevanja u plodovima niskog stupnja zrelosti (zeleno obojene potkožica) izdvajaju heksanal, *E*-3-heksen-1-ol, *Z*-3-heksen-1-ol i *E*-2-heksen-1-ol, za sredinu perioda zriobe (2/3 purpurno obojena potkožica) karakterističan je porast masenog udjela heksil-acetata, dok ulja dobivena preradom prezrelih plodova (ljubičasto obojena potkožica i pulpa) pokazuju veći sadržaj *E*-3-heksenala.[73] Kalula i sur. heksanol i 1-penten-3-ol povezuju ne samo s karakterizacijom dozrijevanja već i sa sortom.[82]

Pored stupnja zrelosti ploda maslina sorte Koroneiki, za sastav hlapljivih tvari u ulju važnu ulogu ima geografsko područje uzgoja.[8] Međutim, drugačije su zaključili Angerosa i sur. uspoređujući sastav hlapljivih tvari u sortama Picula i Koroneiki uzgajanim na dva udaljena geografska područja.[91] Po sadržaju hlapljivih tvari ova ulja se značajno ne razlikuju. Isti autori navode da različite sorte izložene istim klimatskim i okolišnim uvjetima daju ulja s različitim sadržajem hlapljivih tvari. Istraživanje na istarskim sortama Buža, Črne i Rosinjola, potvrdilo je *E*-2-heksanal kao najzastupljeniju hlapljivu tvar, dok su maseni udjeli estera bili niski. Utjecaj stupnja zrelosti plodova na maseni udio ukupnih aldehida, alkohola, estera i ketona bio je specifičan za svaku pojedinu sortu te je ovisio i o klimatskim uvjetima u godini berbe. Zajednička karakteristika za sve tri sorte, temeljena na dvije godine istraživanja, je pad masenih udjela ukupnih C_6 i C_5 hlapivih tvari tijekom dozrijevanja maslina.[74]

Jedno od osnovnih pozitivnih senzorskih svojstava maslinovog ulja, uz pikantnost i gorčinu, je i voćnost. Voćnost je ukupnost mirisnih svojstava karakterističnih za ulje od zdravih i svježih plodova, bilo zelenih ili zrelih, zapaženih izravno ili neizravno, odnosno retronazalno.[2] Ulja koja se dobiju od nezrelih plodova maslina odišu zelenim notama koje podsjećaju na svježe košenu travu ili lišće. Ovakva ulja bogata su C_6 i C_5 aldehidima i alkoholima, a zbog više razine fenolnih spojeva imaju izraženiju gorčinu i pokantnos.[96] Ulja dobivena preradom zrelih plodova sadrže veći udio estera, nosioca slatkih i voćnih nota. Ova ulja nazivaju se još i slatkim uljima, a zbog niske razine fenolnih spojeva slabo im je izražena gorčina i pikantnost.[74]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Istraživane sorte

Oblica (sinonimi: Orgula, Orkula, Velika)

Oblica razvija srednje bujno stablo s krošnjom okruglog oblika. List je širok i dug, eliptičnog oblika, simetričan, sivomaslinaste boje. Plod je srednje krupan, okruglastog oblika i lagano asimetričan. Koštica je velika i eliptičnog oblika sa šiljastim vrhom i okrnjenom bazom. Pripada ranim sortama, čiji plod sadrži od 18 do 21 % ulja[58] (Slika 14.).



Slika 14. Plodovi sorte Oblica (Fotografija: B. Soldo).

Levantinka (sinonim: Šoltanka)

Levantinka razvija bujno stablo, kuglaste krošnje. List je velik, širok i dug, tamnozelene boje lica i bjelkaste boje naličja, po dužini blago uvijen. Plod je srednje krupan, eliptično izdužen i blago uvijen prema vrhu. Koštica je eliptičnog oblika, asimetrična sa šiljastim vrhom i zaobljenom bazom, grube površine. Rađa u grozdovima s tri do pet plodova, a u fazi pune zrelosti plod je crne boje. Sadržaj ulja u plodu kreće se oko 20 % [97] (Slika 15.).



Slika 15. Plodovi sorte Levantinka (Fotografija: B. Soldo).

Lastovka

Lastovka razvija srednje bujno stablo, savijene sivo-zelene krošnje. List je sitan i kopljastog oblika. Plod je duguljast, bačvast s ravnim dnom te tupim i blago zaobljenim vrhom. Koštica je srpastog oblika, blago savijena, simetrična s okruglastim vrhom i kratkim šiljkom. Boja ploda prije zriobe je zelena, a u zriobi tamno-ljubičasta do crna. Ubrajamo je u srednje rane sorte. Sadržaj ulja u plodu kreće se od 16 do 24 % [58] (Slika 16.).



Slika 16. Plodovi sorte Lastovka (Fotografija: B. Soldo).

3.1.2. Pokusni nasadi maslina

Provedeno je trogodišnje istraživanje od 2013. do 2015. godine na trima autohtonim dalmatinskim sortama maslina: Oblica, Levantinka i Lastovka. Prilikom postavljanja istraživanja planirano je da sve sorte budu iz istog nasada, te da se koristi isti nasad u svim godinama istraživanja. Kako je 2014. godina bila iznimno loša za maslinarsku i uljarsku proizvodnju, zbog oštećenja plodova izazvanih napadom maslinove muhe (*Bactrocera oleae*), nisu se mogli koristiti plodovi iz nasada korištenog u prethodnoj godini istraživanja, već je pažljivo odabran maslinik sličnih karakteristika tla i terena kako bi se smanjile razlike nastale zemljopisnim položajem.

Oba maslinika se nalaze u obalnom dijelu Dalmacije pod utjecajem mediteranske klime. Nasad korišten za berbu 2013. i 2015. godine nalazi se u Kaštel Lukšiću, 800 m od mora na nadmorskoj visini od 200 metra. Dobru osunčanost terena osigurava mu nagnutost tla od oko 25 ° prema jugu. Nasad korišten u berbi 2014. godine smješten je 2,5 km od Šibenika (Donje Polje) u blizini mora, a osunčanost mu osigurava blaga nagnutost terena prema jugo-zapadu. Tlo u oba nasad je karbonatno, glinasto-ilovaste strukture i srednje dubine.

3.2. Metode rada

3.2.1. Određivanje stupnja zrelosti plodova maslina

Plodovi maslina sorte Oblica, Levantinka i Lastovka brani su u šest, odnosno pet rokova berbe tijekom tri godine istraživanja. Masline su brane ručno vodeći računa da se zadržavaju samo zdravi plodovi. Brano je oko 1,5 kg plodova svake sorte, a dio plodova odmah je uronjen u tekući dušik i kasnije prebačen na -80 °C, te je korišten za ispitivanje enzimske aktivnosti. Preostali plodovi iskorišteni su za određivanje stupnja zrelosti i prerađeni su u ulje u roku od 24 sata.

Svakoj sorti pojedinog roka berbe, određen je stupanj zrelosti plodova po metodi Ucede i Frias.[35]

Od 1 kg ubranih maslina nasumično je odabrano 100 plodova, te su raspoređeni u osam mogućih kategorija s obzirom na boju epiderme i pulpe:

0 = plodovi s intenzivno zelena bojom epiderme

1 = plodovi zeleno-žute ili žute boje epiderme

2 = plodovi žute boje s crveno-ljubičastim mrljama

3 = plodovi crvenkaste do purpurno-crvene boje epiderme

4 = plodovi crne epiderme i bijele pulpe

5 = plodovi crne epiderme, s pulpom do polovice ljubičaste boje

6 = plodovi crne epiderme, s pulpom više od polovice ljubičaste boje

7 = plodovi crne epiderme, s pulpom ljubičaste boje od koštice

Stupanj zrelosti (*SZ*) izračuna se prema izrazu:

$$SZ = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + \ldots + (7 \times n_7) / 100$$

0 - 7 broj kategorija

n_0 - n_7 broj plodova maslina u pojedinoj kategoriji

3.2.2. Ispitivanje lipoksigenazne aktivnosti u plodovima maslina

Ispitivanje lipoksigenazne aktivnosti u plodovima maslina sorti Oblica, Lastovka i Levantinka provedeno je u tri uzastopne godine, a obuhvatilo je šest rokova berbe u 2013. i 2015. godini i pet rokova berbe iz 2014. (Tablica 2.).

Tablica 2. Rokovi berbe s pripadajućim datumima u trogodišnjem istraživanju sorti: Oblica, Levantinka i Lastovka.

Rok berbe	Godina	2013.	2014.	2015.
		Datum berbe		
1.		01.10.	30.09.	01.10.
2.		15.10.	14.10.	14.10.
3.		28.10.	28.10.	28.10.
4.		13.11.	12.11.	12.11.
5.		27.11.	26.11.	26.11.
6.		11.12.	n.u.	11.12.

n.u. (nije uzorkovano)

U 2014. godini nedostaje šesta berba i podaci o ulju za 4. i 5. rok berbe. Zbog spomenutog napada maslinove muhe na istraživane sorte, plodovi u kasnijim berbama nisu bili zadovoljavajuće kvalitete i izuzeti su iz istraživanja. Pažljivim odabirom prilikom branja omogućeno je sakupljanje zdravih plodova koji su se koristili za ispitivanje enzimske aktivnosti u proizvodnoj 2014. godini.

3.2.2.1. Priprema plodova za pročišćavanje LOX enzima

Plodovi maslina oprani su mlazom vodovodne vode, a nakon toga i destilirane. Svakom plodu odstranjen je epikarp, a usplođe ploda se odvoji od koštice, izvaže i odmah potopi u pufer za homogeniziranje.

3.2.2.2. Optimizacija pročišćavanja LOX enzima

Iako su dostupni brojni podaci za biljne LOX enzime, to se ne odnosi i na LOX enzim iz maslina. Kao glavni razlog oskudnosti literaturnih podataka Palmieri-Thiers i sur. su naveli poteškoće prilikom pročišćavanja enzima iz ploda masline.[13] Pri odabiru optimalne metode pročišćavanja korišteni su prijavljeni protokoli šest istraživačkih grupa: Gallardo-Guerrero i sur.[98]; Salas i sur.[18]; Ridolfi i sur.[17]; Luaces i sur.[11]; Kotti i sur.[10] i Patui i suradnici.[77] Kako bi se isključio utjecaj zriobe na moguće razlike u aktivnosti LOX enzima, ispitivanja su provedena na istom uzorku ploda Oblice (SZ = 2,07), berbe 13.11.2013. godine. Prema uputama iz korištenih protokola, izvagala se točna masa pulpe ploda, koja se potom prebaci u pufer za homogeniziranje (Tablica 3.).

Tablica 3. Sastav smjese za homogeniziranje u protokolima korištenim za optimizaciju pročišćavanja LOX enzima iz masline: Gallardo-Guerrero i sur. (1); Salas i sur. (2); Kotti i sur. (3); Patui i sur. (4); Luaces i sur. (5); Ridolfi i sur. (6).

Protokol	1	2	3	4	5	6
Referenca	[98]	[18]	[10]	[77]	[11]	[17]
Masa ploda (g)	10	10	10	15	10	10
Volumen pufera za ekstrakciju (mL)	40	50	50	90	45	40
Sastav pufera	50 mM Na_2PO_4 pH 6,8 0,2 mM EDTA 0,3 mM DTT 1 g PVPP 0,2% Triton X-100	50 mM HEPES pH 7,5 5 mM EDTA 3 mM DTT 5 g PVPP 20 mM KCl 2 mM $MgCl_2$ 7 mM β-ME 0,1 % askorbat 10 % glicerol 330 mM sorbitol	50 mM Na_2PO_4 pH 6,8 0,2 mM EDTA 0,3 mM DTT 1 g PVPP 0,2% Triton X-100 20 mM KCl 10 mM $Na_2S_2O_7$	50 mM HEPES-KOH pH 7,5 5 mM EDTA 3 mM DTE 4,5 g PVPP 20 mM KCl 2 mM $MgCl_2$ 7 mM β-ME 0,1 % askorbat 10 % glicerol 10 mM His 0,25 M saharoza 0,1 mM PMSF 0,1 mM benzamidin 5 mM α-aminokaprioična kiselina	100 mM Na_2PO_4 pH 6,8 1 mM EDTA 2 g PVPP 0,1% Triton X-100 0,1 PMSF 5 mM α-aminokaprioična kiselina	50 mM Na_2PO_4 pH 6,8 0,2 mM EDTA 0,3 mM DTT 1 g PVPP 0,1% Triton X-100 10 mM $Na_2S_2O_7$
Uvjeti centrifugiranja:	10 000 g, 10 min, 4 °C	40 000 g, 20 min, 4 °C	13 000 g, 20 min, 4 °C	diferencijalno	27 000 g, 20 min, 4 °C	27 000 g, 30 min, 4 °C

Smjesa za homogeniziranje se čuva na ledu i homogenizira kroz četiri ciklusa. Za homogeniziranje korišten je Polytron PT 1600 E (*Kinematica*), a trajanje pojedinog ciklusa ograničeno je na 30 sekunda uz 15 000 rpm, sa stankom od 1 min između ciklusa. Homogenizirana smjesa se filtrira kroz dva sloja Miracloth (*Milipore*) i podvrgne centrifugiranju (Tablica 3.). Korišteni protokoli osim razlike u sastavu pufera za ekstrakciju i uvjetima centrifugiranja, razlikuju se i u odabiru supernatanta ili taloga za daljnju obradu. Kod protokola br. 1, 2 i 3 potpuni se ekstrakcijski proces odvija kako je prikazano u Tablici 3., dok se supernatant iz protokola br. 5 podvrgne dodatnom centrifugiranja na 10 000 g, u trajanju od

10 min pri 4 °C. Kod većine protokola, sakupljeni supernatant služi za mjerenje enzimske aktivnosti. Iznimku čini protokol br. 2 kod kojega se talog otopi u malom volumenu pufera sastava HEPES (25 mmol L^{-1}, pH 7,5) koji sadrži glicerol (ψ = 10 %). Protokol br. 6 jedini je protokol koji uključuje taloženje proteina s otopinom amonijevog sulfata (ψ = 75 %), a talog proteina odvoji se centrifugiranjem na 20 000 g kroz 90 min i otopi u malom volumenu fosfatnog pufera (50 mmol L^{-1}, pH 6,8), te se sadržaj dijalizira preko noći u hladnoj sobi. Diferencijalno centrifugiranje pri 4 °C korišteno je samo kod protokola br. 4. Filtrirani homogenat podvrgne se centrifugiranju na 1000 g kroz 5 min, dobiveni supernatant potom se centrifugiran na 28 000 g kroz 12 min. Dio supernatanta iz drugog centrifugiranja se sačuva za analizu aktivnosti LOX enzima, dok se preostali dio podvrgne dodatnom centrifugiranju na 100 000 g kroz 1 h (*Preparative Ultracentrifuge, Optima L-XP Series, 70 Ti Rotor, Beckman Coulter, SAD).* Talog dobiven u prvom koraku centrifugiranja (1000 g) se odbaci, dok se talozi dobiveni u ostalim koracima centrifugiranja (28 000 g i 100 000 g) otope u malom volumenu Tris pufera (20 mmol L^{-1}, pH 7,5) koji sadrži histidin (10 mmol L^{-1}). U ovom protokolu se sačuvaju i supernatanti dobiveni cenrtifugiranjem na 28 000 g i 100 000 g. Metodom po Bradfordu odredi se koncentracija ukupnih proteina u prethodno pripremljenim suspenzijama taloga i sačuvanim supernatantima. Uzorci se čuvaju pri -20 °C i koriste se za mjerenje lipoksigenazne aktivnosti u plodu.

Uvidom u rezultate lipoksigenazne aktivnosti proizašle iz navedenih šest protokola, za daljnja pročišćavanja LOX enzima odabran je protokol po Luacesu i sur.[11]

3.2.2.3. Određivanje koncentracije izoliranih proteina

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu. Ukratko, metoda se zasniva na pomaku apsorpcijskog maksimuma boje Comassie Brilliant Blue G-250 *(Biorad)* koja u kiselom mediju uslijed vezivanja za protein prelazi iz crvene u plavu.[99] Porast apsorpcije na 595 nm proporcionalan je količini vezane boje, odnosno koncentraciji proteina u uzorku. Za izradu baždarnog pravca korištene su otopine proteinskog standarda albumina iz goveđeg seruma (BSA) u rasponu koncentracije od 0 do 1,0 mg mL^{-1}. Za pripremu otopine BSA korišten je isti pufer u kojemu je i protein od interesa. Apsorbancija otopine BSA (1 mg mL^{-1}) provjeri se spektrofotometrijski, te pri 280 nm iznosi 0,66.

Koncentracija proteina određena je u mikrotitarskim pločicama u posebno prilagođenom čitaču EL808 (*Bio-Tek Instruments*). U 250 μL svježe pripremljene i filtrirane boje sastava: Comassie Brilliant Blue G-250 (0,1 g L^{-1}), etanol (ψ = 5 %) i fosforna kiselina (ψ = 10 %) doda se isti volumen (5 μL) slijepe probe, standarda i uzorka. Prije očitanja apsorbancije na 595 nm pusti se da se boja razvija od 5 min do 1 h.

3.2.2.4. Priprema supstrata

Supstrat, linolna kiselina, pripremljen je kako su opisali Axelrod i suradnici.[100] Za pripremu otopine linolne kiseline (25 mmol L^{-1}), koristi se deionizirana i destilirana voda u koju se prethodno uvodi dušik. U 5 mL vode doda se 155 μL linolne kiseline (*Sigma Aldrich*) i 256 μL Tween-20 *(Sigma Aldrich)*. Sadržaj se pažljivo miješa pazeći da se ne zapjeni, a otapanje emulzije se pospiješi dodatkom 600 μL natrijevog hidroksida (1 mol L^{-1}), te se odmjerna tikvica od 25 mL nadopuni vodom do oznake. Nakon pažljivog miješanja, otopina se razdijeli u alikvote, uroni u tekući dušik i pohrani do korištenja na - 80 °C.

3.2.2.5. Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti LOX enzima

Reakcijska smjesa sadrži 100 μg mL^{-1} proteinskog ekstrakta otopljenog u MES puferu (0,1 mol L^{-1} i pH 6). Dodatkom linolne kiseline (250 μmol L^{-1}) u smjesu ukupnog volumena od 2,5 mL, započinje sinteza produkata HPOD. Reakcija se provodi 30 min uz polagano miješanje pri temperaturi od 27 °C, a potom se reakcijska smjesa zakiseli klorovodičnom kiselinom (1 mol L^{-1}) do pH 2. Reakcija se provodi po tri puta, za svako razdoblje berbe uključujući sve ispitivane sorte i tri godine istraživanja.

Kod ispitivanja vremenskog tijeka reakcije, pripremi se reakcijska smjesa kako je prethodno opisano, a vrijeme reakcije iznosi 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 i 90 min.

Prilikom izrade pH profila LOX enzima u pojedinim sortama, korištena je prethodno opisana reakcijska smjesa s razlikom u odabiru pufera[12] (Tablica 4.).

Tablica 4. Sastav pufera za ispitivanje pH profila LOX enzima.

pH područje	Sastav pufera	Koncentracija (mol L^{-1})
4,0 - 5,5	Natrijev acetat	0,1
6,0 - 7,5	MES	0,1
8,0 - 8,5	EPPS	0,1
9,0	Borat	0,1

3.2.2.6. Izolacija produkata 9- i 13-*Z,E*-HPOD

Iz reakcijske smjese su serijom ekstrakcija izolirani produkti 9- i 13-*Z,E*-HPOD. U 2,5 mL reakcijske smjese doda se dva puta po 5 mL i jednom 2,5 mL smjese otapala za ekstrakciju ψ (heksana, 2-propanol = 95:5). Nakon zadnje ekstrakcije preostala reakcijska smjesa se centrifugira 5 min na 2000 g u min, a zaostali heksanski sloj pridruži se prethodno odijeljenim. Ekstrakti se spoje i upare u struji dušika. Upareni ostatak se otopi u 600 do 1200 mL mobilne faze ψ (acetonitril, voda) = 67:33 i sonificira u ultrazvučnoj kupelji 10 sek. Ovako pripremljeni uzorak se analizira HPLC-om ili se čuva pri – 20 °C do analize.

Kako bi se pratila uspješnost izolacije produkta 9- i 13-*Z,E*-HPOD, u reakcijsku smjesu se doda butilhidroksiltoluen (BHT) (0,22 mmol L^{-1}). BHT je interni standard i antioksidans, koji apsorbira na 234 nm, a njegova hidrofobna svojstva slična su onima koje posjeduju produkti 9- i 13-HPOD.

3.2.2.7. Kvantifikacija produkata 9- i 13-*Z,E*-HPOD

Reakcijski produkti, 9- i 13-*Z,E*-HPOD odvojeni su RP-HPLC (*Perkin Elmer Series 200*), na serijski spojenim kolonama Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μm, 4,6 mm x 250 mm i 5 μm, 4,6 mm x 150 mm *Agilent*).
Radni uvjeti tekućinske analize su:

- Pokretna faza: (A) octena kiselina (0,25 %) i (B) acetonitril
- Gradijentno eluiranje analita (Tablica 5.)

- Brzina protoka pokretne faze: 0,8 mL min $^{-1}$
- Radna temperatura kolone: 35 °C
- Volumen injektiranog uzorka: 10 μL
- UV/Vis detektor: 234 nm

Tablica 5. Uvjeti gradijentnog eluiranja 9- i 13-*Z,E*-HPOD s kromatografske kolone.

t (min)	otapalo A ψ (%)	otapalo B ψ (%)
0 - 22	37	63
22 - 25	20	80
25 - 47	20	80
47 - 49	37	63
49 - 60	37	63

3.2.2.7.1. Standardne otopine za kvantifikaciju 9- i 13-*Z,E*-HPOD

Imajući u vidu odnos produkata 9-*Z,E*-HPOD i 13-*Z,E*-HPOD u ispitivanim uzorcima od približno 2:1, pripremljene su njihove standardne otopine vodeći računa da se zadrži taj omjer. Kao vanjski standardi za izradu kalibracijskih pravaca korišteni su (±)13-*Z,E*-HPOD i (±)9-*Z,E*-HPOD (*Cayman chemicals, SAD*). Pripravljeno je 5 različitih koncentracija standarda otopljenih u etanolu. Rasponi masenih koncentracija korištenih otopina standarda s pripadajućim koeficijentima i vremenom zadržavanja pojedinog standarda na koloni prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Rasponi masenih koncentracija 9-*Z,E*-HPOD i 13-*Z,E*-HPOD u području linearnosti, pripadajući koeficijenti korelacije (r^2) i vrijeme zadržavanja standarda na koloni.

	Raspon masene koncentracije (μg mL^{-1})	r^2	Vrijeme zadržavanja na koloni (min)	Granica kvantifikacije (μg mL^{-1})	Granica detekcije (μg mL^{-1})
9-*Z,E*-HPOD	0,50 - 64,87	0,9991	22,07	0,047	0,016
13-*Z,E*-HPOD	0,25 - 35,14	0,9999	21,50	0,050	0,017

3.2.4. Prerada plodova u ulje

Za dobivanje ulja, korištena je laboratorijska uljara Abencor (*MC2, Ingenierias y Sistems, Sevilla, Španjolska*). Ukratko, plodovi su mljeveni metalnim mlinom čekićarem, a dobiveno tijesto se miješalo 35 min pri 26 ± 1 °C i centrifugiralo 70 sek na 3500 okretaja u min. Ulje je dekantiranjem odvojeno od vegetabilne vode i pohranjeno u tamnim staklenim bocama, napunjenim do vrha. Do analize, ulja su se čuvala u tami na sobnoj temperaturi.

3.2.5. Analize ulja

3.2.5.1. Osnovni parametri kvalitete ulja

Određeni su osnovni parametri kvalitete ispitivanih sortnih ulja i to: 18 ulja u 2013. godini, 9 ulja u 2014. godini i 17 ulja u 2015. godini istraživanja.

3.2.5.1.1. Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Udio SMK u uzorcima ulja određen je prema standardnoj metodi COI/T.20/Doc.No34.[101] Odvaže se 5 ± 0,1 g ulja i otopi u 50 mL prethodno neutralizirane smjese otapala ψ (dietil eter, etanol = 1:1). Smjesa se titrira otopinom kalijevog hidroksida (0,1 mol L^{-1}) do promjene boje indikatora (ružičasta boja fenolftaleina). Udio SMK izražava se kao postotak oleinske kiseline, a izračunava se prema izrazu:

$$\text{SMK (\% oleinske kiseline)} = V \times c \times M_r / 10 \times m$$

gdje je:

- V volumen KOH utrošen za neutralizaciju (mL)
- c koncentracija standardizirane otopine KOH (0,1 mol L^{-1})
- M_r molekulska masa oleinske kiseline (282 g mol^{-1})
- m odvaga uzorka ulja (g)

3.2.5.1.2. Određivanje peroksidnog broja (PB)

Određivanje PB u ulju provedeno je po principu metode HR EN ISO 3960:2010.[102] Odvaže se 5 ± 0,1 g ulja i otopi u 50 mL smjese otapala ψ (kloroform, octena kiselina) = 2:3, otopini se odmah doda 0,5 mL zasićene otopine kalijevog jodida i snažno miješa 1 min. Smjesi se doda 30 mL destilirane vode i sadržaj titrira otopinom natrijevog tiosulfata (0,01 mol L^{-1}) uz otopinu škroba kao indikator. Potrebno je odrediti utrošak otopine natrijevog tiosulfata za titraciju slijepe probe. PB, izražen u mmol O_2 kg^{-1}, izračuna se prema izrazu:

$$PB \text{ (mmol } O_2 \text{ kg}^{-1)} = (V\text{-}V_0) \text{ x } N \text{ x } 1000 / 2 \text{ x } m$$

gdje je:

- V volumen otopine natrijevog tiosulfata utrošen za titraciju uzorka (mL)
- V_0 volumen otopine natrijevog tiosulfata, utrošen za titraciju slijepe probe (mL)
- N normalitet standardizirane otopine $Na_2S_2O_3$
- m odvaga uzorka ulja (g)

3.2.5.1.3. Specifični koeficijenti apsorbancije u UV području (K-brojevi)

Određivanje absorbancije u UV području provedeno je prema metodi COI/T.20/Doc. No 19/Rev. 3.[103] Odvaže se 0,25 g ulja u odmjernu tikvicu od 25 mL, nadopuni se izobutanom, te se sadržaj izmiješa. Na spektrofotometru snimi se apsorpcijski spektar u rasponu od 280 do 230 nm. Očitaju se absorbancije na 230 nm i 270 nm, te 270 ± 4 nm i izračunaju se ekstinkcijski koeficijenti prema izrazu:

$$K_\lambda = E_\lambda / c \text{ x } s$$

gdje je:

- K_λ specifična ekstinkcija pri valnoj duljini λ
- E_λ izmjerena ekstinkcija pri valnoj duljini λ
- c koncentracija otopine (g/100 mL)
- s duljina puta zrake (cm)

odnosno razlika u ekstinkcijskim koeficijentima (ΔK) prema izrazu:

$$\Delta K = K_m - (K_{m-4} + K_{m+4}) / 2$$

gdje je:

ΔK promjena specifične ekstinkcije

K_m ekstinkcija pri 270 nm

K_{m-4} ekstinkcijski koeficijent pri 270 nm – 4 nm

K_{m+4} ekstinkcijski koeficijent pri 270 nm + 4 nm

3.2.6. Ukupni fenoli

3.2.6.1. Izolacija fenolnih spojeva

Izolacija fenolnih spojeva iz hidrofilne frakcije ulja provodi se prema metodi COI/T.20/Doc No 29.[104] U epruvetu s čepom na navoj odvaže se 2 g ulja i doda 1 mL otapala ψ (metanol, voda) = 80:20. Sadržaj se miješa 0,5 min na vorteksu. Smjesi se doda 5 mL otapala ψ (metanol, voda) = 80:20 i miješa na vorteksu 1 min. Ovako pripravljena smjesa prebaci se u ultrazvučnu kupelj i izloži vibraciji u trajanju od 15 min, pri sobnoj temperaturi. Sadržaj se potom centrifugira pri 5000 g, 25 min. Supernatant, hidrofilna frakcija, sakupi se i filtrira kroz 0,45 μm filter od celuloznog acetata. Rade se tri paralelne izolacije.

3.2.6.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Maseni udio ukupnih fenolnih spojeva hidrofilnog dijela ulja određen je spektrofotometrijski pomoću modificirane Folin-Ciocalteu metode. Kolorimetrijska reakcija izvedi se u odmjernoj tikvici od 25 mL, u koju se doda 250 μL izolirane hidrofilne frakcije, 15 ml destilirane vode, te 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa (*Sigma-Aldrich*). Nakon 3 min u smjesu se doda 2,5 mL zasićene otopine natrijevog karbonata i tikvica se nadopuni do oznake destiliranom vodom. Nakon 90-minutne inkubacije u mraku, uz povremeno miješanje na sobnoj temperaturi mjeri se apsorbancija pri 725 nm na spektrofotometru Perkin-Elmer UV/VIS Lambda Bio 40, uz

slijepu probu. Udio ukupnih fenolnih spojeva se izračuna iz baždarnog pravca za čiju se izradu koristi kavena kiselina (*Sigma-Aldrich*) u rasponu koncentracija od 0,0256 do 1,0 mg mL^{-1} (r^2 = 0,9998). Rezultati se izraze kao mg kavene kiseline po kg ulja.

3.2.7. Određivanje sastava hlapljivih tvari

3.2.7.1. Izolacija hlapljivih tvari

Izolacija hlapljivih tvari iz ulja provodi se metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *Headspace Solid Phase Microextraction*, HS-SPME). HS-SPME je jednostavna i učinkovita adsorpcijsko-desorpcijska tehnika koja objedinjuje uzorkovanje, ekstrakciju, koncentriranje, a uzorak se uvodi u jednom koraku bez korištenja otapala. SPME vlakno može biti apsorbirajućeg ili apsorbirajuće-upijajućeg tipa. Vlakno apsorbirajućeg tipa je pogodno za analizu hlapljivih sastojaka maslinovog ulja. Korištenjem ovog vlakna osigurava se adsorpcija analita, bez konkurencije među spojevima.[105] Princip ekstrakcije na SPME vlaknu apsorbirajućeg tipa ostvaruje se apsorpcijom spojeva u nepravilne unutarnje pore. Apsorbijajući tip vlakna karakterizira njegova izrazita sposobnost apsorbiranja, zato su pogodni za analizu spojeva u tragovima. Međutim, ovaj tip vlakna se lako može zasititi u odnosu na apsorbijajuće-upijajući tip vlakna. Stoga kad se SPME vlakno apsorbijajućeg tipa koristi, kapacitet vlakna i učinci zamjene jednog spoja drugim moraju se oprezno vrednovati, jer oni mogu utjecati na kvantitativno određivanje spojeva.

Prije upotrebe izvršena je aktivacija SPME vlakna po uputama proizvođača (*Supelco, Co., SAD*). SPME vlakno se žari pri 270 °C kroz 60 min u injektoru plinskog kromatografa. Za mikroekstrakciju hlapljivih tvari na čvrstoj fazi iz vršnih para maslinovog ulja korišteno je divinilbenzen/karboksen/polidimetiloksansko vlakno duljine 2 cm i debljine apsorbirajućeg polimera od 50/30 μm (*Supelco, SU 57348U*) (Slika 17.). Ukratko, odvaže se 3 g ulja u bočicu (*Supleco, Co., SAD*) volumena 10 ml i zapečati sa silikonskim septumom (*PTFE Silicone, 20 mm Alum., SAD).* Prije ekstrakcije ulje se termostatira u vodenoj kupelj pri 40 °C kroz 15 min. U ovako pripremljeni uzorak se kroz septum uvede SPME igla, a apsorbirajuća se smola posebnim mehanizmom izvuče u prostor iznad ulja (Slika 18.). Ekstrakcija se vrši 30 min na

temperaturi od 40 °C. Slijedi toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva u injektoru plinskog kromatografa pri temperaturi od 250 °C u trajanju od 1 min (Slika 19.).

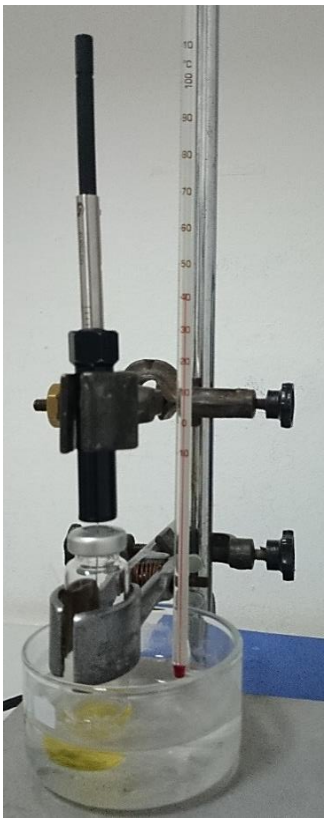
A



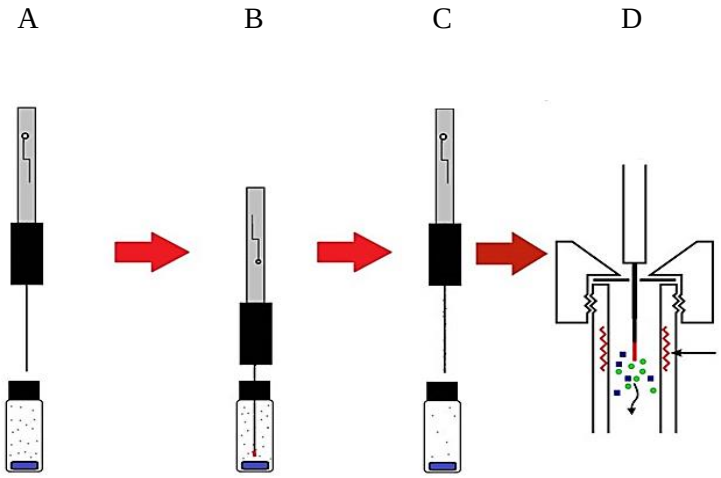
B



Slika 17. SPME igla (nosač za uzorkovanje) s uvučenim apsorbirajućim vlaknom (A) i izvučenim apsorbirajućim vlaknom (B) (Fotografija: B. Soldo).



Slika 18. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para djevičanskog maslinovog ulja na čvrstoj fazi (Fotografija: B. Soldo).



Slika 19. Shematski prikaz mikroeksrtakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Stabilizacija nadprostora uzorka (A), ekstrakcija, umetanje SPME igle (crno) i izvlačenje apsorbirajućeg vlakna (crveno) (B), završetak uzorkovanja, apsorbirajuće vlakno se uvuče u kućište i igla se izvuče iz bočice (C). Desorpcija ekstrahiranih spojeva u injektor kromatografa (D). Preuzeto sa https://www.sonoma.edu/waters/projects/water_quality/organophosphate.html#collapse2.

3.2.7.2. Analiza hlapljivih tvari u maslinovom ulju

Analiza hlapljivih tvari u uzorcima maslinovog ulja, provedena je na plinskom kromatografu Varian GC 3900 (*Varian, SAD*) opremljenom s injektorom za direktno unošenje uzorka (eng. *split/splitess*), plameno-ionizacijskim detektorom i kapliranom kolonom od taljenog kvarca CP-WAX 57 CB duljine 50 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i 0,2 µm debljine filma tekuće faze (*Varian; SAD*).

Radni uvjeti plinske analize

- Plin nosač: helij, pri protoku od 2,5 mL min^{-1} i tlaku 22,6 psi (155821,5 Pa; 1 psi = 6894,76 Pa).
- Korišten je temperaturni program: početna temperatura od 40 °C, podizana je do 200 °C brzinom od 5 °C/4 min sa završnim izotermalnim vremenskim razdobljem od 10 min.

- Injektiranje je izvedeno „splitless“ tehnikom, toplinskom desorpcijom SPME igle tijekom 1 min pri 250 °C. Za sljedeća ubrizgavanja, igla je očišćena zagrijavanjem u drugom injektoru tijekom 10 min pri 250 °C.
- Plamenoionizacijski detektor **(**engl. *Flame Ionization Detector*, FID) je održavan pri 300 °C.

Hlapljive tvari u uzorcima ulja Oblice, Levantinke i Lastovke identificirane su usporedbom s vremenom zadržavanja standarda hlapljivih spojeva (Tablica 7.). Za izradu kalibracijskih pravaca, u biljno rafinirano ulje (*Zvijezda d.o.o., Hrvatska*) dodavane su poznate mase standarda (Tablica 8.). Kalibracijski pravci za 18 korištenih standarda pokazali su linearan raspon s koeficijentom korelacije u području od 0,966 do 0,999 (Tablica 8.). U Tablici 9. navedena su mirisno-okusnih svojstava korištenih standarda. Za svaki uzorak ulja provedene su tri uzastopne analize hlapljivih tvari. Podaci su analizirani pomoću kromatografskog softverskog alata GC Workstation 6.41 (*Varian*).

Tablica 7. Vrijeme zadržavanja na koloni, čistoća i naziv proizvođača korištenih standarda hlapljivih tvari.

Redni broj	Hlapljiva tvar	Vrijeme zadržavanja (min)	Čistoća spoja	Naziv proizvođaća
1	etil-acetat	2,76	≥ 99,8%	*Sigma-Aldrich*
2	etanol	3,32	≥ 98%	*Kemika*
3	pentanal	3,68	≥ 98%	*Merck*
4	etil-butirat	4,63	≥ 98%	*Merck*
5	butil-acetat	5,39	≥ 99,5%	*Sigma-Aldrich*
6	heksanal	5,95	≥ 98%	*Merck*
7	smjesa butanola*	6,14	≥ 99%	*Merck*
8	1-penten-2-ol	7,78	≥ 97%	*Sigma-Aldrich*
9	4-metilpenten-2-ol	8,09	≥ 99%	*Fluka*
10	*E*-2-heksenal	9,11	≥ 97%	*Merck*
11	heksil-acetat	10,57	≥ 98%	*Merck*
12	oktanal	10,96	≥ 98%	*Merck*
13	heksanol	13,07	≥ 98%	*Merck*
14	*E*-2-heksen-1-ol	13,79	≥ 97%	*Merck*
15	*Z*-3-heksen-1-ol	14,39	≥ 98%	*Merck*
16	etanska kiselina	15,46	≥ 99,5%	*Kemika*
17	butanska kiselina	19,61	≥ 99%	*Merck*
18	heksanska kiselina	24,32	≥ 99%	*Sigma-Aldrich*

* Kromatografsko razdvajanje smjese butanola (butan-2-ol i 3-metil-2-butan-1-ol) nije izvršeno zbog istog vremena zadržavanja, već su kvantificirane njihove zajedničke koncentracije.

Tablica 8. Rasponi masenih udjela hlapljivih tvari u području linearnosti s pripadajućim koeficijentima korelacije (r^2).

Redni broj	Hlapljiva tvar	Raspon masenog udjela	r^2
1	etil-acetat	0,042 - 8,624	0,988
2	etanol	0,045 - 9,189	0,986
3	pentanal	0,111 - 10,428	0,998
4	etil-butirat	0,063 - 12,842	0,982
5	butil-acetat	0,058 - 11,812	0,983
6	heksanal	0,193 - 5,526	0,992
7	smjesa butanola	0,052 - 4,867	0,991
8	1-penten-2-ol	0,106 - 21,687	0,966
9	4-metilpenten-2-ol	0,036 - 7,318	0,966
10	*E*-2-heksenal	0,040 - 42,265	0,992
11	heksil-acetat	0,057 - 31,622	0,991
12	oktanal	0,110 - 61,437	0,999
13	heksanol	0,054 - 11,060	0,985
14	*E*-2-heksen-1-ol	0,055 - 30,387	0,985
15	*Z*-3-heksen-1-ol	0,054 - 30,086	0,980
16	etanska kiselina	0,021 - 11,836	0,998
17	butanska kiselina	0,018 - 9,938	0,979
18	heksanska kiselina	0,021 - 11,715	0,966

Tablica 9. Mirisno-okusna svojstva korištenih standarda hlapljivih tvari.

Redni broj	Hlapljiva tvar	Mirisno-okusna svojstva
1	etil-acetat	slatko-aromatično, vinsko
2	etanol	alkoholno
3	pentanal	masno, voštano, oporno
4	etil-butirat	vinsko
5	butil-acetat	voćno, slatko, pikantno
6	heksanal	zelena jabuka, travnato
7	smjesa butanola	drvenasto, viski, slatko
8	1-penten-2-ol	drvenasto
9	4-metilpenten-2-ol	alkoholno, voćno
10	*E*-2-heksenal	gorki badem, zeleno, oštro, gorko
11	heksil-acetat	zeleno, voćno, slatko, jabuka
12	oktanal	citrusno
13	heksanol	voćno, aromatićno-nježno, banana
14	*E*-2-heksen-1-ol	zelena trava, lišće, trpko, voćno
15	*Z*-3-heksen-1-ol	zeleno, svježe, zelena trava
16	etanska kiselina	kiselo,vinsko
17	butanska kiselina	maslačno
18	heksanska kiselina	masno

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Rezultati istraživanja utjecaja lipoksigenaze na sadržaj hlapljivih tvari u autohtonim sortnim uljima Oblice, Levantinke i Lastovke podijeljena su u pet dijelova.

U prvom dijelu prikazani su rezultati analize specifične aktivnosti LOX enzima izražene u nmol min^{-1} mg^{-1} ukupnih proteina izoliranih iz plodova masline navedenih sorti, ovisno o šest rokova berbe (1.-6.), odnosno stupnju zrelosti ploda u tri uzastopne godine istraživanja (2013.-2015.). U svrhu podrobnijeg ispitivanja LOX enzima, priloženi su rezultati analize produktne specifičnosti enzima, vremenskog tijeka reakcije, pH profila u ranom i srednjem roku berbe. Ispitan je i inhibicijski učinak nordihidroguaretične kiseline (NGDA) na LOX enzim iz plodova maslina sorte Oblica, Levantinka i Lastovka. Rezultat za pojedini rok berbe, izuzev vremenski tijek reakcije, predstavlja prosječnu vrijednost dobivenu iz tri mjerenja.

Rezultati osnovnih kemijskih parametara kvalitete djevičanskih maslinovih ulja u ovisnosti o roku berbe ploda masline dani su u drugom dijelu, u kojemu su prikazani rezultati analize sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima ovisno o roku berbe. Rezultati za pojedini rok berbe predstavljaju prosječne vrijednosti dobivene iz tri određivanja.

U trećem dijelu prikazana je usporedba ukupne specifične aktivnosti LOX enzima u plodovima (izražene kao zbroj specifičnih aktivnosti dobivenih mjerenjem količine nastalog produkta 9- i 13-*Z,E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina) i sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju, s ciljem utvrđivanja njihovog potencijalno inhibicijskog djelovanja na enzim.

U četvrtom dijelu prikazani su rezultati utjecaja roka berbe na sadržaj pojedinih hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju sorte Oblica, Levantinka i Lastovka. Prikazana je promjena masenih udjela ukupnih hlapljivih tvari, aldehida, alkohola i estera, te C_6 i C_5 hlapljivih spojeva. Rezultat za pojedini rok berbe, predstavlja prosječnu vrijednost dobivenu iz tri mjerenja.

Peti dio rezultata odnosi se na usporedbu izmjerene specifične aktivnosti LOX enzima (izražene preko količine oslobođenog produkta 13-*Z,E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina) u plodu i sadržaja C_6 i C_5 hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju, s

ciljem uspostave veze između promjene enzimske aktivnosti i sadržaja hlapljivih tvari, ovisno o rokovima berbe u pojedinoj godini istraživanja.

4.1.1. Specifična aktivnosti LOX enzima u plodu maslina sorte Oblica, Levantinka i Lastovka

4.1.1.1. Rokovi berbe i stupanj zrelosti ploda maslina

U Tablici 10. prikazani su rokovi berbe plodova masline sorte Oblica, Levantinka i Lastovka s pripadajućim datumima i određenim stupnjem zrelosti plodova u tri uzastopne godine istraživanja.

Tablica 10. Rokovi berbe i stupnjevi zrelosti ploda Oblice, Levantinke i Lastovke u tri uzastopne godine istraživanja (2013. do 2015.).

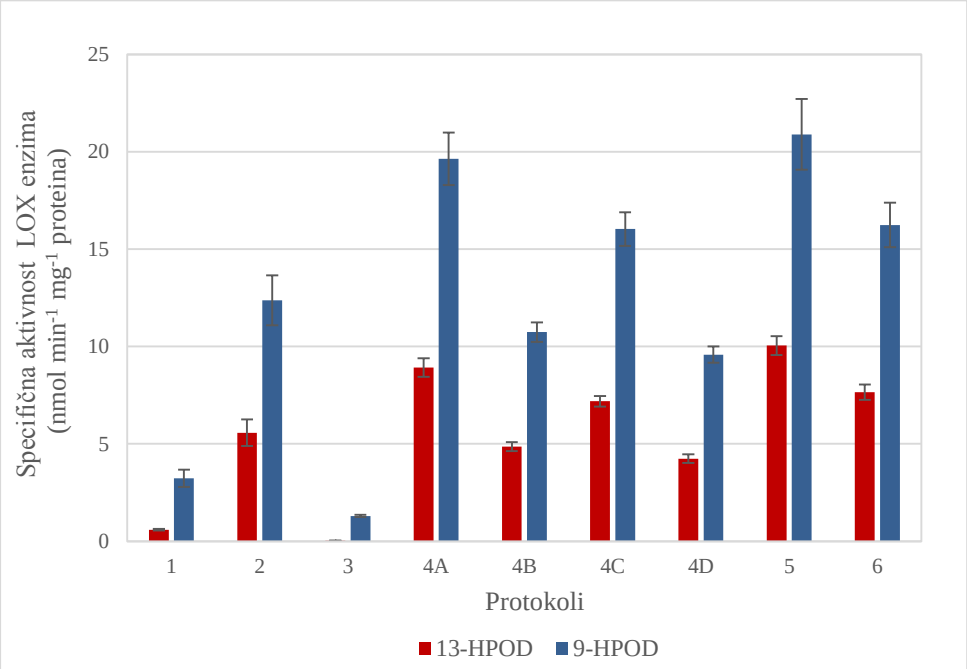
			Stupanj zrelosti		
Godina	Datum	Rok berbe	Oblica	Levantinka	Lastovka
2013.	01.10.	1.	0,23	0,54	0,70
	15.10.	2.	0,45	0,91	1,18
	28.10.	3.	1,17	1,91	1,80
	13.11.	4.	2,07	2,99	2,21
	27.11.	5.	3,19	3,71	2,53
	11.12.	6.	3,65	4,05	2,93
2014.	30.09.	1.	0,73	0,43	0,90
	14.10.	2.	1,21	1,56	1,37
	28.10.	3.	2,41	2,74	2,37
	12.11.	4.	3,83	3,91	2,79
	26.11.	5.	4,98	4,28	3,32
2015.	01.10.	1.	0,62	0,68	0,79
	14.10.	2.	1,14	1,97	1,19
	28.10.	3.	3,06	2,11	2,45
	12.11.	4.	4,17	4,49	3,11
	26.11.	5.	4,36	5,17	3,50
	11.12.	6.	n.u.	5,88	3,64

n.u. (nije uzorkovano)

4.1.1.2. Validacija protokola za izolaciju LOX enzima iz ploda maslina

Slika 20. prikazuje specifičnu aktivnost i produktnu specifičnost LOX enzima iz plodova masline korištenjem šest prijavljenih protokola za izolaciju. Za analizu korišteni su plodovi sorte Oblica (SZ = 2,07) i to iz 4. roka berbe u 2013. godini. Produktna specifičnost LOX enzima, dobivena usporedbom omjera produkata 9-*Z*,*E*-HPOD i 13-*Z*,*E*-HPOD, za sve korištene protokole je prikazana u Tablici 12.

U Dodatku 1. prikazani su kromatogrami ispitivanih protokola u kojima se uočava najmanja i najveća specifična enzimska aktivnost LOX enzima.



Slika 20. Specifična aktivnost LOX enzima u plodovima sorte Oblica. Korišteni protokoli: Gallardo-Guerrero i sur. (1); Salas i sur. (2); Kotti i sur. (3); Patui i sur. (4A, 4B, 4C, 4D), Luaces i sur. (5) i Ridolfi i sur. (6). Rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri paralelna određivanja specifične aktivnosti LOX enzima ± SD.

Tablica 11. Produktna specifičnost LOX enzima, dobivena usporedbom omjera produkata 9-*Z,E*-HPOD i 13-*Z,E*-HPOD u korištenim protokolima: Gallardo-Guerrero i sur. (1); Salas i sur. (2); Kotti i sur. (3); Patui i sur. (4A, 4B, 4C, 4D), Luaces i sur. (5) i Ridolfi i sur. (6).

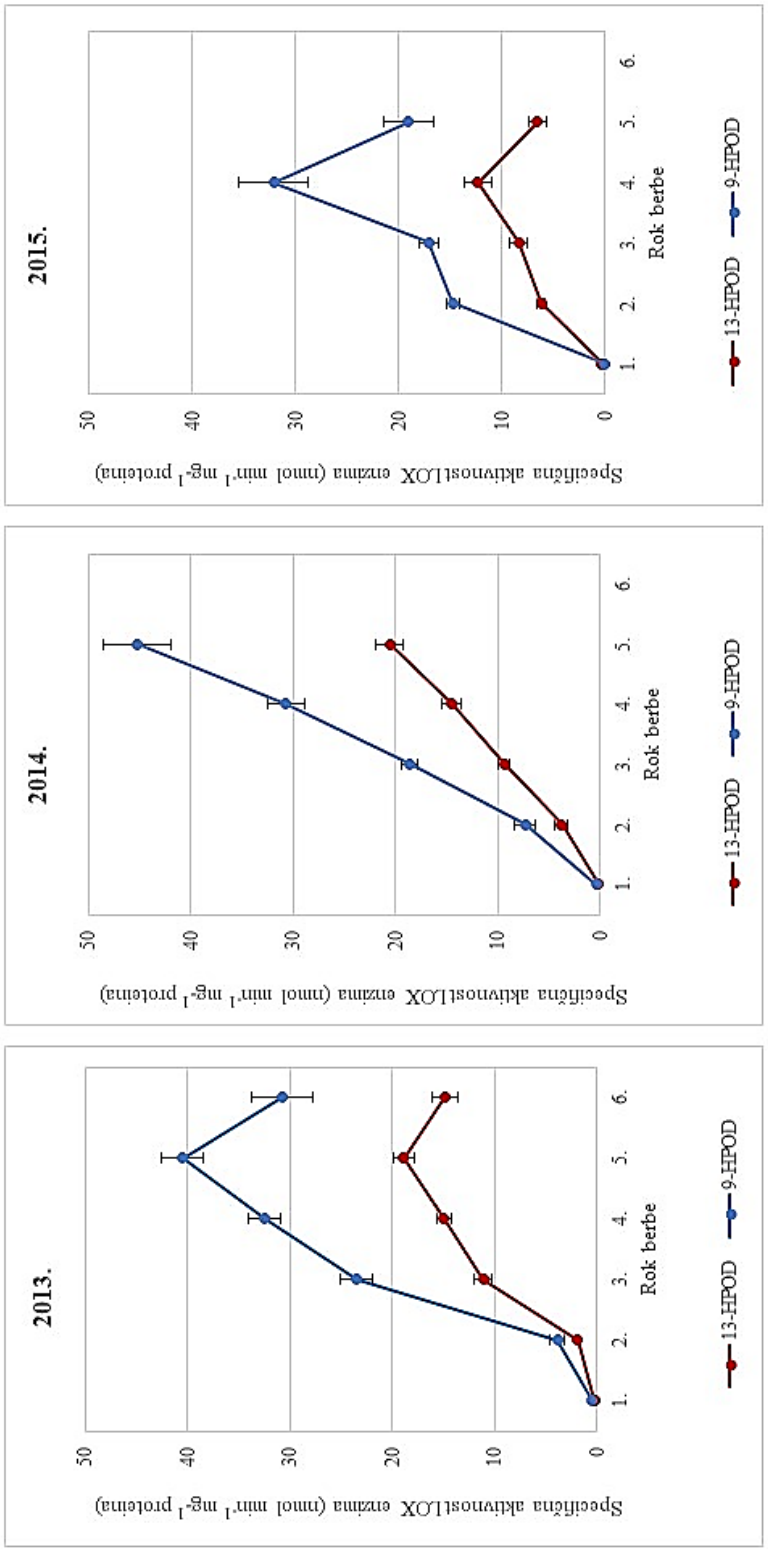
	Produktna specifičnost
Protokol	9-*Z,E*-HPOD /13-*Z,E*-HPOD
1	5,47
2	2,22
3	49,85
4A	2,2
4B	2,21
4C	2,23
4D	2,26
5	2,08
6	2,12

4.1.1.3. LOX enzim u plodovima maslina

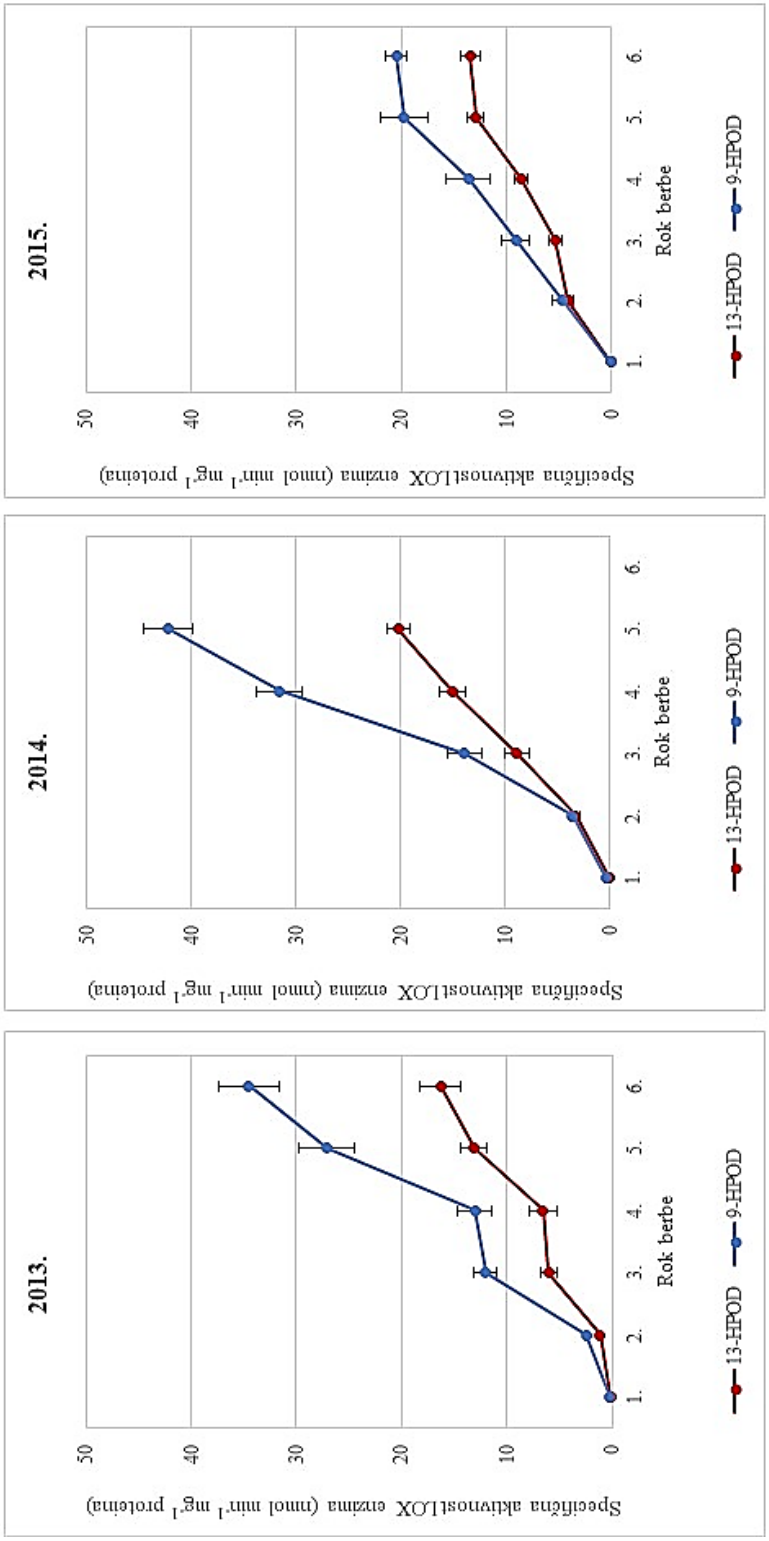
Specifične aktivnosti LOX enzime u plodovima maslina sorte Oblica, Levantinka i Lastovka, ovisno o rokovima berbe i godini istraživanja prikazane su na Slikama 21-23.

Vremenski tijek reakcije, za pojedinu sortu, istog roka berbe u 2013. i 2014. prikazuje Slika 24. Na Slikama 25-27. prikazan je pH profil LOX enzima u plodovima maslina ispitivanih sorti. U ispitivanju su korišteni plodovi maslina ranog (2.) i srednjeg (4.) roka berbe. Inhibicijski učinak NGDA na LOX enzim iz plodova maslina istraživanih sorti, 4. roka berbe u 2013. i 2014. godini prikazan je na Slici 28.

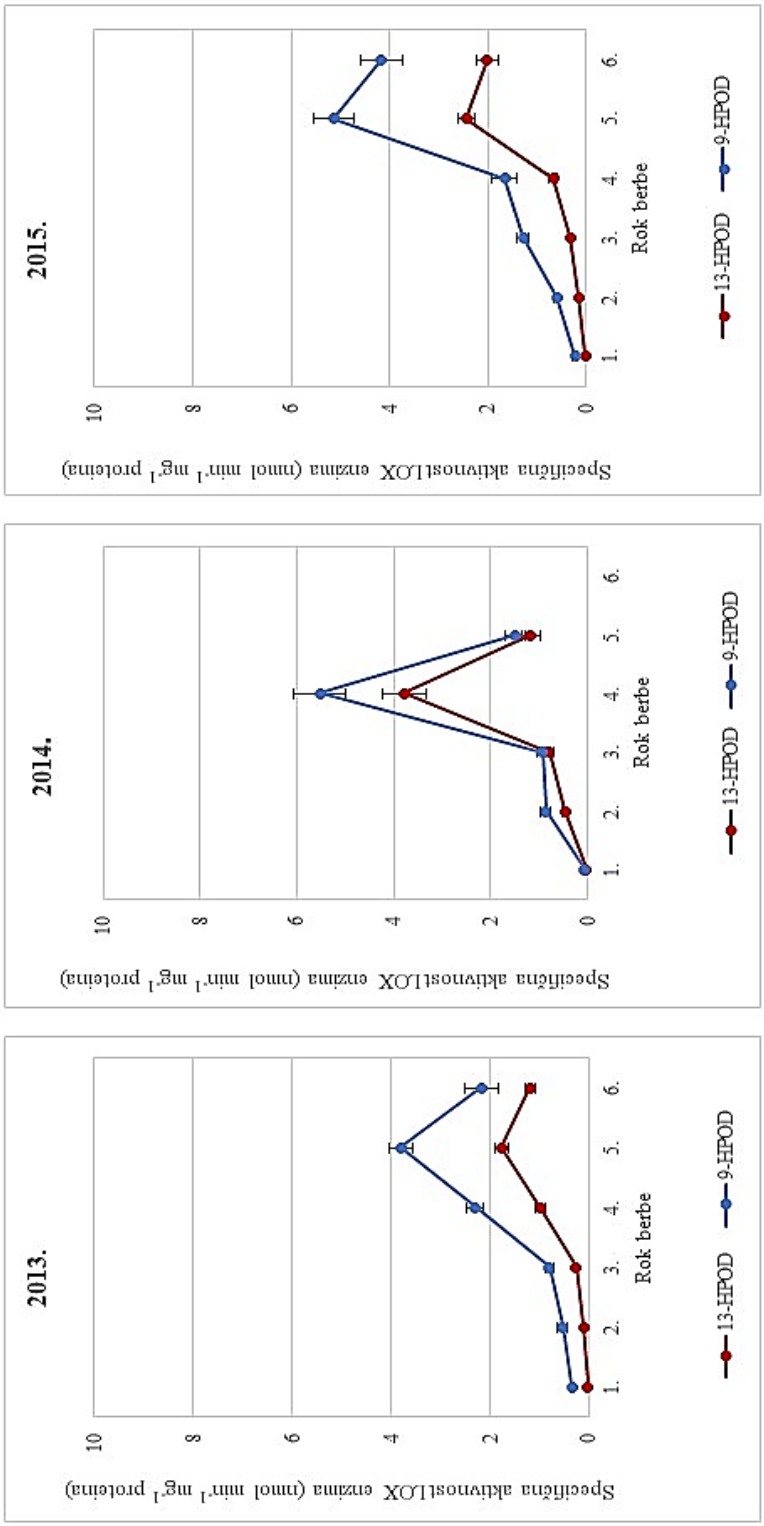
U prethodno spomenutim grafičkim prikazima se uz specifičnu aktivnost uočava i produktna specifičnost LOX enzima iz plodova maslina istraživanih sorti Oblica, Levantinka i Lastovka.



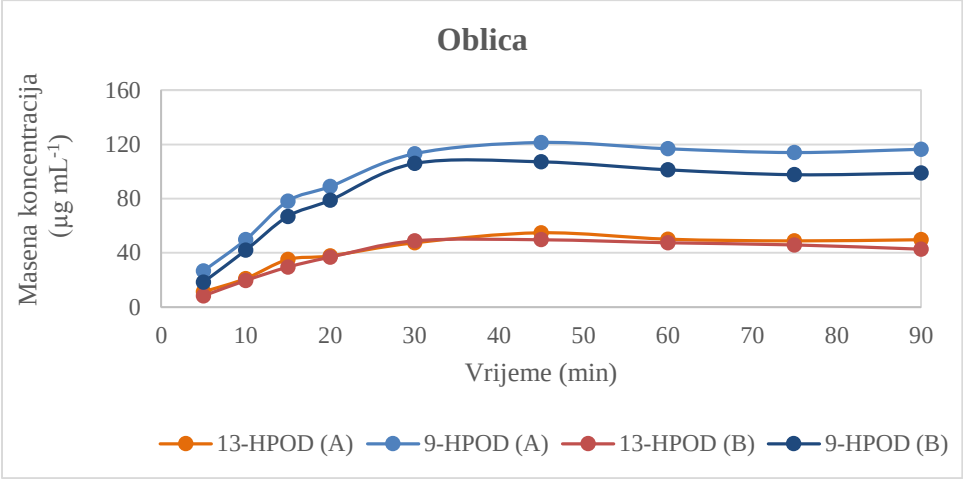
Slika 21. Specifična aktivnost LOX enzima u plodovima **Oblice** ovisno o roku berbe, odnosno stupnju zrelosti ploda (SZ), u tri uzastopne godine istraživanja. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri paralelna određivanja specifične aktivnosti ± SD.

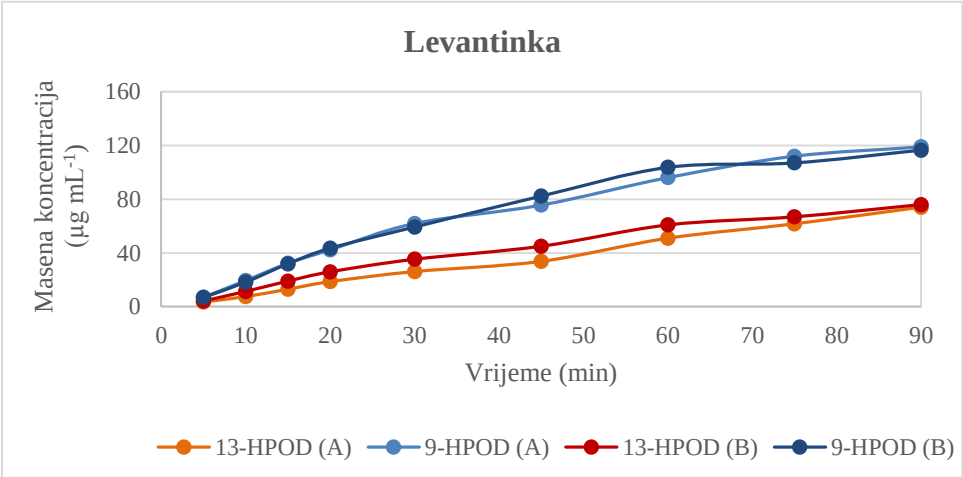


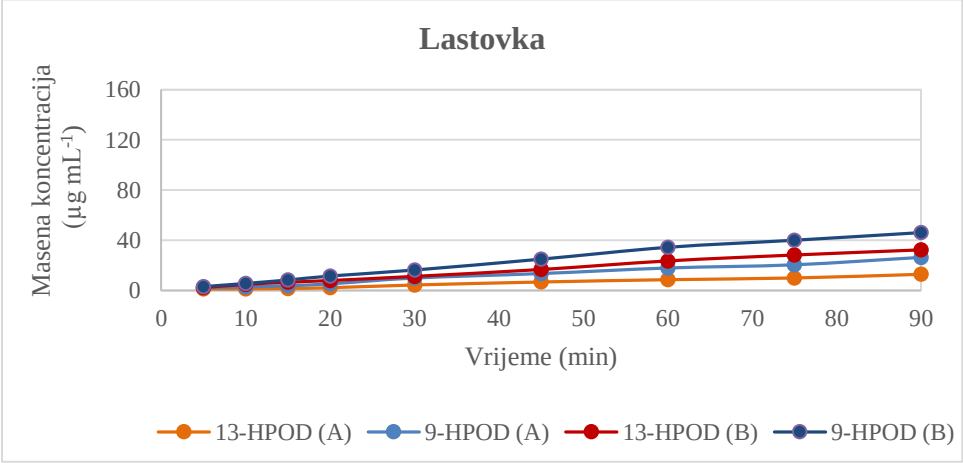
Slika 22. Specifična aktivnost LOX enzima u plodovima **Levantinke** ovisno o roku berbe, odnosno stupnju zrelosti ploda (SZ), u tri uzastopne godine istraživanja. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri paralelna određivanja specifične aktivnosti ± SD.



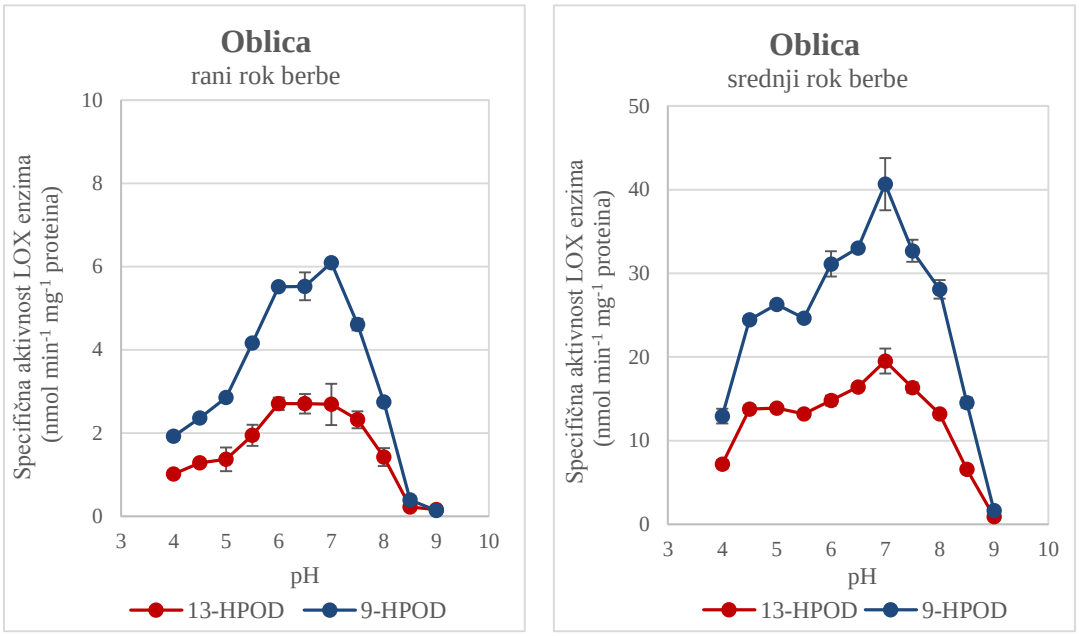
Slika 23. Specifična aktivnost LOX enzima u plodovima **Lastovke** ovisno o roku berbe, odnosno stupnju zrelosti ploda (SZ), u tri uzastopne godine istraživanja. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri paralelna određivanja specifične aktivnosti ± SD.



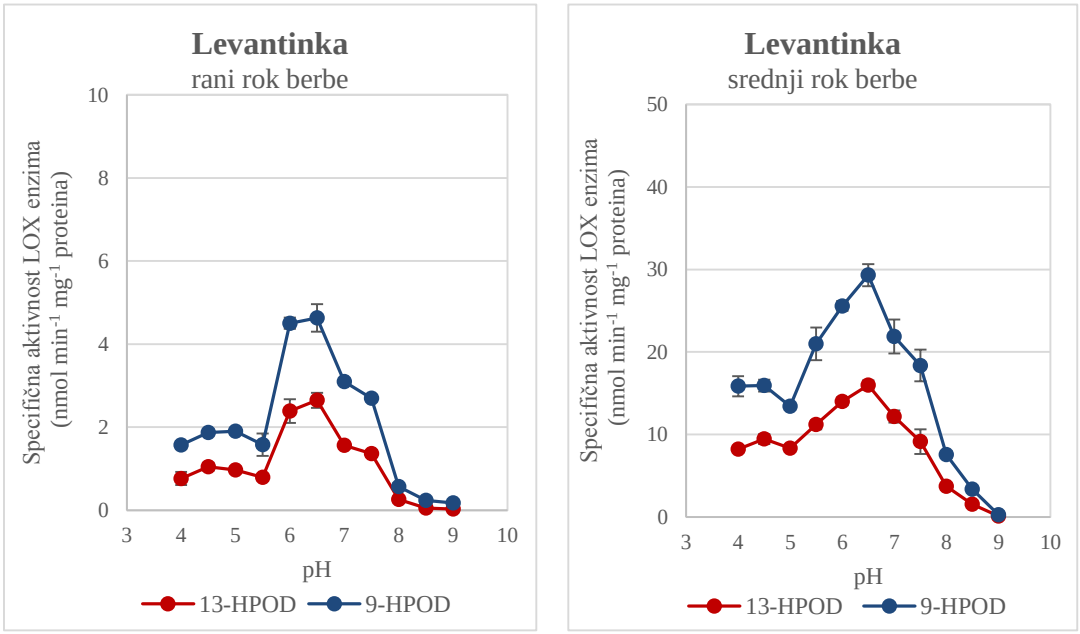




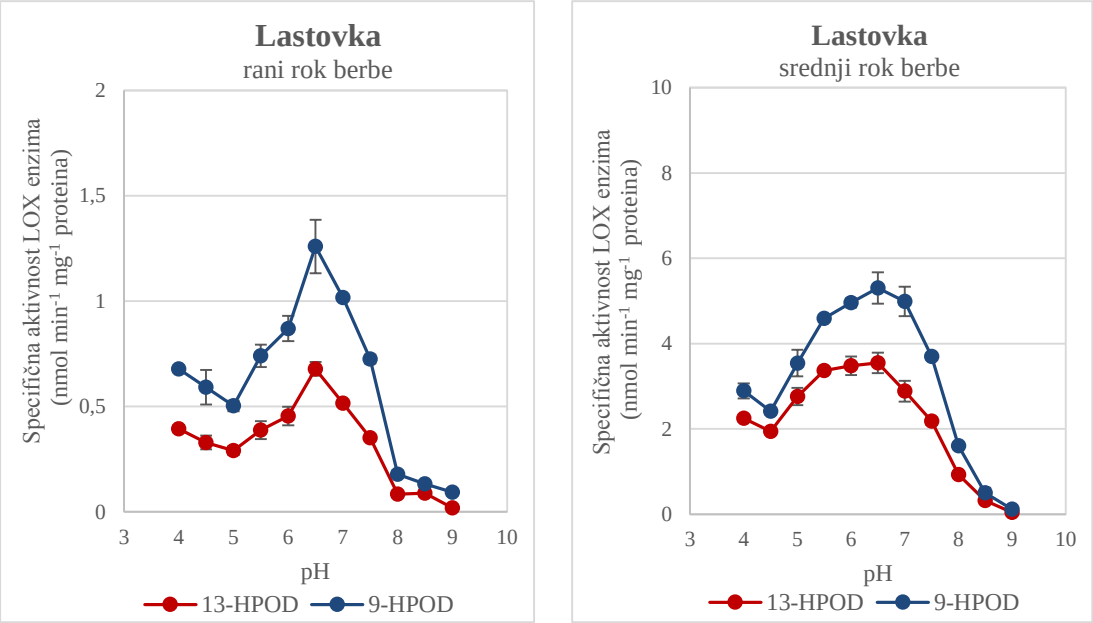
Slika 24. Vremenski tijek reakcije. Rezultati prikazuju promjenu masene koncentracije u seriji reakcija koje su se međusobno razlikovale u vremenu trajanja od 5 do 90 min. Za ispitivanje su korišteni proteinski ekstrakti izolirani iz plodova masline sorte Oblica, Levantinka i Lastovka, iz 4. roka berbe u 2013. (A) i 2014. (B) godini.



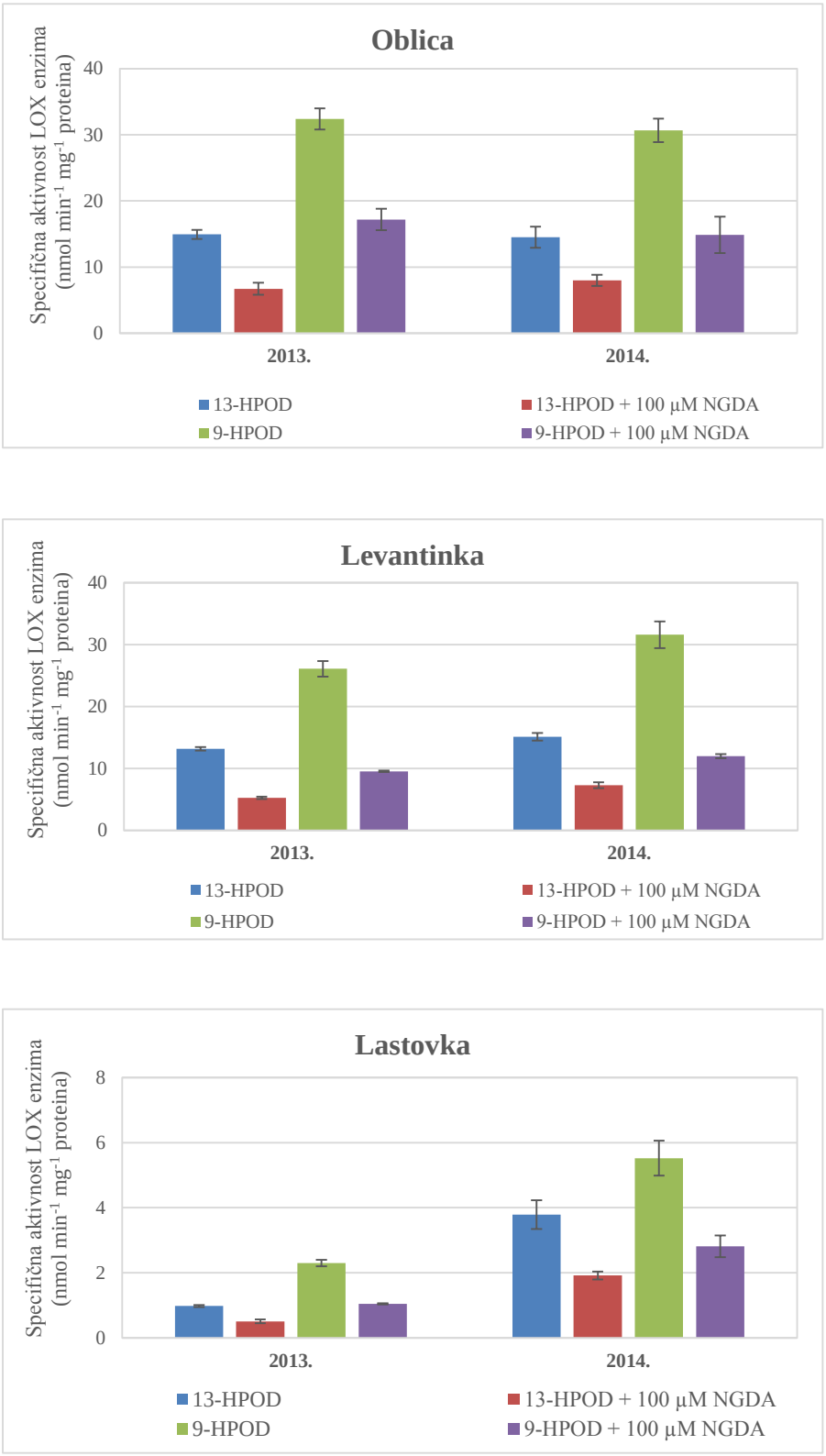
Slika 25. pH profil LOX enzima iz plodova masline sorte **Oblica**. Rezultati prikazuju specifičnu aktivnost enzima u rasponu pH od 4,5 do 9,0. Za ispitivanje su korišteni proteinski ekstrakti izolirani iz plodova masline ranog (2.) i srednjeg (4.) roka berbe u 2014. godini. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost triju određivanja ± SD.



Slika 26. pH profil LOX enzima iz plodova masline sorte **Levantinka**. Rezultati prikazuju specifičnu aktivnost enzima u rasponu pH od 4,5 do 9,0. Za ispitivanje su korišteni proteinski ekstrakti izolirani iz plodova masline ranog (2.) i srednjeg (4.) roka berbe u 2014. godini. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost triju određivanja ± SD.



Slika 27. pH profil LOX enzima iz plodova masline sorte **Lastovka**. Rezultati prikazuju specifičnu aktivnost enzima u rasponu pH od 4,5 do 9,0 Za ispitivanje su korišteni proteinski ekstrakti izoliran iz plodova masline ranog (2.) i srednjeg (4.) roka berbe u 2014. godini. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost triju određivanja ± SD.



Slika 28. Utjecaj nekompetitivnog inhibitora NGDA (100 µM) na specifičnu aktivnost LOX enzima. Za ispitivanje su korišteni proteinski ekstrakti izolirani iz plodova masline sorte Oblica, Levantinka i Lastovka ubrani u 4. roku berbe u 2013. i 2014. godine. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost triju određivanja ± SD.

4.1.2. Kemijski sastav djevičanskih maslinovih ulja sorte Oblica, Levantinka i Lastovka.

4.1.2.1. Osnovni kemijski parametri

Tablice 12-14. prikazuju osnovne kemijske parametre kvalitete; slobodne masne kiseline (SMK), peroksidni broj (PB) i vrijednost specifičnih ekstinkcija pri valnim duljinama 232 nm (K_{232}) i 270 nm (K_{270}), te ekstinkcijski koeficijent pri 270 nm umanjena za polovičnu vrijednost zbroja ekstinkcijskih koeficijenata pri 266 nm i 274 nm (ΔK), u sortnim uljima Oblice, Levantinke i Lastovke ovisno o roku berbe i godini istraživanja.

Tablica 12. Osnovni kemijski parametri kvalitete ispitivanih maslinovih ulja sorte **Oblica** u tri uzastopne godine istraživanja.

Godina	Rok berbe	SMK (% oleinske)	PB (mmol O_2 kg^{-1})	K_{232}	K_{270}	ΔK
2013.	1.	0,26 ± 0,01	3,63 ± 0,01	1,95 ± 0,07	0,15 ± 0,01	-0,01
	2.	0,19 ± 0,01	3,10 ± 0,02	1,72 ± 0,01	0,16 ± 0,04	-0,01
	3.	0,23 ± 0,01	2,48 ± 0,04	1,51 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,00
	4.	0,24 ± 0,01	4,34 ± 0,03	1,58 ± 0,08	0,13 ± 0,01	0,00
	5.	0,33 ± 0,02	3,20 ± 0,01	2,03 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,00
	6.	1,51 ± 0,08	6,32 ± 0,04	1,77 ± 0,10	0,15 ± 0,02	0,00
2014.	1.	0,24 ± 0,01	6,10 ± 0,07	2,15 ± 0,08	0,15 ± 0,01	0,00
	2.	0,29 ± 0,01	8,01 ± 0,04	2,00 ± 0,09	0,13 ± 0,03	0,00
	3.	0,63 ± 0,01	7,11 ± 0,14	2,05 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,00
2015.	1.	0,19 ± 0,01	2,22 ± 0,04	1,90 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,00
	2.	0,21 ± 0,02	1,97 ± 0,06	1,63 ± 0,07	0,15 ± 0,02	0,00
	3.	0,31 ± 0,01	4,13 ± 0,06	1,85 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,01
	4.	0,47 ± 0,02	5,41 ± 0,19	2,15 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,01
	5.	0,65 ± 0,04	6,69 ± 0,17	1,75 ± 0,05	0,17 ± 0,01	0,00

SMK-slobodne masne kiseline, PB-peroksidni broj, K_{232} i K_{270}-specifične ekstinkcije pri valnoj duljini 232 i 270 nm, ΔK-ekstinkcijski koeficijent pri 270 nm umanjena za polovičnu vrijednost zbroja ekstinkcijskih koeficijenata pri 266 nm i 274 nm. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost triju određivanja ± SD.

Tablica 13. Osnovni kemijski parametri kvalitete ispitivanih maslinovih ulja sorte **Levantinka** u tri uzastopne godine istraživanja.

Godina	Rok berbe	SMK (% oleinske)	PB (mmol O_2 kg^{-1})	K232	K270	ΔK
2013.	1.	0,34 ± 0,01	3,18 ± 0,08	1,92 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,00
	2.	0,23 ± 0,01	3,87 ± 0,12	2,06 ± 0,01	0,21 ± 0,06	0,00
	3.	0,22 ± 0,01	2,32 ± 0,04	1,67 ± 0,05	0,12 ± 0,01	0,00
	4.	0,33 ± 0,03	2,91 ± 0,10	1,64 ± 0,07	0,10 ± 0,02	0,00
	5.	0,30 ± 0,02	2,14 ± 0,04	1,96 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,01
	6.	0,27 ± 0,01	4,07 ± 0,04	2,06 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,00
2014.	1.	0,16 ± 0,01	6,23 ± 0,02	1,64 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,00
	2.	0,25 ± 0,01	7,36 ± 0,03	1,67 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,00
	3.	0,25 ± 0,01	4,08 ± 0,09	1,77 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,00
2015.	1.	0,15 ± 0,01	2,11 ± 0,01	1,77 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,00
	2.	0,18 ± 0,01	2,92 ± 0,04	1,63± 0,03	0,21 ± 0,05	0,00
	3.	0,24 ± 0,03	3,43 ± 0,03	2,04 ± 0,07	0,14 ± 0,01	0,00
	4.	0,38 ± 0,03	2,98 ± 0,08	2,13± 0,03	0,12 ± 0,01	-0,01
	5.	0,26 ± 0,01	4,50 ± 0,03	2,19 ± 0,03	0,09 ± 0,01	-0,01
	6.	0,40 ± 0,02	3,81 ± 0,09	2,02 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,00

SMK-slobodne masne kiseline, PB-peroksidni broj, K_{232} i K_{270}-specifične ekstinkcije pri valnoj duljini 232 i 270 nm, ΔK-ekstinkcijski koeficijent pri 270 nm umanjena za polovičnu vrijednost zbroja ekstinkcijskih koeficijenata pri 266 nm i 274 nm. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost triju određivanja ± SD.

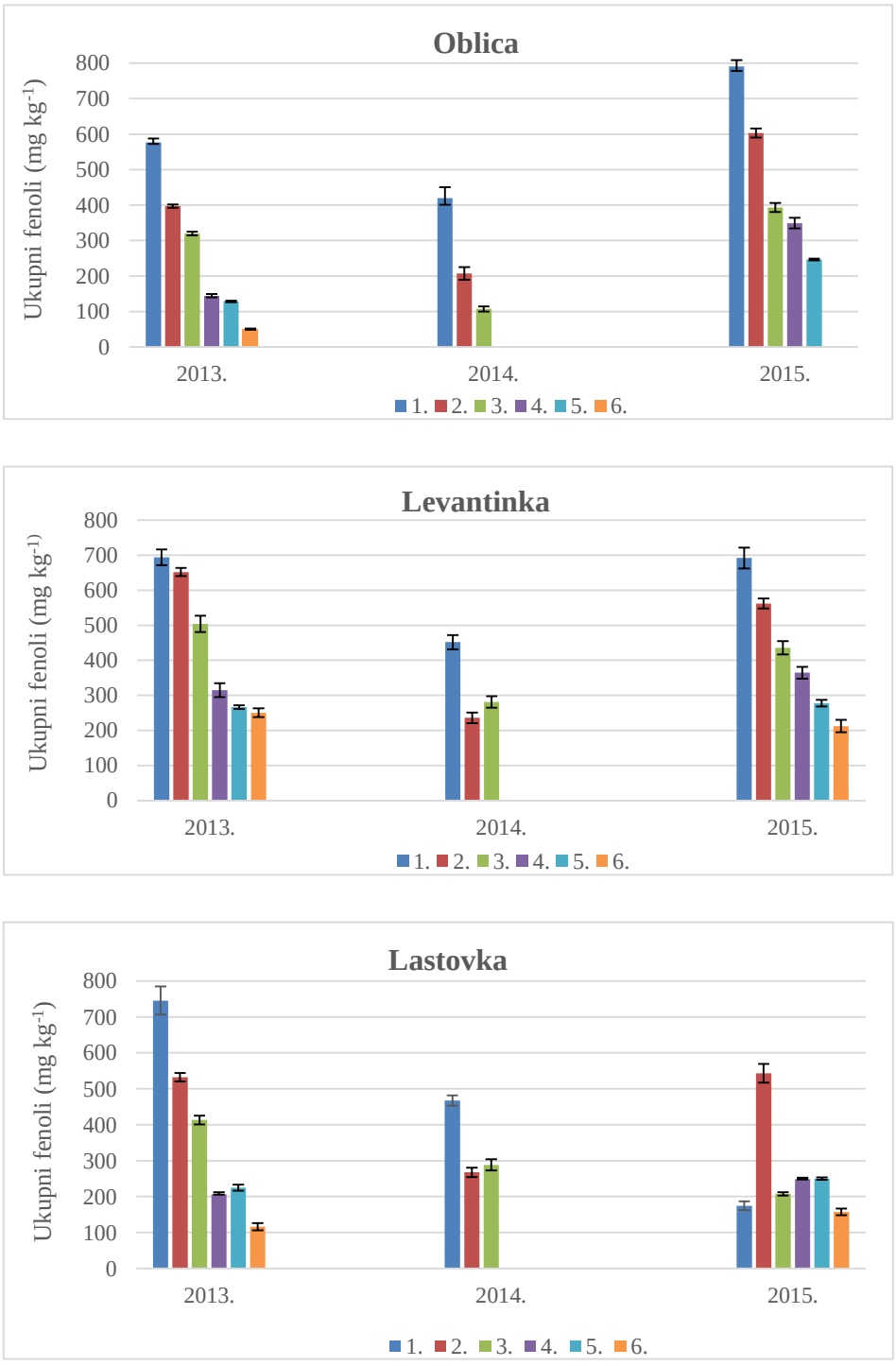
Tablica 14. Osnovni kemijski parametri kvalitete ispitivanih maslinovih ulja sorte **Lastovka** u tri uzastopne godine istraživanja.

Godina	Rok berbe	SMK (% oleinske)	PB (mmol O_2 kg^{-1})	K232	K270	ΔK
2013.	1 .	0,19 ±0,01	3,56 ± 0,14	1,73 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,00
	2.	0,18 ± 0,01	3,88 ± 0,06	1,88 ± 0,07	0,13 ± 0,01	0,00
	3.	0,19 ± 0,01	2,09 ± 0,05	1,49 ± 0,09	0,16 ± 0,02	0,00
	4.	0,21 ± 0,02	4,35 ± 0,14	2,00 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,00
	5.	0,30 ± 0,03	4,59 ± 0,33	2,01 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,00
	6.	0,31 ± 0,01	2,07 ± 0,06	1,82 ± 0,05	0,12 ± 0,01	0,00
2014.	1.	0,23 ± 0,01	2,53 ± 0,04	1,69 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,00
	2.	0,30 ± 0,01	2,64 ± 0,06	1,66 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,00
	3.	0,79 ± 0,02	2,84 ± 0,04	1,48 ± 0,12	0,13 ± 0,03	0,00
2015.	1.	0,19 ± 0,02	3,10 ± 0,02	1,88 ± 0,01	0,16 ± 0,02	-0,01
	2.	0,22 ± 0,01	3,24 ± 0,01	1,97 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,00
	3.	0,20 ± 0,01	2,21 ± 0,11	1,85 ± 0,06	0,16 ± 0,01	0,00
	4.	0,32 ± 0,03	1,92 ± 0,04	2,00 ± 0,02	0,12 ± 0,01	-0,01
	5.	0,36 ± 0,01	2,01 ± 0,12	2,08 ± 0,07	0,15 ± 0,02	0,00
	6.	0,32 ± 0,03	0,17 ± 0,01	1,87 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,00

SMK-slobodne masne kiseline, PB-peroksidni broj, K_{232} i K_{270}-specifične ekstinkcije pri valnoj duljini 232 i 270 nm, ΔK-ekstinkcijski koeficijent pri 270 nm umanjena za polovičnu vrijednost zbroja ekstinkcijskih koeficijenata pri 266 nm i 274 nm. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost triju određivanja ± SD.

4.1.2.2. Ukupni fenolni spojevi u djevičanskom maslinovom ulju sorte Oblica, Levantinka i Lastovka

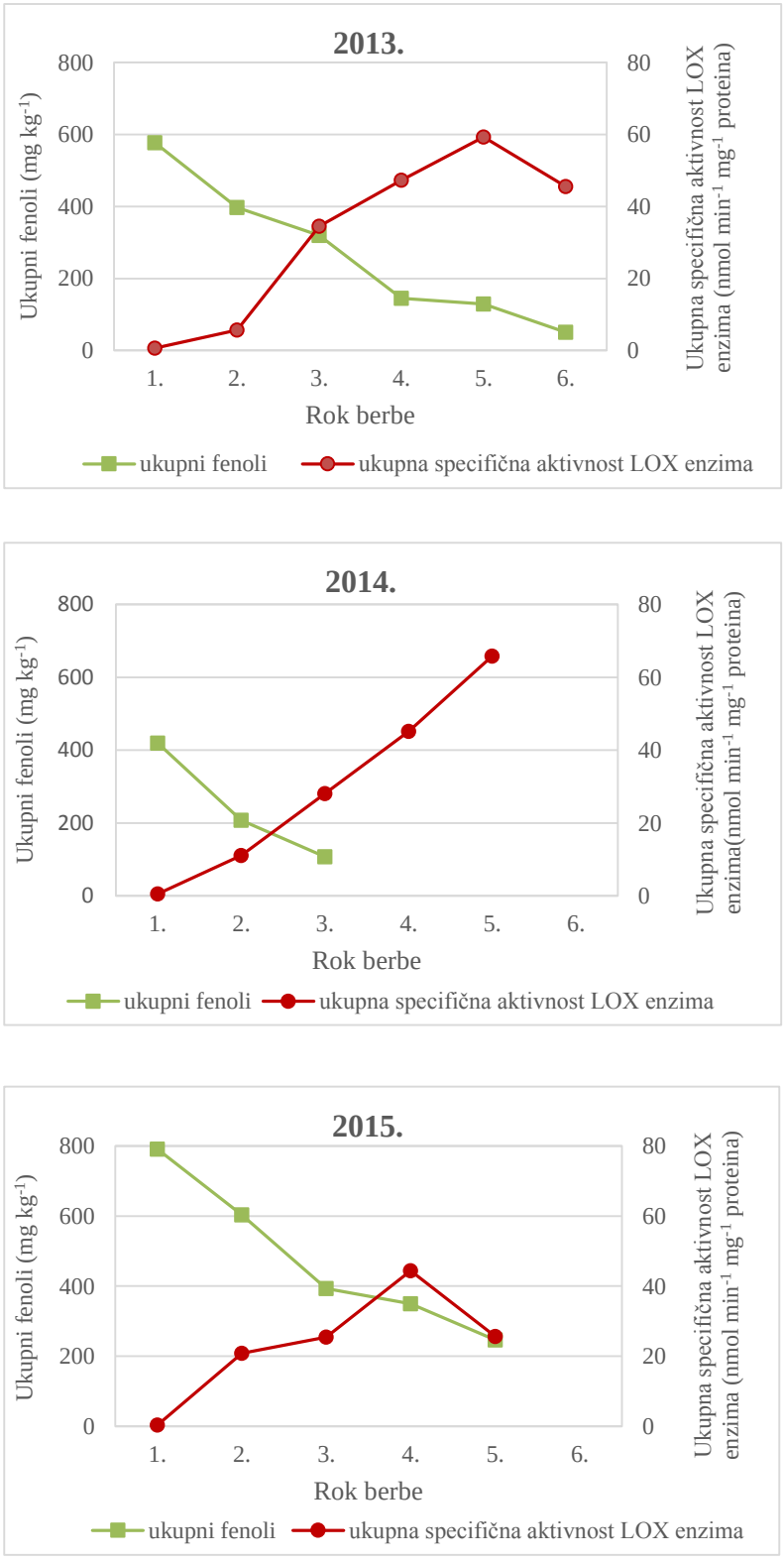
Rezultati spektrofotometrijske analize ukupnih fenolnih spojeva u DMU ispitivanih sorti ovisno o roku berbe i godini istraživanja, prikazani su na Slici 29.



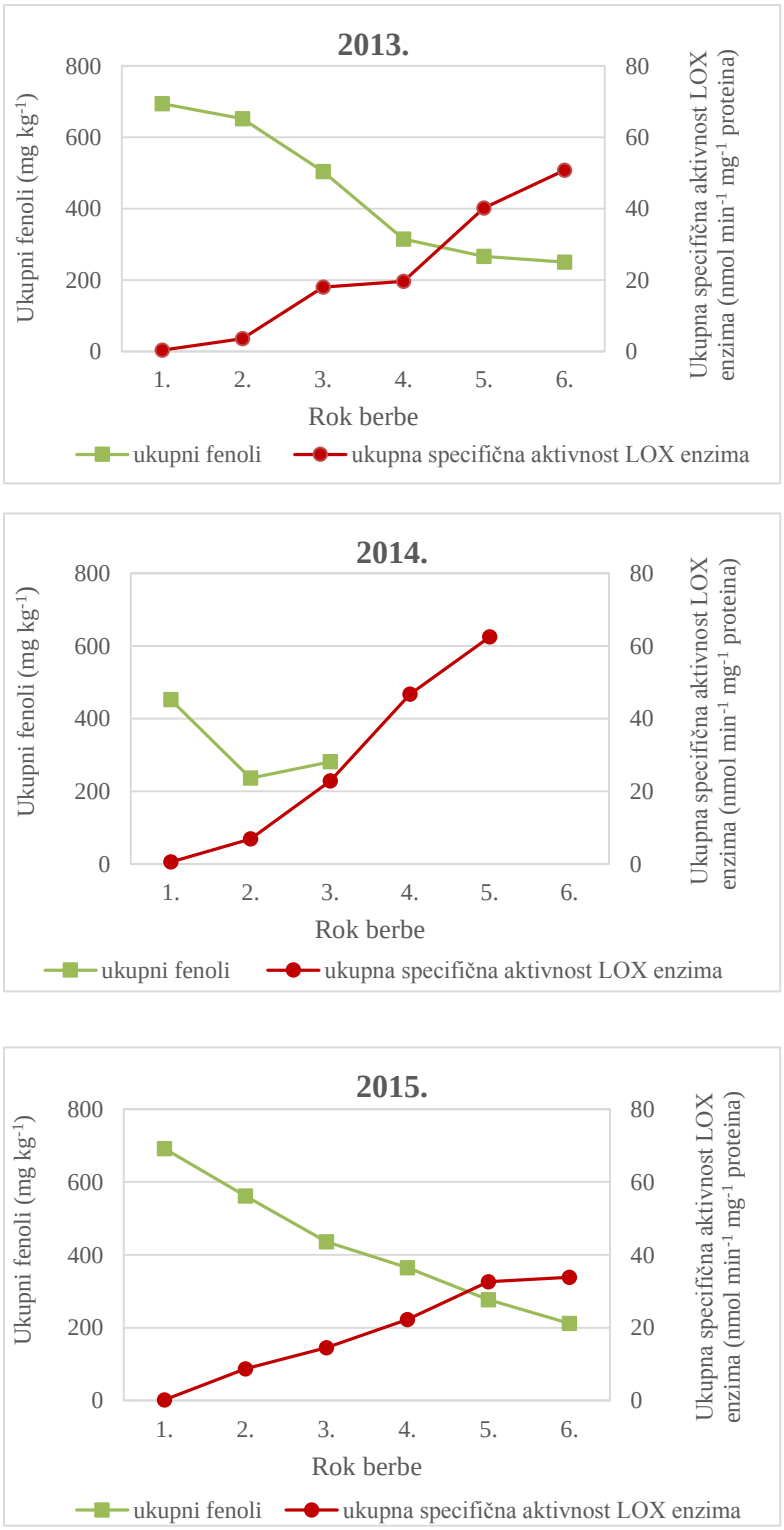
Slika 29. Maseni udio ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima sorte Oblica, Levantinka i Lastovka ovisno o roku berbe (1.-6.) u tri godine istraživanja. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost triju određivanja ± SD.

4.1.3. Usporedba specifične aktivnosti LOX enzima i ukupnih fenolnih spojeva

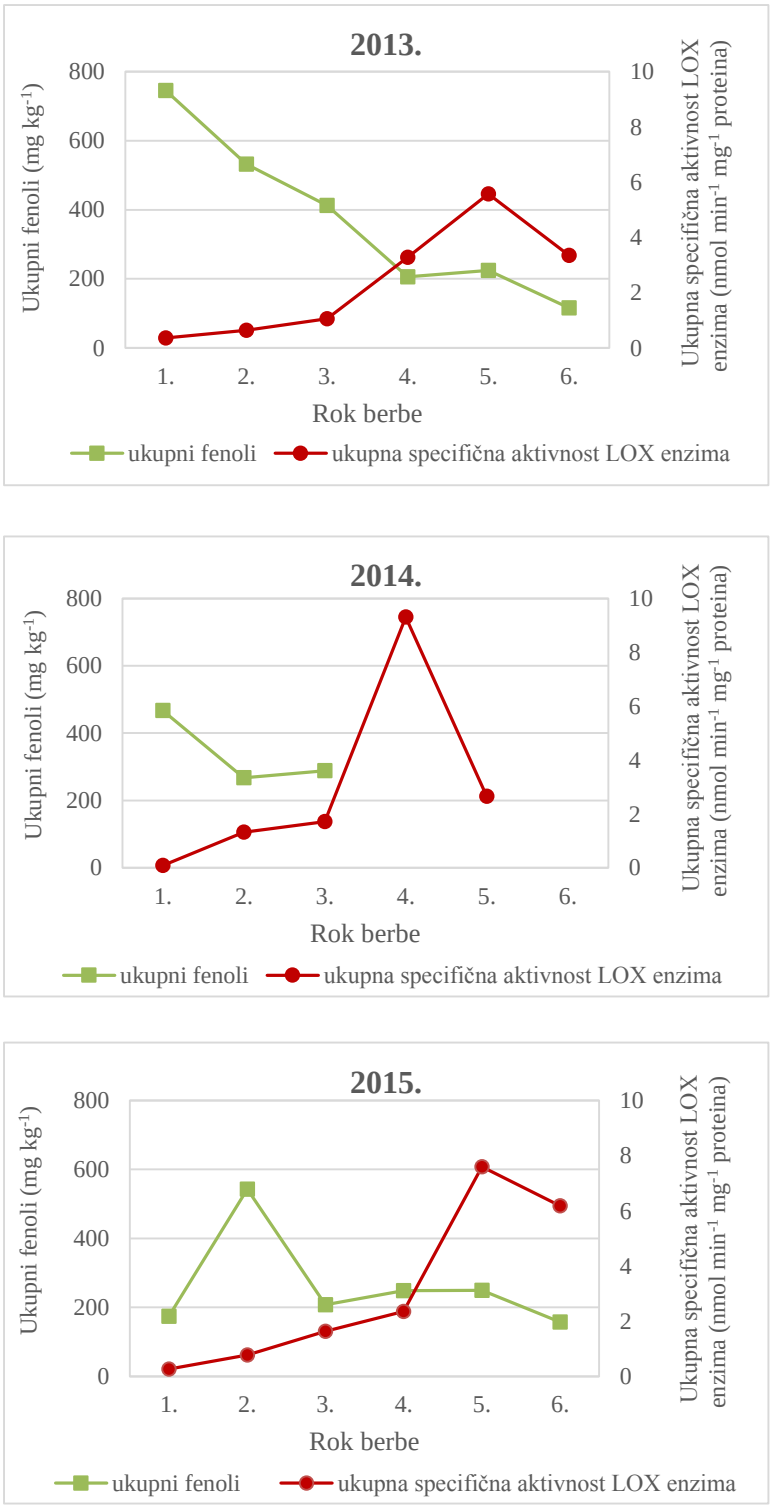
Slika 30. prikazuje usporedbu ukupne specifične aktivnosti LOX enzima (izražene preko zbroja specifičnih aktivnosti dobivenih mjerenjem količine nastalog produkta 9- i 13-*Z,E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina) u plodu Oblice i masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva u sortnom ulju, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja. Jednak pristup zadržan je na Slici 31. za Levantinku i na Slici 32. za Lastovku.



Slika 30. Usporedba ukupne specifične aktivnosti LOX enzima u plodu maslina i ukupnih fenolnih spojeva izoliranih iz djevičanskog maslinovog ulja sorte **Oblica**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja. Ukupna specifična aktivnost LOX enzima je izražena kao zbroj specifičnih aktivnosti dobivenih mjerenjem količine nastalog produkta 9- i 13-*Z,E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina.



Slika 31. Usporedba ukupne specifične aktivnosti LOX enzima u plodu masline i ukupnih fenolnih spojeva izoliranih iz djevičanskog maslinovog ulja sorte **Levantinka**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja. Ukupna specifična aktivnost LOX enzima je izražena kao zbroj specifičnih aktivnosti dobivenih mjerenjem količine nastalog produkta 9- i 13-*Z,E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina.



Slika 32. Usporedba ukupne specifične aktivnosti LOX enzima u plodu masline i ukupnih fenolnih spojeva izoliranih iz djevičanskog maslinovog ulja sorte **Lastovka**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja. Ukupna specifična aktivnost LOX enzima je izražena kao zbroj specifičnih aktivnosti dobivenih mjerenjem količine nastalog produkta 9- i 13-*Z*,*E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina.

4.1.4. Hlapljive tvari djevičanskih maslinovih ulja sorte Oblica, Levantinka i Lastovka

Maseni udjeli pojedinih proučavanih hlapljivih tvari, te sadržaj ukupnih hlapljivih tvari u djevičanskom ulju, ovisno o roku berbe i godini istraživanja prikazan je za sortu Oblica u Tablici 15-17., za sortu Levantinka u Tablici 18-20. i sortu Lastovka u Tablici 21-23.

Maseni udio ukupnih hlapljivih tvari, ukupnih aldehida, ukupnih alkohola i ukupnih estera u ovisnosti o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja prikazan je za sortu Oblica na Slici 33., sortu Levantinka na Slici 34. i sortu Lastovka na Slici 35.

Maseni udio ukupnih C_6 i C_5 hlapljivih tvari u uzorcima djevičanskih sortnih ulja prikazan je za sortu Oblica na Slici 36., za sortu Levantinka na Slici 37. i sortu Lastovka na Slici 38.

Tablica 15. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Oblica** ovisno o roku berbe (1.-6.) u **2013.** godini.

	Rok berbe					
HLAPLJIVA TVAR	**1.** (mg kg^{-1})	**2.** (mg kg^{-1})	**3.** (mg kg^{-1})	**4.** (mg kg^{-1})	**5.** (mg kg^{-1})	**6.** (mg kg^{-1})
pentanal	0,152 ± 0,011	0,132 ± 0,008	0,166 ± 0,002	0,211 ± 0,004	0,966 ± 0,073	2,711 ± 0,080
heksanal	1,600 ± 0,085	1,534 ± 0,047	2,066 ± 0,109	2,844 ± 0,193	1,798 ± 0,136	1,031 ± 0,133
E-2-heksenal	14,064 ± 0,612	14,486 ± 0,834	23,452 ± 1,505	32,614 ± 2,202	23,505 ± 0,859	2,485 ± 0,112
oktanal	0,556 ± 0,054	0,127 ± 0,005	0,090 ± 0,008	0,181 ± 0,006	0,081 ± 0,006	0,054 ± 0,000
ukupni aldehidi	16,372 ± 0,761	16,278 ± 0,893	25,773 ± 1,624	35,850 ± 2,425	26,349 ± 1,075	6,280 ± 0,325
etanol	0,126 ± 0,005	0,287 ± 0,001	0,207 ± 0,013	0,768 ± 0,062	1,250 ± 0,051	5,409 ± 0,350
smjesa butanola	0,097 ± 0,007	0,038 ± 0,001	0,076 ± 0,006	0,032 ± 0,001	0,030 ± 0,001	0,276 ± 0,004
1-penten-3-ol	1,103 ± 0,052	1,231 ± 0,334	0,629 ± 0,016	0,629 ± 0,021	0,333 ± 0,027	0,552 ± 0,041
4-metilpentan-2-ol	n.d.	n.d.	n.d.	0,067 ± 0,001	0,068 ± 0,001	0,088 ± 0,002
heksanol	n.d.	0,101 ± 0,003	0,104 ± 0,003	0,567 ± 0,031	0,849 ± 0,080	3,954 ± 0,248
E-2-heksen-1-ol	0,273 ± 0,016	0,445 ± 0,070	0,288 ± 0,018	0,301 ± 0,028	3,855 ± 0,323	5,670 ± 0,355
Z-3-heksen-1-ol	0,667 ± 0,044	0,771 ± 0,071	1,555 ± 0,071	3,991 ± 0,191	3,408 ± 0,186	4,819 ± 0,123
ukupni alkoholi	2,265 ± 0,124	2,871 ± 0,480	2,859 ± 0,126	6,352 ± 0,354	9,792 ± 0,739	20,766 ± 1,113
etil-acetat	0,017 ± 0,001	0,011 ± 0,000	n.d.	0,044 ± 0,000	0,035 ± 0,005	0,085 ± 0,000
butil-acetat	0,282 ± 0,001	0,232 ± 0,020	0,134 ± 0,003	0,124 ± 0,003	0,113 ± 0,001	0,069 ± 0,002
etil-butirat	0,014 ± 0,001	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,001	0,017 ± 0,001	n.d.	n.d.
heksil-acetat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,295 ± 0,018	0,689 ± 0,048
ukupni esteri	0,312 ± 0,003	0,260± 0,022	0,151 ± 0,002	0,185 ± 0,004	0,442 ± 0,024	0,842 ± 0,050
etanska kiselina	0,578 ± 0,013	0,698 ± 0,066	0,783 ± 0,046	1,197 ± 0,004	0,724 ± 0,055	0,099 ± 0,009
butanska kiselina	0,170 ± 0,014	n.d.	0,080 ± 0,007	0,257 ± 0,037	0,240 ± 0,018	n.d.
heksanska kiselina	0,111 ± 0,018	0,099 ± 0,026	0,090 ± 0,003	0,154 ± 0,001	0,173 ± 0,009	0,263 ± 0,017
ukupne organske kiseline	0,859 ± 0,017	0,797 ± 0,092	0,952 ± 0,056	1,607 ± 0,040	1,136 ± 0,122	0,362 ± 0,026
ukupne hlapljive tvari	19,808 ± 0,933	20,206 ± 1,486	29,734 ± 1,810	43,993 ± 2,135	37,717 ± 1,961	28,250 ± 1,514

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n.d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.

Tablica 16. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Oblica** ovisno o roku berbe (1.–3.) u **2014.** godini.

	Rok berbe		
	1.	**2.**	**3.**
HLAPLJIVE TVARI	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})
pentanal	0,467 ± 0,016	0,709 ± 0,025	0,577 ± 0,023
heksanal	2,099 ± 0,163	2,990 ± 0,161	4,492 ± 0,226
E-2-heksenal	24,185 ± 0,842	31,385 ± 1,445	40,720 ± 1,186
oktanal	0,277 ± 0,023	0,334 ± 0,008	0,354 ± 0,016
ukupni aldehidi	27,027 ± 0,687	35,418 ± 1,639	46,142 ± 1,450
etanol	0,613 ± 0,056	2,063 ± 0,177	1,333 ± 0,098
smjesa butanola	0,122 ± 0,004	0,115 ± 0,007	0,143 ± 0,001
1-penten-3-ol	1,064 ± 0,081	0,866 ± 0,071	0,626 ± 0,028
4-metilpentan-2-ol	0,045 ± 0,002	0,075 ± 0,004	0,030 ± 0,002
heksanol	0,055 ± 0,003	0,273 ± 0,008	0,503 ± 0,036
E-2-heksen-1-ol	0,038 ± 0,001	0,811 ± 0,045	1,164 ± 0,030
Z-3-heksen-1-ol	0,818 ± 0,057	1,570 ± 0,096	3,158 ± 0,228
ukupni alkoholi	2,753 ± 0,205	5,772 ± 0,408	6,955 ± 0,423
etil-acetat	0,031 ± 0,000	0,031 ± 0,004	0,044 ± 0,001
butil-acetat	0,117 ± 0,004	0,101 ± 0,001	0,118 ± 0,004
etil-butirat	0,014 ± 0,000	0,023 ± 0,002	0,017 ± 0,001
heksil-acetat	n.d.	n.d.	0,053 ± 0,004
ukupni esteri	0,162 ± 0,004	0,155 ± 0,007	0,232 ± 0,008
etanska kiselina	0,552 ± 0,004	0,267 ± 0,015	0,726 ± 0,031
butanska kiselina	0,081 ± 0,008	0,098 ± 0,009	0,105 ± 0,001
heksanska kiselina	0,403 ± 0,017	0,325 ± 0,012	0,529 ± 0,036
ukupne organske kiseline	1,036 ± 0,029	0,689 ± 0,036	1,359 ± 0,068
ukupne hlapljive tvari	30,977 ± 0,924	42,032 ± 2,090	54,687 ± 1,952

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n.d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.

Tablica 17. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Oblica** ovisno o roku berbe (1.–5.) u **2015.** godini.

	Rok berbe				
HLAPLJIVA TVAR	**1.** (mg kg^{-1})	**2.** (mg kg^{-1})	**3.** (mg kg^{-1})	**4.** (mg kg^{-1})	**5.** (mg kg^{-1})
pentanal	0,643 ± 0,071	0,253 ± 0,005	0,277 ± 0,003	0,316 ± 0,023	0,431 ± 0,003
heksanal	1,006 ± 0,045	1,124 ± 0,086	1,526 ± 0,052	1,080 ± 0,087	0,426 ± 0,086
E-2-heksenal	6,388 ± 0,281	9,993 ± 0,540	26,877 ± 1,317	13,010 ± 0,415	8,690 ± 0,221
oktanal	0,136 ± 0,000	0,087 ± 0,008	0,110 ± 0,012	0,430 ± 0,025	0,254 ± 0,010
ukupni aldehidi	8,173 ± 0,398	11,456 ± 0,639	28,790 ± 1,384	14,835 ± 0,551	9,801 ± 0,320
etanol	0,260 ± 0,043	0,215 ± 0,009	9,479 ± 0,463	2,283 ± 0,239	4,002 ± 0,285
smjesa butanola	0,149 ± 0,012	0,204 ± 0,002	0,665 ± 0,049	0,041 ± 0,001	0,062 ± 0,006
1-penten-3-ol	2,152 ± 0,131	0,968 ± 0,074	0,454 ± 0,011	0,466 ± 0,016	0,444 ± 0,021
4-metilpentan-2-ol	n.d.	n.d.	0,037 ± 0,002	0,028± 0,003	0,022 ± 0,003
heksanol	0,049 ± 0,006	0,077 ± 0,006	0,671 ± 0,017	1,362 ± 0,132	1,941 ± 0,161
E-2-heksen-1-ol	0,465 ± 0,042	0,885 ± 0,082	0,702 ± 0,065	0,191 ± 0,018	0,310 ± 0,029
Z-3-heksen-1-ol	1,086 ± 0,076	1,113 ± 0,064	5,504 ± 0,426	2,475 ± 0,209	7,658 ± 0,375
ukupni alkoholi	4,159 ± 0,285	3,461 ± 0,232	17,511 ± 1,033	6,846 ± 0,617	14,437 ± 0,881
etil-acetat	0,023 ± 0,000	0,021 ± 0,003	0,022 ± 0,002	0,028 ± 0,004	0,013 ± 0,001
butil-acetat	0,337 ± 0,022	0,258 ± 0,021	0,081 ± 0,004	0,105 ± 0,005	0,092 ± 0,006
etil-butirat	0,018 ± 0,004	0,013 ± 0,002	0,027 ± 0,007	0,026 ± 0,001	0,015 ± 0,006
heksil-acetat	0,029 ± 0,001	n.d.	0,130 ± 0,000	0,101 ± 0,002	0,047 ± 0,002
ukupni esteri	0,406 ± 0,027	0,292 ± 0,022	0,260 ± 0,013	0,260 ± 0,012	0,167 ± 0,015
etanska kiselina	0,407 ± 0,049	0,309 ± 0,006	1,311 ± 0,229	2,234 ± 0,159	0,926 ± 0,040
butanska kiselina	0,116 ± 0,008	0,087 ± 0,010	0,093 ± 0,006	0,115 ± 0,011	0,083 ± 0,006
heksanska kiselina	0,303 ± 0,029	0,172 ± 0,024	0,151 ± 0,022	0,136 ± 0,023	0,140 ± 0,016
ukupne organske kiseline	0,825 ± 0,028	0,568 ± 0,020	1,555 ± 0,257	2,485 ± 0,193	1,149 ± 0,062
ukupne hlapljive tvari	13,562 ± 0,739	15,777 ± 0,913	48,113 ± 2,676	24,426 ± 1,373	25,555 ± 1,278

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n.d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.

Tablica 18. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Levantinka** ovisno o roku berbe (1.-6.) u **2013.** godini.

	Rok berbe					
HLAPLJIVA TVAR	**1.** (mg kg^{-1})	**2.** (mg kg^{-1})	**3.** (mg kg^{-1})	**4.** (mg kg^{-1})	**5.** (mg kg^{-1})	**6.** (mg kg^{-1})
pentanal	0,145 ± 0,007	0,867 ± 0,066	0,171 ± 0,018	0,211 ± 0,023	0,398 ± 0,038	0,635 ± 0,018
heksanal	1,155 ± 0,080	1,394 ± 0,018	1,427 ± 0,099	1,648 ± 0,129	1,294 ± 0,099	0,887 ± 0,103
E-2-heksenal	19,162 ± 0,911	22,957 ± 1,117	23,642 ± 1,638	33,838 ± 1,977	29,907 ± 0,179	11,869 ± 0,554
oktanal	0,917 ± 0,023	0,067 ± 0,011	0,109 ± 0,017	0,070 ± 0,003	0,504 ± 0,047	0,059 ± 0,001
ukupni aldehidi	21,378 ± 1,021	25,284 ± 1,212	25,349 ± 1,771	35,766 ± 2,133	32,102 ± 0,363	13,450 ± 0,677
etanol	0,096 ± 0,003	0,437 ± 0,021	0,148 ± 0,013	0,464 ± 0,031	1,385 ± 0,127	3,062 ± 0,110
smjesa butanola	0,043 ± 0,001	0,038 ± 0,006	0,078 ± 0,004	0,077 ± 0,009	0,050 ± 0,008	0,044 ± 0,006
1-penten-3-ol	1,128 ± 0,021	1,139 ± 0,059	0,546 ± 0,016	0,719 ± 0,074	0,316 ± 0,020	0,298 ± 0,016
4-metilpentan-2-ol	n.d.	n.d.	0,015 ± 0,001	0,018 ± 0,003	0,061 ± 0,007	0,039 ± 0,001
heksanol	0,016 ± 0,001	0,493 ± 0,029	0,252 ± 0,010	0,263 ± 0,014	0,348 ± 0,017	1,079 ± 0,117
E-2-heksen-1-ol	0,292 ± 0,015	1,695 ± 0,192	0,652 ± 0,041	1,263 ± 0,099	1,898 ± 0,107	4,397 ± 0,206
Z-3-heksen-1-ol	0,466 ± 0,028	3,261 ± 0,256	1,608 ± 0,107	1,654 ± 0,115	1,939 ± 0,204	0,795 ± 0,073
ukupni alkoholi	2,039 ± 0,067	7,062 ± 0,562	3,298 ± 0,193	4,458 ± 0,344	5,996 ± 0,490	9,713 ± 0,531
etil-acetat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,048 ± 0,006	0,022 ± 0,004
butil-acetat	0,270 ± 0,018	0,229 ± 0,006	0,141 ± 0,008	0,113 ± 0,004	0,107 ± 0,009	0,064 ± 0,008
etil-butirat	0,033 ± 0,003	0,014 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,018 ± 0,003	0,155 ± 0,177	0,025 ± 0,002
heksil-acetat	n.d.	n.d.	0,189 ± 0,005	0,586 ± 0,023	0,497 ± 0,020	0,066 ± 0,004
ukupni esteri	0,303 ± 0,021	0,243 ± 0,008	0,349 ± 0,014	0,717 ± 0,030	0,806 ± 0,212	0,176 ± 0,018
etanska kiselina	0,424 ± 0,030	0,265 ± 0,001	0,370 ± 0,094	0,573 ± 0,031	0,262 ± 0,024	0,502 ± 0,121
butanska kiselina	0,086 ± 0,005	0,210 ± 0,012	0,137 ± 0,018	0,219 ± 0,007	0,412 ± 0,051	0,159 ± 0,014
heksanska kiselina	0,096 ± 0,004	0,112 ± 0,025	0,312 ± 0,006	0,176 ± 0,020	0,130 ± 0,025	0,109 ± 0,012
ukupne organske kiseline	0,606 ± 0,039	0,586 ± 0,014	0,818 ± 0,117	0,968 ± 0,058	0,804 ± 0,100	0,769 ± 0,147
ukupne hlapljive tvari	24,325 ± 1,148	33,174 ± 1,820	29,813 ± 2,096	41,909 ± 2,565	39,707 ± 1,165	24,107 ± 1,372

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n.d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.

Tablica 19. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Levantinka** ovisno o roku berbe (1.–3.) u **2014.** godini.

	Rok berbe		
	1.	**2.**	**3.**
HLAPLJIVA TVAR	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})
pentanal	0,228 ± 0,027	0,205 ± 0,008	0,139 ± 0,013
heksanal	1,778 ± 0,119	3,628 ± 0,204	3,047 ± 0,245
E-2-heksenal	30,195 ± 1,092	47,295 ± 2,77	43,584 ± 2,713
oktanal	0,028 ± 0,003	0,098 ± 0,006	0,265 ± 0,012
ukupni aldehidi	32,229 ± 1,240	51,225 ± 2,989	47,036 ± 2,984
etanol	1,416 ± 0,114	2,037 ± 0,149	1,453 ± 0,108
smjesa butanola	0,111 ± 0,015	0,072 ± 0,003	0,09 ± 0,006
1-penten-3-ol	1,201 ± 0,067	0,703 ± 0,053	0,659 ± 0,053
4-metilpentan-2-ol	0,056 ± 0,010	0,050 ± 0,004	0,045 ± 0,003
heksanol	0,029 ± 0,003	0,094 ± 0,001	0,081 ± 0,006
E-2-heksen-1-ol	0,174 ± 0,019	0,356 ± 0,008	0,268 ± 0,038
Z-3-heksen-1-ol	0,414 ± 0,097	0,963 ± 0,003	0,829 ± 0,052
ukupni alkoholi	3,400 ± 0,324	4,275 ± 0,221	3,424 ± 0,267
etil-acetat	0,043 ± 0,004	0,024 ± 0,002	0,060 ± 0,008
butil-acetat	0,263 ± 0,015	0,202 ± 0,015	0,248 ± 0,027
etil-butirat	0,017 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,010 ± 0,001
heksil-acetat	0,048 ± 0,003	n.d.	0,595 ± 0,042
ukupni esteri	0,370 ± 0,023	0,236 ± 0,017	0,914 ± 0,078
etanska kiselina	0,111 ± 0,015	0,141 ± 0,042	0,250 ± 0,030
butanska kiselina	0,104 ± 0,021	0,055 ± 0,006	0,084 ± 0,006
heksanska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.
ukupne organske kiseline	0,215 ± 0,037	0,196 ± 0,048	0,335 ± 0,036
ukupne hlapljive tvari	36,214 ± 1,623	55,932 ± 3,275	51,708 ± 3,364

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n.d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.

Tablica 20. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Levantinka** ovisno o roku berbe (1.– 6.) u **2015.** godini.

	Rok berbe					
HLAPLJIVA TVAR	**1.** (mg kg^{-1})	**2.** (mg kg^{-1})	**3.** (mg kg^{-1})	**4.** (mg kg^{-1})	**5.** (mg kg^{-1})	**6.** (mg kg^{-1})
pentanal	0,389 ± 0,024	0,155 ± 0,002	0,233 ± 0,000	0,154 ± 0,008	0,120 ± 0,012	0,169 ± 0,003
heksanal	0,902 ± 0,124	0,804 ± 0,084	0,584 ± 0,087	0,367 ± 0,034	0,177 ± 0,010	0,087 ± 0,037
E-2-heksanal	26,276 ± 1,353	28,965 ± 2,148	34,23 ± 1,615	25,163 ± 1,370	25,982 ± 0,221	25,504 ± 0,175
oktanal	0,101 ± 0,006	0,137 ± 0,005	0,257 ± 0,018	0,307 ± 0,024	0,322 ± 0,018	0,260± 0,006
ukupni aldehidi	27,668 ± 1,507	30,060 ± 2,239	35,303 ± 1,720	25,991 ± 1,436	26,600 ± 0,260	26,020 ± 0,220
etanol	0,282 ± 0,040	0,180 ± 0,004	0,699 ± 0,028	0,501 ± 0,025	1,173 ± 0,158	0,408 ± 0,006
smjesa butanola	0,078 ± 0,003	0,080 ± 0,001	0,067 ± 0,004	0,379 ± 0,440	0,057 ± 0,007	0,032 ± 0,001
1-penten-3-ol	1,686 ± 0,146	0,760 ± 0,049	0,678 ± 0,037	0,462 ± 0,013	0,335 ± 0,013	0,272 ± 0,000
4-metilpentan-2-ol	n.d.	n.d.	n.d.	0,013 ± 0,000	0,017 ± 0,002	0,032 ± 0,000
heksanol	0,152 ± 0,006	0,120 ± 0,008	0,264 ± 0,016	0,445 ± 0,026	0,210 ± 0,000	0,461 ± 0,011
E-2-heksen-1-ol	1,321 ± 0,112	0,766 ± 0,021	0,796 ± 0,084	0,607 ± 0,074	0,428 ± 0,018	0,977 ± 0,023
Z-3-heksen-1-ol	2,501 ± 0,180	1,095 ± 0,121	1,656 ± 0,028	2,064 ± 0,180	0,849 ± 0,048	2,535 ± 0,064
ukupni alkoholi	6,019 ± 0,487	3,001 ± 0,206	4,159 ± 0,198	4,470 ± 0,758	3,068 ± 0,246	4,716 ± 0,105
etil-acetat	n.d.	0,061 ± 0,009	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
butil-acetat	0,314 ± 0,024	0,168 ± 0,018	0,155 ± 0,006	0,122 ± 0,008	0,131 ± 0,006	0,095 ± 0,002
etil-butirat	0,033 ± 0,003	0,035 ± 0,004	0,037 ± 0,000	0,038 ± 0,003	0,051 ± 0,005	0,027 ± 0,001
heksil-acetat	0,279 ± 0,035	0,594 ± 0,030	1,792 ± 0,066	0,798 ± 0,032	3,938 ± 0,223	3,371 ± 0,182
ukupni esteri	0,626 ± 0,062	0,858 ± 0,061	1,983 ± 0,073	0,958 ± 0,043	4,119 ± 0,234	3,492 ± 0,185
etanska kiselina	0,160 ± 0,013	0,184 ± 0,008	0,246 ± 0,008	0,173 ± 0,015	0,159 ± 0,010	0,228 ± 0,016
butanska kiselina	0,113 ± 0,004	0,120 ± 0,004	0,101 ± 0,001	0,102 ± 0,006	0,103 ± 0,005	0,107 ± 0,002
heksanska kiselina	n.d	0,085 ± 0,005	0,089 ± 0,001	2,723 ± 0,248	7,078 ± 0,595	6,097 ± 0,182
ukupne organske kiseline	0,273 ± 0,016	0,389 ± 0,018	0,436 ± 0,011	2,998 ± 0,269	7,339 ± 0,610	6,432 ± 0,200
ukupne hlapljive tvari	34,585 ± 2,072	34,307 ± 2,524	41,880 ± 2,001	34,415 ± 2,506	41,125 ± 1,351	40,659 ± 0,711

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n.d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.

Tablica 21. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Lastovka** ovisno o roku berbe (1.–6.) u **2013.** godini.

	Rok berbe					
HLAPLJIVA TVAR	**1.** (mg kg^{-1})	**2.** (mg kg^{-1})	**3.** (mg kg^{-1})	**4.** (mg kg^{-1})	**5.** (mg kg^{-1})	**6.** (mg kg^{-1})
pentanal	0,254 ± 0,017	0,168 ± 0,012	0,134 ± 0,007	0,094 ± 0,006	3,158 ± 0,059	0,522 ± 0,010
heksanal	0,811 ± 0,056	1,067 ± 0,045	1,171 ± 0,047	1,585 ± 0,151	1,261 ± 0,063	0,662 ± 0,047
E-2-heksenal	5,811 ± 0,194	13,199 ± 0,286	16,212 ± 1,525	27,479 ± 2,124	13,181 ± 0,880	10,579 ± 0,496
oktanal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,066 ± 0,004	0,061 ± 0,006
ukupni aldehidi	6,876 ± 0,267	14,433 ± 0,343	17,517 ± 1,579	29,157 ± 2,281	17,665 ± 1,006	11,823 ± 0,559
etanol	0,266 ± 0,037	0,243 ± 0,049	0,155 ± 0,003	0,187 ± 0,020	0,273 ± 0,005	3,012 ± 0,210
smjesa butanola	0,031 ± 0,003	0,022 ± 0,001	0,042 ± 0,002	0,037 ± 0,002	0,015 ± 0,000	0,029 ± 0,001
1-penten-3-ol	0,862 ± 0,009	0,813 ± 0,070	0,745 ± 0,042	0,671 ± 0,023	0,345 ± 0,003	0,265 ± 0,002
4-metilpentan-2-ol	n.d.	0,057 ± 0,001	n.d.	0,014 ± 0,001	0,494 ± 0,019	0,032 ± 0,002
heksanol	0,024 ± 0,000	0,029 ± 0,001	0,044 ± 0,004	0,134 ± 0,035	5,937 ± 0,080	0,799 ± 0,007
E-2-heksen-1-ol	0,236 ± 0,004	0,359 ± 0,008	0,372 ± 0,006	0,569 ± 0,019	3,984 ± 0,108	4,024 ± 0,037
Z-3-heksen-1-ol	0,471 ± 0,007	0,327 ± 0,011	0,344 ± 0,013	0,395 ± 0,021	0,827 ± 0,095	0,613 ± 0,013
ukupni alkoholi	1,889 ± 0,112	1,848 ± 0,141	1,701 ± 0,070	2,004 ± 0,121	11,873 ± 0,310	8,772 ± 0,272
etil-acetat	0,020 ± 0,002	0,012 ± 0,000	0,012 ± 0,000	0,012 ± 0,000	0,019 ± 0,001	0,013 ± 0,000
butil-acetat	0,167 ± 0,030	0,109 ± 0,001	0,110 ± 0,004	0,091 ± 0,008	0,056 ± 0,002	0,052 ± 0,004
etil-butirat	0,013 ± 0,001	0,014 ± 0,000	0,017 ± 0,001	0,018 ± 0,003	n.d.	n.d.
heksil-acetat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,029 ± 0,001	0,031 ± 0,003
ukupni esteri	0,199 ± 0,033	0,135 ± 0,001	0,138 ± 0,004	0,121 ± 0,011	0,103 ± 0,004	0,096 ± 0,006
etanska kiselina	0,438 ± 0,024	0,341 ± 0,037	0,746 ± 0,037	0,559 ± 0,052	n.d.	0,334 ± 0,001
butanska kiselina	0,263 ± 0,004	0,217 ± 0,021	0,231 ± 0,004	0,202 ± 0,003	0,100 ± 0,007	0,122 ± 0,007
heksanska kiselina	0,184 ± 0,014	0,124 ± 0,021	0,107 ± 0,009	0,110 ± 0,009	0,122 ± 0,002	0,106 ± 0,005
ukupne organske kiseline	0,885 ± 0,013	0,682 ± 0,079	1,084 ± 0,050	0,870 ± 0,064	0,222 ± 0,009	0,562 ± 0,013
ukupne hlapljive tvari	9,848 ± 0,402	17,098 ± 0,565	20,439 ± 1,703	32,152 ± 0,478	29,862 ± 1,328	21,252 ± 0,851

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n.d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.

Tablica 22. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Lastovka** ovisno o reku berbe (1.-3.) u **2014.** godini.

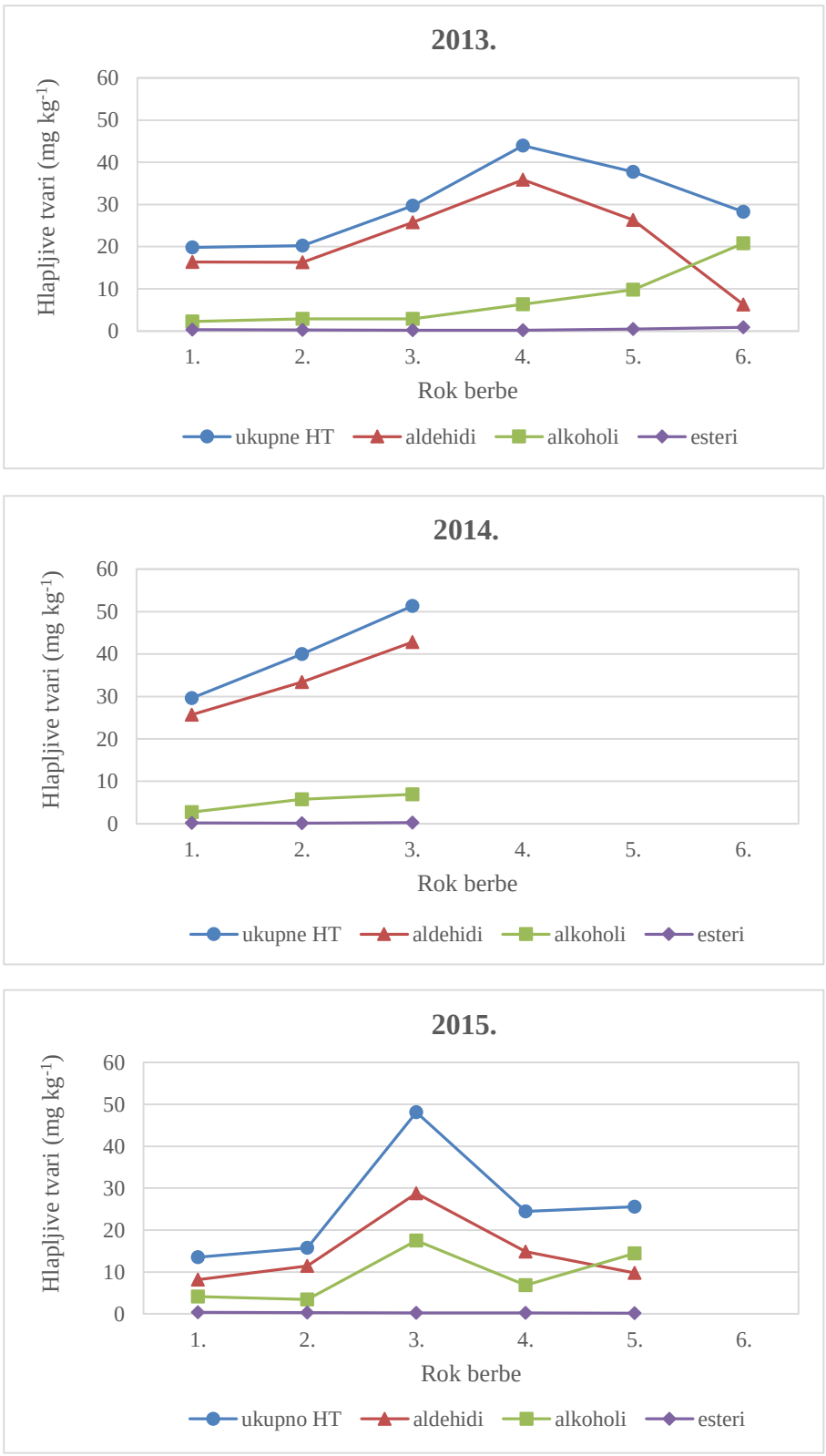
	Rok berbe		
	1.	**2.**	**3.**
HLAPLJIVA TVAR	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})
pentanal	0,475 ± 0,028	0,582 ± 0,012	0,648 ± 0,002
heksanal	1,214 ± 0,103	1,869 ± 0,100	2,023 ± 0,047
E-2-heksenal	14,948 ± 1,349	21,814 ± 0,901	21,118 ± 0,708
oktanal	n.d.	n.d.	n.d.
ukupni aldehidi	16,637 ± 1,480	24,265 ± 1,013	23,788 ± 0,757
etanol	0,476 ± 0,008	5,024 ± 0,832	3,428 ± 0,252
smjesa butanola	0,366 ± 0,416	0,084 ± 0,004	0,062 ± 0,003
1-penten-3-ol	1,140 ± 0,105	0,939 ± 0,028	0,941 ± 0,076
4-metilpentan-2-ol	0,035 ± 0,004	0,054 ± 0,001	0,027 ± 0,002
heksanol	0,017 ± 0,001	0,044 ± 0,008	0,114 ± 0,001
E-2-heksen-1-ol	0,090 ± 0,012	0,084 ± 0,001	0,949 ± 0,033
Z-3-heksen-1-ol	0,250 ± 0,003	0,172 ± 0,001	0,242 ± 0,016
ukupni alkoholi	2,373 ± 0,551	6,400 ± 0,875	5,762 ± 0,383
etil-acetat	0,025 ± 0,001	0,043 ± 0,002	0,050 ± 0,001
butil-acetat	0,115 ± 0,020	0,108 ± 0,006	0,128 ± 0,008
etil-butirat	0,014 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,036 ± 0,001
heksil-acetat	0,031 ± 0,005	0,032 ± 0,001	0,079 ± 0,002
ukupni esteri	0,184 ± 0,026	0,199 ± 0,009	0,292 ± 0,012
etanska kiselina	0,102 ± 0,005	0,111 ± 0,008	0,302 ± 0,012
butanska kiselina	0,038 ± 0,004	0,044 ± 0,003	0,058 ± 0,001
heksanska kiselina	0,475 ± 0,010	0,571 ± 0,001	0,497 ± 0,016
ukupne organske kiseline	0,615 ± 0,019	0,726 ± 0,012	0,856 ± 0,028
ukupne hlapljive tvari	19,807 ± 2,076	31,588 ± 1,909	30,697 ± 1,181

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n.d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.

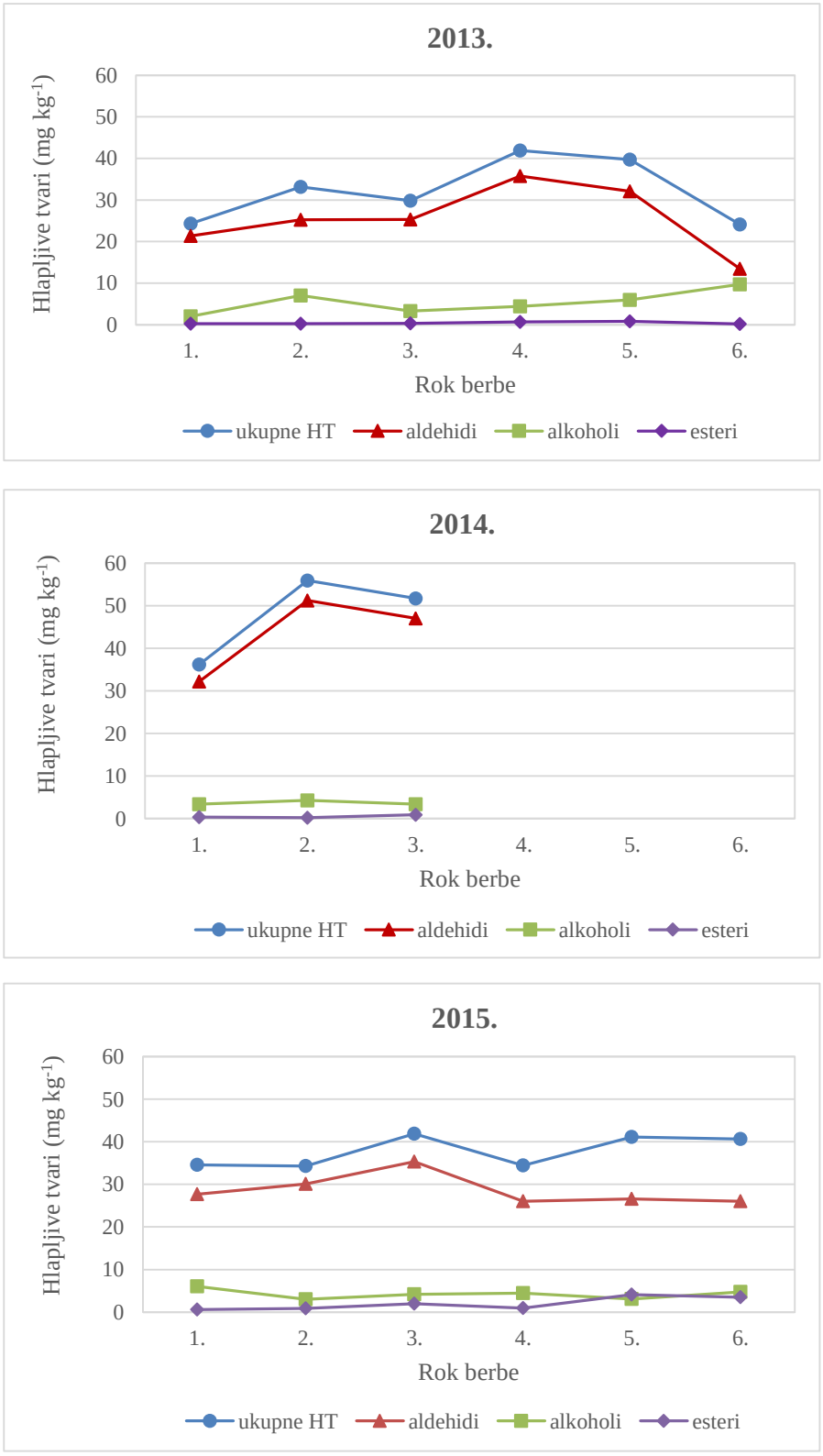
Tablica 23. Maseni udjeli hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima sorte **Lastovka** ovisno o roku berbe (1.-6.) u **2015.** godini.

	Rok berbe					
HLAPLJIVA TVAR	**1.** (mg kg^{-1})	**2.** (mg kg^{-1})	**3.** (mg kg^{-1})	**4.** (mg kg^{-1})	**5.** (mg kg^{-1})	**6.** (mg kg^{-1})
pentanal	0,629 ± 0,027	0,488 ± 0,020	0,206 ± 0,018	0,186 ± 0,020	0,120 ± 0,010	0,101 ± 0,008
heksanal	0,387 ± 0,035	0,461 ± 0,013	0,475 ± 0,037	0,567 ± 0,054	0,740 ± 0,054	0,444 ± 0,052
E-2-heksenal	6,307 ± 0,073	12,187 ± 0,971	13,833 ± 0,629	13,652 ± 0,921	21,371 ± 0,902	31,934 ± 1,540
oktanal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ukupni aldehidi	7,323 ± 0,135	13,135 ± 1,004	14,513 ± 0,684	14,405 ± 0,995	22,231 ± 0,966	32,478 ± 1,600
etanol	0,182 ± 0,006	0,161 ± 0,011	0,267 ± 0,013	1,131 ± 0,057	0,156 ± 0,004	0,246 ± 0,005
smjesa butanola	0,046 ± 0,001	0,049 ± 0,001	0,046 ± 0,006	0,081 ± 0,011	0,073 ± 0,004	0,041 ± 0,004
1-penten-3-ol	1,032 ± 0,011	0,983 ± 0,047	0,959 ± 0,066	0,992 ± 0,035	0,929 ± 0,018	0,564 ± 0,054
4-metilpentan-2-ol	n.d.	n.d.	0,015 ± 0,000	0,015 ± 0,001	0,018 ± 0,002	0,016 ± 0,001
heksanol	0,074 ± 0,006	0,061 ± 0,007	0,072 ± 0,000	0,095 ± 0,005	0,069 ± 0,004	0,074 ± 0,002
E-2-heksen-1-ol	0,321 ± 0,004	0,430 ± 0,017	0,502 ± 0,028	0,598 ± 0,018	0,537 ± 0,031	0,461 ± 0,033
Z-3-heksen-1-ol	0,974 ± 0,007	0,780 ± 0,058	0,869 ± 0,018	0,858 ± 0,066	0,631 ± 0,037	0,343 ± 0,026
ukupni alkoholi	2,628 ± 0,044	2,464 ± 0,143	2,728 ± 0,131	3,768 ± 0,193	2,410 ± 0,099	1,743 ± 0,125
etil-acetat	0,016 ± 0,001	0,016 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,019 ± 0,002
butil-acetat	0,143 ± 0,006	0,154 ± 0,009	0,159 ± 0,017	0,164 ± 0,014	0,190 ± 0,014	0,135 ± 0,018
etil-butirat	0,015 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,037 ± 0,005	0,019 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,013 ± 0,000
heksil-acetat	0,194 ± 0,002	0,167 ± 0,010	0,161 ± 0,001	0,136 ± 0,012	0,261 ± 0,011	0,140 ± 0,013
ukupni esteri	0,367 ± 0,010	0,350 ± 0,022	0,372 ± 0,025	0,330 ± 0,028	0,478 ± 0,027	0,306 ± 0,033
etanska kiselina	0,160 ± 0,006	0,170 ± 0,011	0,48 ± 0,040	0,275 ± 0,013	0,230 ± 0,003	0,226 ± 0,022
butanska kiselina	0,091 ± 0,005	0,091 ± 0,002	0,151 ± 0,008	0,170 ± 0,011	0,090 ± 0,003	0,090 ± 0,006
heksanska kiselina	0,124 ± 0,006	0,135 ± 0,006	0,188 ± 0,022	0,142 ± 0,010	0,196 ± 0,018	0,190 ± 0,012
ukupne organske kiseline	0,374 ± 0,017	0,395 ± 0,020	0,818 ± 0,071	0,587 ± 0,034	0,516 ± 0,024	0,505 ± 0,040
ukupne hlapljive tvari	10,691 ± 0,206	16,344 ± 1,139	18,430 ± 0,911	19,089 ± 1,249	25,635 ± 1,116	35,032 ± 1,798

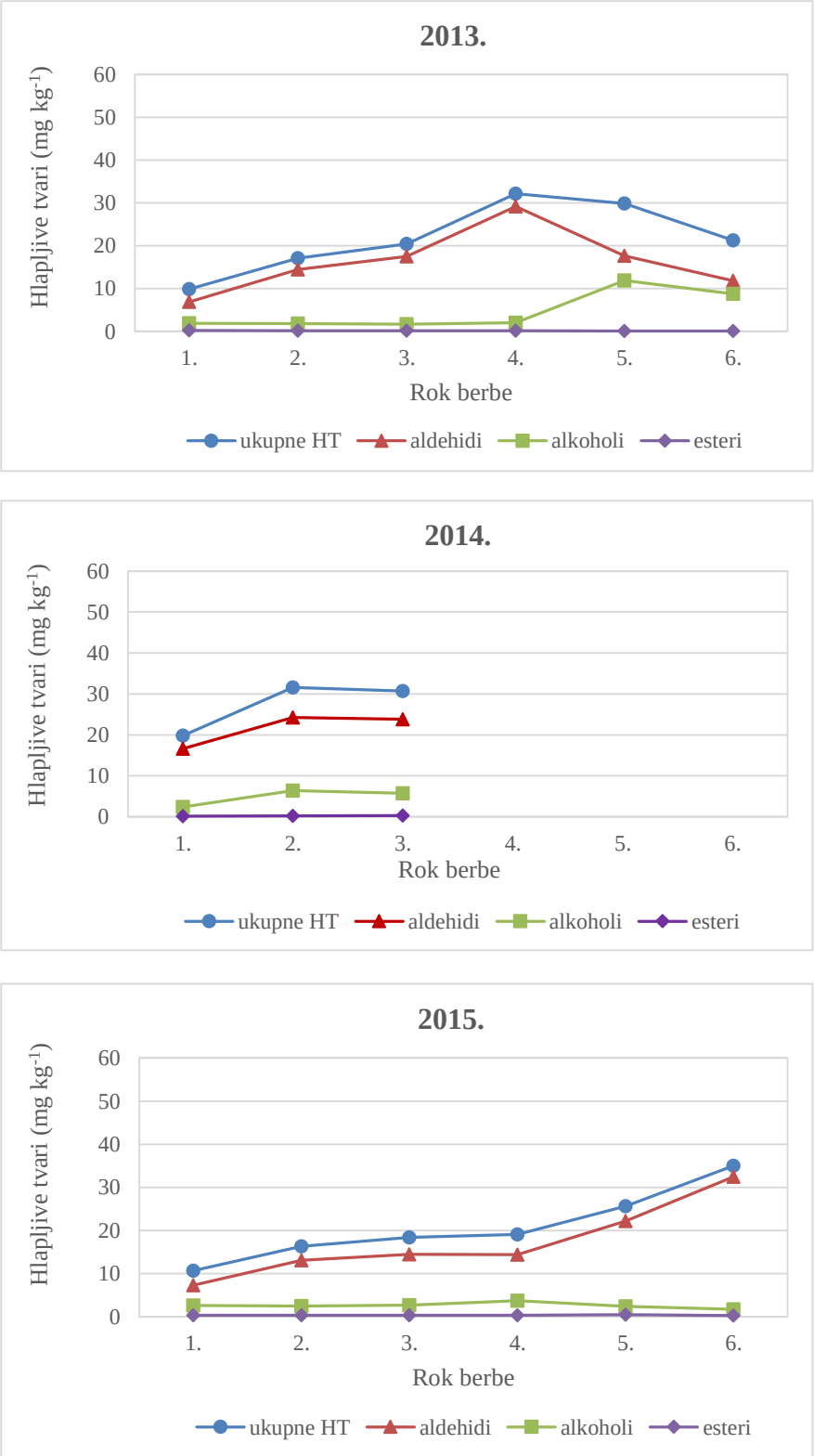
Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri paralelna određivanja ± SD. Kraticom n. d. je označena nedetektirana hlapljiva tvar.



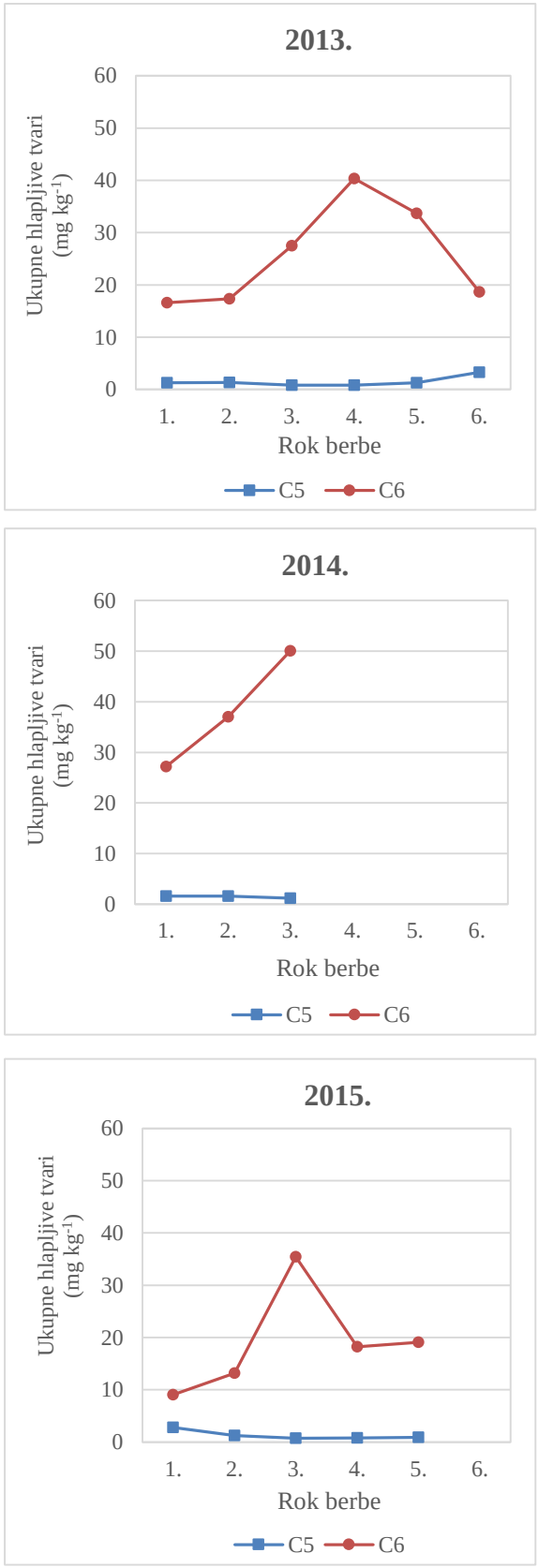
Slika 33. Maseni udjeli ukupnih hlapljivih tvari (HT), ukupnih aldehida, ukupnih alkohola i ukupnih estera kod uzoraka djevičanskih maslinovih ulja sorte **Oblica** ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine prerade plodova.



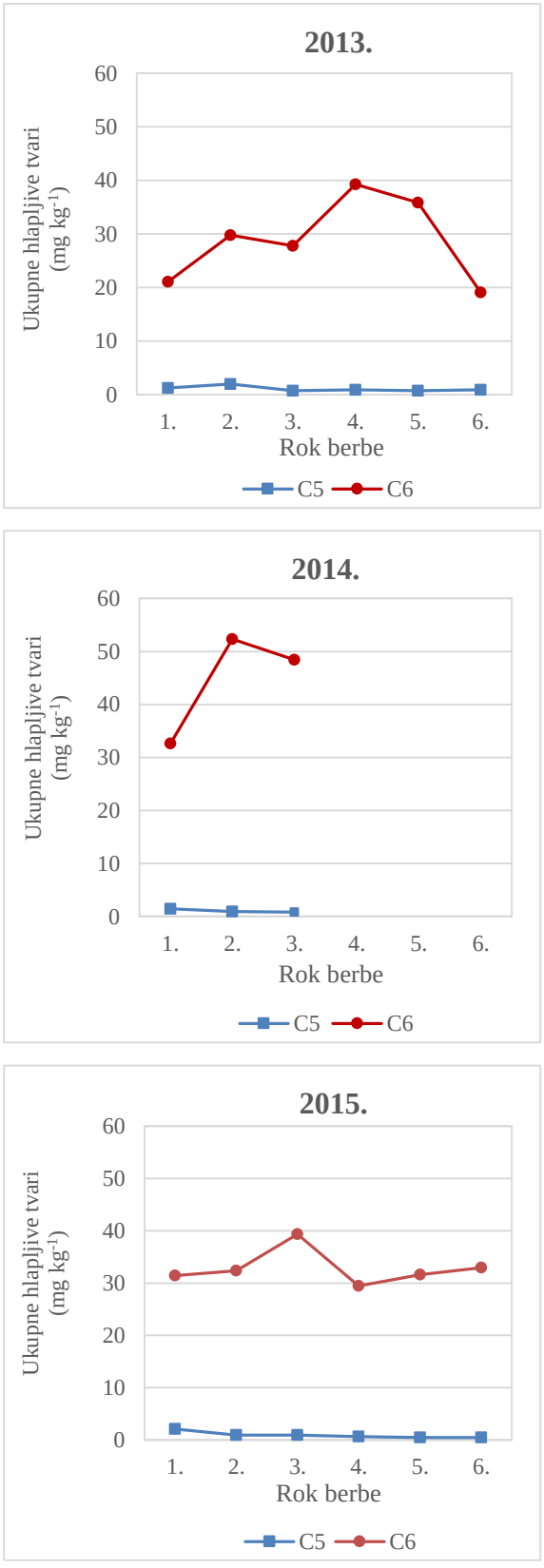
Slika 34. Maseni udjeli ukupnih hlapljivih tvari (HT), ukupnih aldehida, ukupni alkohola i ukupnih estera kod uzoraka djevičanskih maslinovih ulja sorte **Levantinka** ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine prerade plodova.



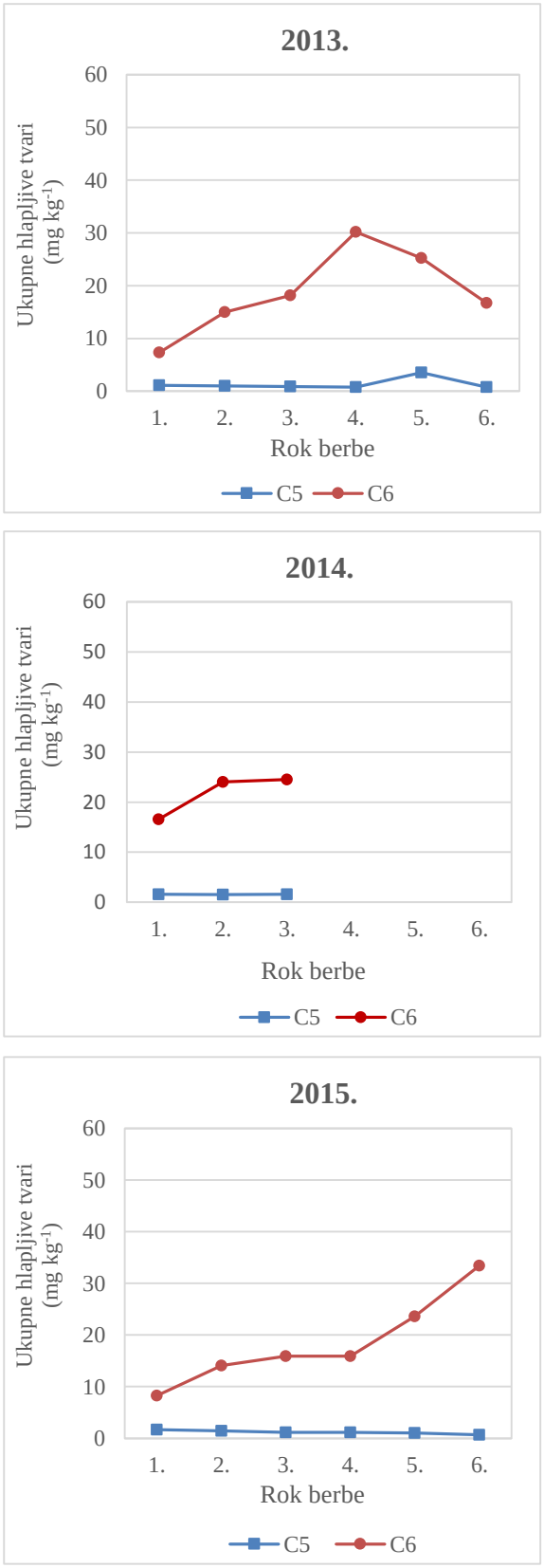
Slika 35. Maseni udjeli ukupnih hlapljivih tvari (HT), ukupnih aldehida, ukupnih alkohola i ukupnih estera kod uzoraka djevičanskih maslinovih ulja sorte **Lastovka** ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine prerade plodova.



Slika 36. Maseni udjeli ukupnih C_6 i C_5 hlapljivih tvari u uzorcima djevičanskih maslinovih ulja sorte **Oblica**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine prerade plodova.



Slika 37. Maseni udjeli ukupnih C_6 i C_5 hlapljivih tvari u uzorcima djevičanskih maslinovih ulja sorte **Levantinka**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine prerade plodova.

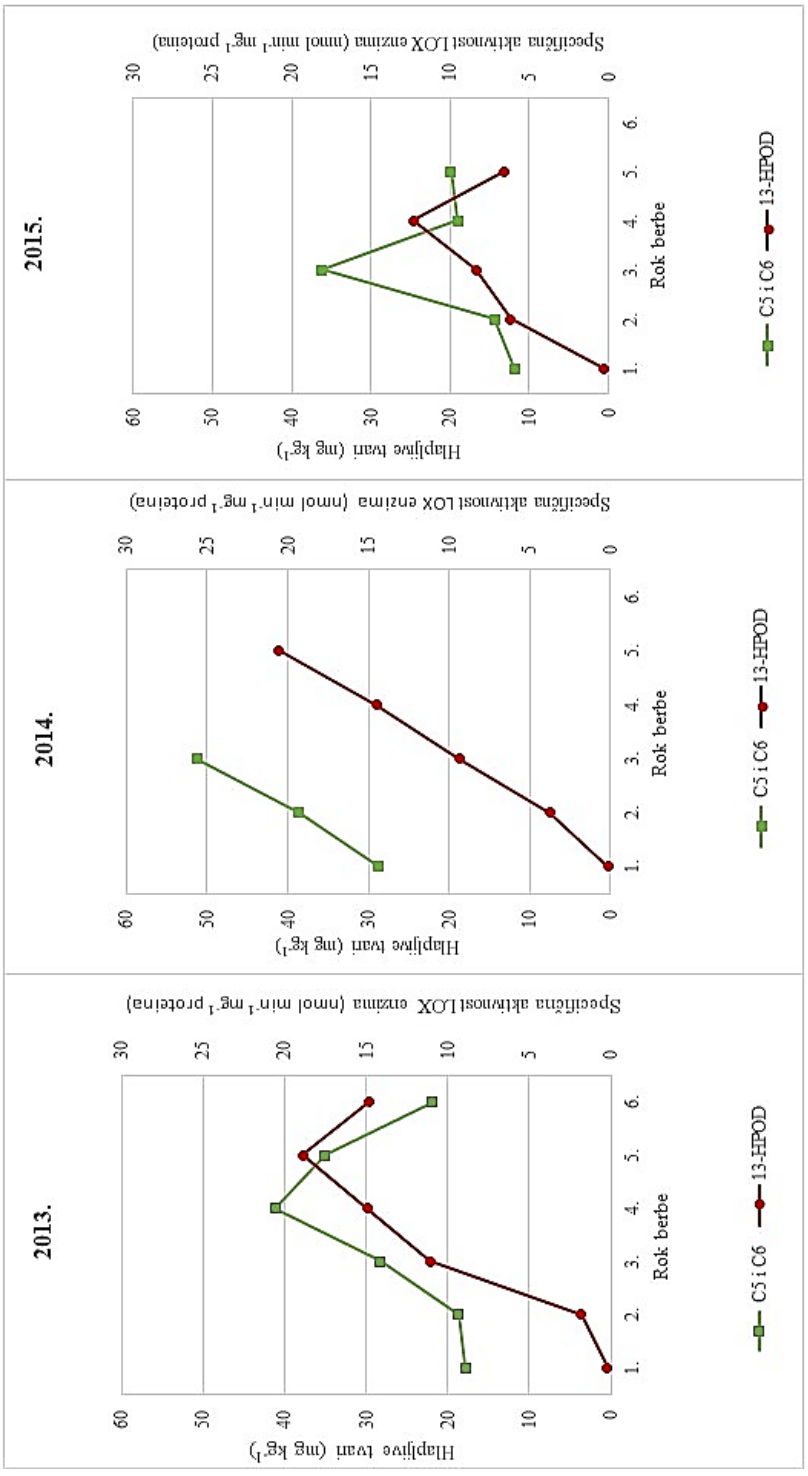


Slika 38. Maseni udjeli ukupnih C_6 i C_5 hlapljivih tvari u uzorcima djevičanskih maslinovih ulja sorte **Lastovka**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine prerade plodova.

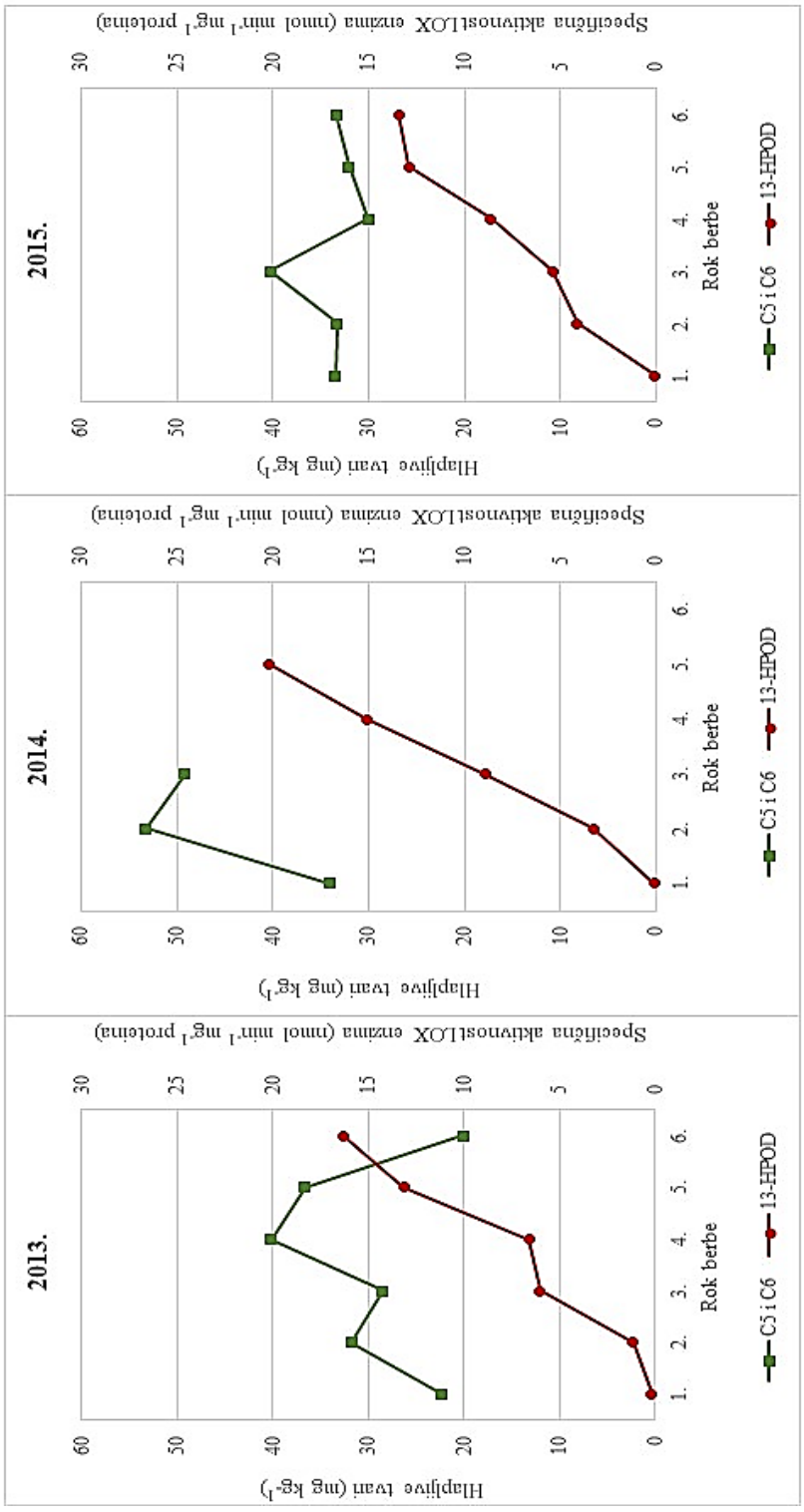
4.1.5.Usporedba specifične aktivnosti LOX enzima i sadržaja C_6 i C_5 hlapljivih tvari

U ovom dijelu rada uspoređuje se specifične aktivnosti LOX enzima u plodu i sadržaj poželjnih hlapljivih tvari u pripadajućim djevičanskim maslinovim uljima, ovisno o roku berbe u tri godine istraživanja. Rezultati usporedbe prikazani su na Slici 39. za Oblicu, te Slikama 40. i 41. za Levantinku odnosno Lastovku.

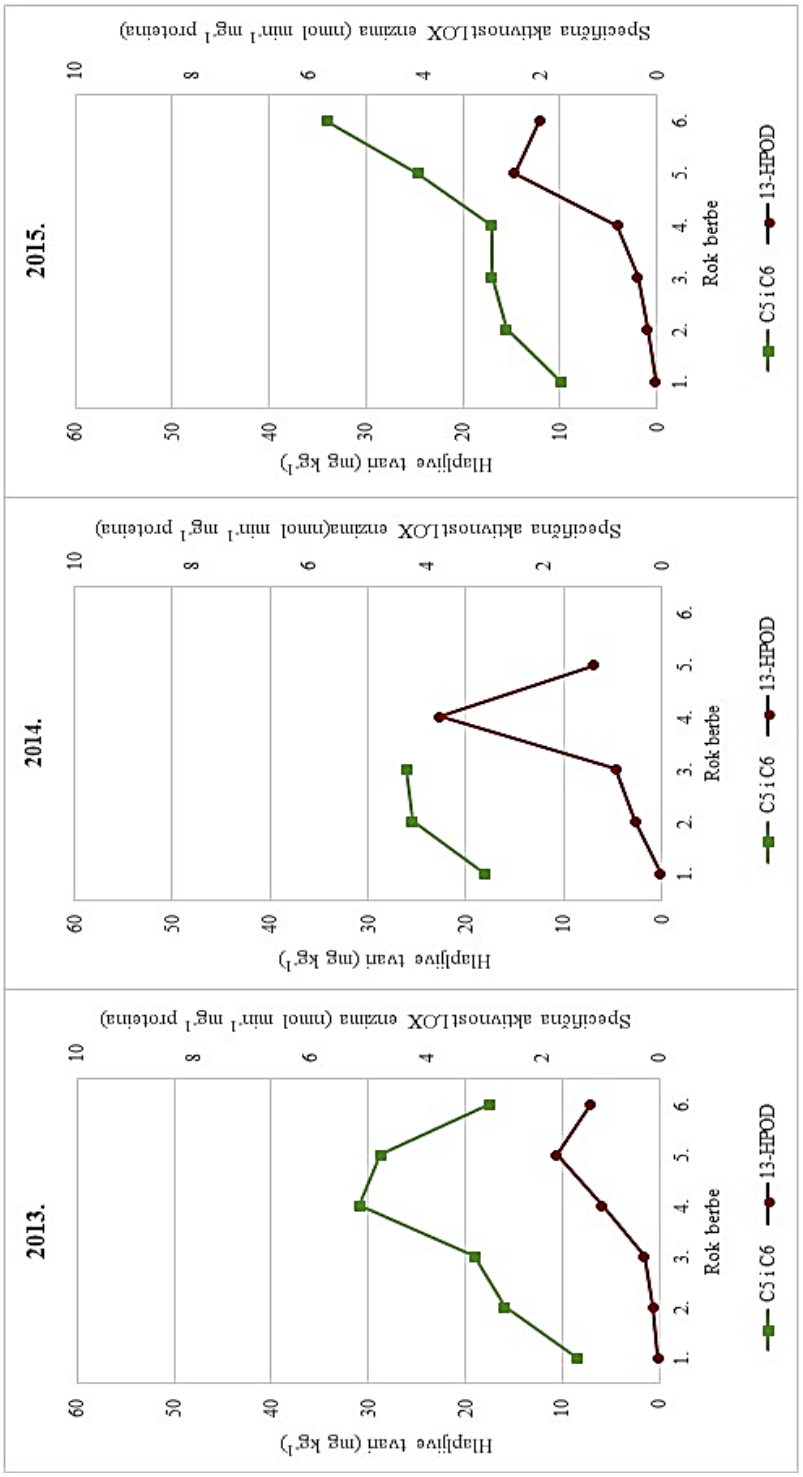
Budući je 13-*Z,E*-HPOD preteča poželjnih C_6 i C_5 hlapljivih tvari, specifična aktivnosti LOX enzima u ovom dijelu rada, izražena je preko količine nastalog 13-*Z,E*-HPOD u u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina.



Slika 39. Usporedba specifične aktivnosti LOX enzima u plodu masline i sadržaja C_6 i C_5 hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju sorte **Oblica**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja. Specifična aktivnost enzima izražena je preko količine nastalog produkta 13-*Z*,*E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina.



Slika 40. Usporedba specifične aktivnosti LOX enzima u plodu masline i sadržaja C_6 i C_5 hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju sorte **Levantinka**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja. Specifična aktivnost enzima izražena je preko količine nastalog produkta 13-*Z*,*E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina.



Slika 41. Usporedba specifične aktivnosti LOX enzima u plodu masline i sadržaja C_6 i C_5 hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju sorte **Lastovka**, ovisno o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja. Specifična aktivnost enzima izražena je preko količine nastalog produkta 13-*Z*,*E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina.

4.2. Rasprava

4.2.1. Specifična aktivnost LOX enzima u plodu maslina sorte Oblica, Levantinka i Lastovka

Uloga LOX puta u sintezi hlapljivih tvari, poznata je gotovo pola stoljeća. Sadržaj hlapljivih tvari u plodovima i proizvodima dobivenim njihovom preradom, populariziran je krajem prošlog stoljeća, razvojem HS-SPME i GC/GC-MS tehnika.[106] Djevičansko maslinovo ulje, namirnica je podvrgnuta višegodišnjem izučavanju sastava hlapljivih spojeva. Međutim, do danas su oskudne studije u kojima se dovodilo u vezu pojedine enzime složenog biokemijskog puta u plodu masline i sadržaja hlapljivih tvari u ulju. U prvom dijelu rada prikazani su rezultati specifične aktivnosti lipoksigenaze izmjerene u plodovima maslina različitog stupnja zrelosti (u periodu od početka listopada do sredine prosinca, kada se plodovi koriste za proizvodnju ulja), u trima dalmatinskim sortama maslina Oblici, Levantinki i Lastovki.

4.2.1.1. Rokovi berbe i stupanj zrelosti ploda maslina

Nakupljanje hlapljivih tvari u ulju, sortno je specifična karakteristika.[91] Međutim, utjecaj sorte ne može se promatrati odvojeno od stupnja zrelosti plodova masline, na koji indirektano utječu klimatski i okolišni uvjeti kojima su plodovi izloženi tijekom rasta i sazrijevanja. Pored sorte i stupnja zrelosti plodova, na kemijski sastav i kvalitetu ulja, utječe i način prerade plodova.[48] Kako bi se ispitao utjecaj stupnja zrelosti plodava na specifičnu aktivnost LOX enzima, te sadržaj ukupnih fenola i hlapljivih tvari u ulju, plodovi Oblice, Levantinke i Lastovke brani su od početka listopada do sredine prosinca, u pet do šest rokova berbe. Plodovima je određen stupanj zrelosti uzimajući u obzir boju podkožice i pulpe, metodom koju su opisali Uceda i Frias,[35] te su prerađeni u ulje na jednak način. Ispitivanje je provedeno kroz tri uzastopne godine, kako bi se uzeli u obzir klimatski i okolišni faktori. Stupanj zrelosti plodova masline s pripadajućim rokovima berbe u 2013., 2014. i 2015. godini za sortu Oblica, Levantinka i Lastovka prikazani su u Tablici 10. Škarica[58] navodi da Oblica i Levantinka pripadaju ranim sortama masline, dobiveni rezultati u ovom istraživanju potvrđuju navedenu tvrdnju. Vrijednosti stupnja zrelosti (SZ) plodova Oblice kreću se od 0,23 do 4,98 dok se Levantinka bolje uklapa u navod jer je u sve tri godine istraživanja početni SZ ploda približno jednak, a vrijednosti mu se kreću od 0,43 do visokih 5,88. Lastovka u svim godinama istraživanja počinje

s najvišim SZ od 0,70, dok se tijekom zriobe u drugih istraživanih sorti SZ značajno mijenja, kod Lastovke ta se promjena najmanje uočava i zrenje završava najnižim SZ plodova od 3,64 (Tablica 10.) Sporiji rast SZ jedan je od razlog zbog kojega je Škarica svrstava u srednje rane sorte.[58]

Iako su plodovi brani u isto vrijeme, sorte su se međusobno razlikovale po vrijednostima SZ, što je očekivano za sortno specifično svojstvo. Stupanj zrelosti ploda ima presudnu ulogu u određivanju optimalnog vremena berbe plodova masline, kako bi dobiveno ulje imalo zadovoljavajuću kvalitetu i prinos, te aromu i oksidacijsku stabilnost.[41,107]

4.2.1.2. Validacija protokola za izolaciju LOX enzima iz ploda maslina

Više je autora prijavilo poteškoće u pročišćavanju LOX enzima iz ploda masline.[27] Kako bi se izabrao najpogodniji protokol za izolaciju lipoksigenaze, korišteno je šest protokola, čiji su autori prijavili uspješnu izolaciju enzima. Da bi se isključio utjecaj različitog stupnja zrelosti ploda na specifičnu aktivnost enzima, ispitivanje je provedeno na plodovima Oblice, 4. roka berbe (SZ = 2,07) u 2013. godini. Reakcijske smjese pripremljene su na jednak način i osigurani su jednaki reakcijski uvjeti. Kvantifikacija primarnih produkata oksidacije je provedena RP-HPLC tehnikom.[108] Slika 20. prikazuje specifičnu aktivnost LOX enzima u korištenim protokolima, izraženu preko količine nastalog produkta 9-*Z,E*-HPOD i 13-*Z,E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina. Najveća specifična aktivnost iznosila je 20,89 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina, odnosno 10,05 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina, a izmjerena je u proteinskom ekstraktu dobivenom prema protokolu po Luaces i sur.[11] (protokol 5), po izmjerenim vrijednostima specifične aktivnosti LOX enzima slijede protokoli po Patui i sur.[77] (protokoli 4A, 4C), te Ridolfi i sur.[17] (protokol 6). Nešto niža aktivnost LOX enzima, izmjerena je u proteinskom ekstraktu koji je dobiven prema protokolu kojega su prijavili Salas i sur.[18] (protokol 2).

U navedenim protokolima LOX enzim pokazuje gotovo jednaku produktnu specifičnost, u omjeru približno 2:1 u korist 9-*Z,E*-HPOD (Tablica 11.).

Dva protokola, autora Gallardo-Guerrero i sur.[98] i Kotti i sur.[10], nisu dala zadovoljavajuće rezultate. Najniža specifična aktivnost LOX enzima izmjerena je u proteinskom ekstraktu pripravljenom po protokolu Kotti i sur. (1,29 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina, odnosno 0,03 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina).

U ovim protokolima primijećeno je veće odstupanje od navedene produktne specifičnosti ostvarene u ostalim protokola, koja primjenom protokola Kotti i sur. iznosi visokih 50:1 u korist 9-*Z,E*-HPOD (Tablica 10.). Moguće objašnjenje za nižu aktivnosti LOX enzima u navedenim protokolima može se tražiti u manjoj količini polivinilpolipropiledona (PVPP), od samo 2 %, koja je korištena prilikom izolacije. Uloga PVPP-a je da smanji inhibicijski učinak fenolnih spojeva na enzim. Poznato je da fenolni spojevi inhibiraju LOX enzim.[109,110] Kromatogrami primarnih produkata oksidacije kod proteina izoliranih po protokolu s najvišom (Luaces i sur. (protokol 5)), i najnižom efikasnošću (Gallardo-Guerrero i sur. (protokol 1) i Kotti i sur. (protokol 3)) prikazani su u Dodatku 1.

Jednak omjer produkata LOX enzima, približno 2:1 u korist 9-*Z,E*-HPOD objavili su Palmieri-Thiers i sur. u radu s rekombinantnim proteinom LOX-1 (Ole1LOX1) iz masline.[27] Također su Padilla i sur., prijavili produktnu specifičnost od 4:1 u korist istog produkta. Oni su ispitivanje proveli na drugom izoenzimu masline LOX-1 (Ole2LOX1)[28]. Dvostruka pozicijska specifičnost nije karakteristika samo lipoksigenaza iz maslina, primijećena je u plodovima jabuke[111] i cvijetu čaja.[112]

4.2.1.3. LOX enzim u plodovima maslina

Slike 21-23. prikazuju trogodišnje vrijednosti specifične aktivnosti lipoksigenaze u plodovima masline sorte Oblica, Levantinka i Lastovka, različitog stupnja zrelosti ploda (rok berbe). Specifična aktivnost enzima izražena je preko količine 9- i 13-*Z,E*-HPOD nastalih u jednoj minuti, po miligramu ukupnih proteina. Jednako područje uzgoja, rok berbe i način izolacije LOX enzima iz plodova (po protokolu Luaces i sur.) osiguravaju da promjene u specifičnoj aktivnosti LOX enzima promatramo kao svojstvo sorte izraženo kroz SZ plodova u klimatskim i okolišnim uvjetima pojedine godine istraživanja.

Na Slici 21. su predstavljeni rezultati specifične aktivnosti LOX enzima u plodovima sorte Oblica. U sve tri godine uočava se trend rasta specifične enzimske aktivnosti napredovanjem zriobe. Kroz dvije godine, 2013. i 2014., vrijednosti specifične aktivnosti bile su približno jednake, a enzim je maksimalnu aktivnost postigao u 5. roku berbe i to 2013. (40,44 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 18,90 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina), te 2014. (45,23 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 20,58 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1}

proteina). U zadnjoj godini istraživanja zabilježena je nešto niža maksimalna vrijednost specifične aktivnosti postignute u 4. roku berbe (32,08 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 12,30 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina). Sličan trend rasta specifične aktivnosti LOX enzima, napredovanjem zriobe zadržao se kod sorte Levantinka (Slika 22.). Međutim, kod ove sorte, u svim godinama istraživanja najviša enzimska aktivnost zabilježena je u zadnjem roku berbe, s vrijednostima u 2013. (34,50 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 16,31 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina), 2014. (42,21 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 20,24 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina) i 2015. godini (20,43 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 13,42 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina). Budući da ovakav linearan rast enzimske aktivnosti tijekom perioda zrenja nije uočen kod sorti Oblica i Lastovka, mogao bi se pripisati sortnoj karakteristici Levantinke. Općenito, kod istraživanih sorti vrijednosti specifične aktivnosti LOX enzima u 2013. i 2014. godini su slične, nešto niže vrijednosti zabilježene su u 2015. godini.

Neočekivano, sorta Lastovka imala je znatno niže vrijednosti specifične aktivnosti LOX enzima u sve tri godine istraživanja, što se može tumačiti kao karakteristika sorte (Slika 23.) Trend rasta specifične aktivnosti enzima i ovdje se lijepo uočava, s maksimumom koji je postignut u predzadnjim rokovima berbe. Najviše vrijednosti specifične aktivnosti LOX enzima u plodovima Lastovke su zabilježene u 2013. (3,81 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 1,77 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina), 2014. (5,52 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 3,79 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina) i 2015. godini (5,15 nmol 9-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina i 2,45 nmol 13-*Z,E*-HPOD min^{-1} mg^{-1} proteina). Objašnjenje za niže vrijednosti specifične aktivnosti LOX enzima, primijećene kod svih istraživanih sorti u 2015. godini, može se tražiti u klimatološkim parametrima (Prilog 3 i 4).

Ovakav trend rasta specifične aktivnosti LOX enzima tijekom procesa zriobe plodova su prijavili Palmieris-Teris i suradnici.[13] U njihovim rezultatima također se uočava porast enzimske aktivnosti u razdoblju kada se mijenja boja potkožice ploda iz zelene u ljubičastu. Vrijednosti specifične aktivnosti LOX enzima razlikovale su se među ispitivanim sortama, kao i rok berbe u kojemu je LOX postigla najvišu aktivnost u pojedinoj sorti. De Gregorio i sur. bilježe povećanje enzimske aktivnosti LOX enzima u razdoblju zriobe, iako najviši skok u aktivnosti primjećuju u zelenim maslinama, 3 mjeseca nakon oprašivanja.[66] Još ranije, u 13. tjednu od oprašivanja Salas i sur. zabilježili su najvišu aktivnost ovog enzima, daljnjim rastom ploda aktivnost se smanjivala da bi se u periodu zriobe od 30. do 35. tjedna ponovno zabilježio

blagi porast.[18] Rezultati molekularnih istraživanja idu u prilog dobivenim rezultatima u ovom radu. Iz ploda maslina su izolirana četiri izoenzima lipoksigenaze. Dva (po jedan iz superobitelji LOX-1 i LOX-2) pokazuju intenzivnu ekspresiju u razdoblju zriobe ploda masline.[27,29]

Usporedbom dobivenih rezultata specifične aktivnosti lipoksigenaze, sorta Oblica i Levantinka pokazuju slične vrijednosti dok se sorta Lastovka izdvaja značajno nižom aktivnošću LOX enzima. Patui i sur. koristili su se jednakim postupkom kvantifikacije 9- i 13-*Z,E*-HPOD, te su prijavili razliku u specifičnoj aktivnosti LOX enzima među sortama Ghiacciolo i Nostrana.[77] Velike razlike u specifičnoj aktivnosti LOX enzima u ispitivanim sortama prijavili su Ridolfi i sur.[17] te Palmieris-Teris i suradnici.[13] Izneseni podaci u ovom istraživanju daju nam za pravo da specifičnu aktivnost LOX enzima u plodovima masline promatramo kao karakterističnо svojstvo sorte.

U svrhu bolje karakterizacije LOX enzima izoliranog iz plodova maslina autohtonih Dalmatinskih sorti, provedenen je niz eksperimenata u kojima je praćene promjene specifične enzimske aktivnosti ovisno o vremenu inkubacije i različitim pH vrijednostima reakcijske otopine, te utjecaj nekompetitivnog inhibitora (NGDA) na specifičnu aktivnost istraživanog enzima. Na Slici 24. prikazane su masene koncentracije nastalog produkta 9- i 13-*Z,E*-HPOD ovisno o vremenu trajanja reakcije za sorte Oblica, Levantinka i Lastovka. Za svaku sortu, istraživanje je provedeno na dva uzorka proteinskog ekstrakta (4. rok berbe) iz 2013. i 2014. godine. Uzevši u obzir ove rezultate, ali i preliminarna ispitivanja specifične aktivnosti LOX enzima kroz period zriobe (čije su vrijednosti značajno niže u ranim rokovima berbe kod sorte Lastovka) odlučeno je da se reakcija sinteze produkta 9- i 13-*Z,E*-HPOD provodi u trajanju od 30 min, kako bi se osiguralo pouzdano kvantificiranje nastalih produkata. Ujedno vremenski period od 30 min, predstavlja vrijeme malaksacije (miješanja) maslinovog tijesta u procesu proizvodnje ekstra djevičanskih maslinovih ulja.

Na Slikama 25-27. prikazani su pH profili LOX enzima iz ranog (2.) i srednjeg (4.) roka berbe plodova maslina sorta Oblica, Levantinka i Lastovka u 2014. godini. Najviša specifična aktivnost enzima u plodovima Oblice srednjeg roka berbe postignuta je kod pH = 7, dok se za raniji rok berbe vrijednost kreće u području pH od 6 do 7 (Slika 25.). Enzim, izoliran iz plodova Levantinke (Slika 26.) i Lastovke (Slika 27.), neovisno o roku berbe, najvišu specifičnu aktivnost postiže kod pH 6,5. Više autora navodi visoku enzimsku aktivnost u području pH vrijednosti od 5,5 do 6,5, dok su najvišu aktivnost zabilježili kod pH 6.[16,17,63,76] Blagi pomak maksimalne specifične aktivnosti LOX enzima prema neutralnijem području mogao bi se

objasniti prisutnošću različitih izoenzima. De Gregorio i sur. u radu s plodovima starim 120 dana dobili su maksimalnu aktivnost LOX enzima kod dvije pH vrijednosti, 6,4 i 8,6, što ih je navelo na zaključak da su u plodu prisutna dva izoenzima.[66] Na prisutnost izoenzima skrenuta je pažnja istraživanjem kojega su proveli Williams i suradnici.[69] Oni su u radu koristili LOX enzim izoliran iz kalusne kulture masline, te su zabilježili da enzim maksimalnu aktivnost postiže kod pH vrijednosti od 8,8. Prisutnost izoenzima može se objasniti i produktnom specifičnošću (Poglavlje 4.2.1.3.). Izoenzimi iz superobitelji LOX-1 sintetiziraju 9- i 13-*Z,E*-HPOD u omjeru 2:1 ili 4:1, dok predstavnici superobitelji LOX-2 uglavnom sintetiziraju 13-*Z,E*-HPOD. Obzirom na dobivene rezultate u ovom radu, koji se odnose na produkciju 9- i 13-*Z,E*-HPOD, može se pretpostaviti da je u autohtonim sortama srednje Dalmacije zastupljeniji izoenzim iz superobitelji LOX-1.

Na Slici 28. prikazani su rezultati ispitivanja inhibicijskog učinka nordihidroguaretične kiseline (NGDA) na LOX enzim. Ispitivanje je provedeno na plodovima maslina sorte Oblica, Levantinka i Lastovka (4. rok berbe) u 2013. i 2014. godini. Kod ispitivanih sorta uočava se značajan pad specifične aktivnosti LOX enzima, kad se u reakcijsku smjesu doda NGDA (100 μM). Te su se vrijednosti kod sorti Oblica i Lastovka kretale oko 50 %. Najosjetljiviji na izloženost inhibitoru bio je enzim izoliran iz plodova masline Levantinka. Izazvani inhibicijski efekt na LOX enzim imao je za posljedicu nižu brzinu nastajanja reakcijskog produkta 9-*Z,E*-HPOD i to za 68,4 % u 2013. i 65,8 % u 2014., te 13-*Z,E*-HPOD za 62,5 % u 2013. i 52,5 % u 2014. godini. Dobiveni rezultati u skladu su sa prijavljenim opažanjima Patui i suradnika.[77] Oni su uočili da se brzina sinteze hidroperoksidnih produkata, u prisutnosti jednake količine NGDA smanjuje za dva puta, također su zamijetili postojanje male razlike u djelovanju inhibitora na LOX enzim u sortama Ghiacciolo i Nostrana. Dobiveni rezultati upućuju nas na pretpostavku da je u plodovima Levantinke nešto zastupljenija ona izoforma koja je osjetljivija na vezanje nekompetitivnog inhibitora, što se očituje smanjenom brzinom sinteze 9- i 13-*Z,E*-HPOD u njegovoj prisutnosti.

4.2.2. Fizikalno-kemijska svojstva djevičanskih maslinovih ulja Oblice, Levantinke i Lastovke

4.2.2.1. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti plodova na fizikalno-kemijska svojstva djevičanskih maslinovih ulja

Osnovni parametri kvalitete koji svrstavaju maslinovo ulje u odgovarajuću kategoriju temelje se na fizikalno-kemijskoj i senzorskoj analizi.[2] Rezultati fizikalno-kemijske analize provedene na sortnim uljima Oblice, Levantinke i Lastovke, prikazani su u Tablicama 12-14. Tijekom trogodišnjeg istraživanja, u dobivenim uljima je analiziran udio SMK i PB te, K_{232}, K_{270} i ΔK, u pet odnosno šest rokova berbe 2013. i 2015., te tri roka berbe 2014. godini. Pregledom rezultata može se zaključiti da su gotova sva ulja proizvedena od plodova masline dobre kvalitete.

Udio slobodnih masnih kiselina (SMK) se u svim godinama istraživanja za ulja Oblice kretao u rasponu vrijednosti od 0,19 do 0,65, za ulja Levantinke od 0,15 do 0,40 a za ulja Lastovke od 0,18 do 0,79 % oleinske kiseline, što ova ulja svrstava u kategoriju ekstra djevičanskih maslinovih ulja. Iznimku čini ulje Oblice, zadnjeg roka berbe u 2013. godini. Zbog udjela SMK od 1,51 % oleinske kiseline, ovo ulje svrstano je u nižu kategoriju, u djevičansko maslinovo ulje.

Stupanj oksidacije ulja praćen je analizom peroksidnog broja (PB). Trogodišnje vrijednosti PB niže su od propisanih Pravilnikom,[2] i u uljima Oblice kretale su se od 1,97 do 8,01, u uljima Levantinke od 2,11 do 7,36 te u uljima Lastovke od 1,92 do 4,59 mmol O_2 kg^{-1}.

Rezultati mjerenja specifičnih apsorbancija u UV području (K_{232} i K_{270}) su ispitivana ulja svrstali u ekstra djevičanska maslinova ulja. Očekivano, niske vrijednosti ΔK ukazuju da u uljima nisu prisutni konjugirani trieni, koji uglavnom nastaju pri rafinaciji ulja. Dosadašnja istraživanja provedena na istarskim sotama, pokazala su da se tijekom dozrijevanja maslina sastav ulja mijenja, ali za svaku sortu te promjene nisu jednake.[60,113] Do istog zaključka došli smo i u provedenom istraživanju. Put do ulja visoke kvalitete vodi preradom zdravih i svježe ubranih plodova masline.

4.2.2.2. Utjecaj sorte i stupnja zrelosti plodova na udio ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima Oblice, Levantinke i Lastovke

Fenolni spojevi su primarni antioksidansi, koji osiguravaju oksidacijsku stabilnost ulja, a zajedno s hlapljivim tvarima utječu na okus i aromu.[38,82] Studije utjecaja djevičanskih maslinovih ulja na zdravlje ljudi, pobudile su interes za proučavanjem sadržaja i sastava fenolnih spojeva u ulju. Na Slici 29. prikazani su rezultati masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva, ovisno o roku berbe, u trogodišnjem istraživanju sortnih djevičanskih maslinovih ulja. Tijekom zrenja opaža se snižavanje udjela fenolnih spojeva u uljima. Vrijednosti masenog udjela fenolnih spojeva u sortnom ulju Oblice kretale su se od 790,74 do 50,50 mg kg^{-1}, Levantinke od 694,10 do 212,32 mg kg^{-1} i Lastovke od 745,69 do 116,15 mg kg^{-1}. Navedeni rezultati uklapaju se u širok raspon do sada prijavljenih vrijednosti (do preko 1000 mg kg^{-1} do 50 mg kg^{-1}) ukupnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju.[51,114] Ispitivanja masenih udjela ukupnih fenolnih spojeva u istim sortnim uljima su proveli Šarolić i suradnici.[61] Prijavljene vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva u uljima Oblice, Levantinke i Lastovke nisu pokazale značajnu razliku, a nešto niže iznose trebamo prepisati višem stupnju zrelosti plodova (SZ = 4,3) od kojih su ulja proizvedena. Detaljnije istraživanje sastava fenolnih spojeva ovisno o roku berbe i godini istraživanja, na sortama Oblica i Leccino provela je Jukić Špika.[37] Ona bilježi niže masene udjele ukupnih fenola, α-tokoferola, fenolnih alkohola i sekoiridoida u uljima dobivenim iz zrelih plodova maslina obje sorte. Također, u rezultatima ovoga rada u uljima se zamjećuje trend snižavanja vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva s porastom SZ plodova. Sniženje masenog udjela ukupnih fenola do kojih dolazi napredovanjem zrenja na istarskim sortama su zabilježili Brkić Bubola i suradnici.[80] Snižavanje masenog udjela ukupnih sekoiridoida i fenola tijekom zriobe zabilježili su neovisno jedni o drugima Bonoli i sur.[83] i Bengana i suradnici.[84] Objašnjenje za pad udjela ukupnih fenola u ulju, trebalo bi tražiti u biokemijskim promjenama koje nastaju u plodu masline za vrijeme zriobe. L-fenilalaninamonij-lipaza (PAL) ključni je enzim u biosintezi fenolnih spojeva, koji katalizira prvi korak u sintezi fenilpropanoidnih spojeva koji su preteče fenolnih spojeva. Ryan i sur. navode da je aktivnost enzima PAL pod utjecajem stupnja zrelosti ploda, te ovisi o klimatskim uvjetima, dok stresni čimdbenici (ozljede, UV-svjetlo i temperatura) povećavaju njegovu aktivnost.[115]

Iznenađujuće, maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva u djevičanskim uljima ispitivanih sorti u 2014. godini (tri roka berbe) bili su zamjetno niži od godine prije i poslije. Spomenuta godina bila je iznimno teška za maslinarsku i uljarsku proizvodnju (napad maslinove muhe), stoga su očekivane više vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva. Moguće je dobivene vrijednosti objasniti promjenom lokacije uzgoja i dostupnosti vode u tlu. Plodovi maslina u 2014. brani su na nešto višoj nadmorskoj visini što bi moglo imati utjecaj na niži sadržaj fenolnih spojeva,[116] te osim toga ovom efektu treba pridodati utjecaj obilnih padalina kroz rujan i listopad spomenute godine (Dodatak 3). Sortno ulje Lastovke iz 1. berbe u 2015. godini pokazalo je iznimno nizak udio fenolnih spojeva. Ovakav izolirani rezultat može se objasniti većom lokalnom dostupnošću vode u tlu. Rezultati studija utjecaja navodnjavanja, upućuju na niži maseni udio ukupnih fenolnih spojeva u plodovima masline koji su bili izloženi većoj količini vode.[117,118] Također, Tovar i sur. razlog nižeg sadržaja fenolnih spojeva objašnjavaju nižom aktivnošću PLA, do koje dolazi povećanjem SZ ploda i vode u tlu.[119]

4.3. Utjecaj ukupnih fenolnih spojeva na specifičnu aktivnosti LOX enzima

Iako postoje brojni dokazi o inhibicijskom utjecaju fenolnih spojeva na aktivnost LOX enzima, [109] indirektno se to možemo promatrati i kroz utjecaj NGDA (derivat fenola) na enzim izoliran iz plodova (Poglavlje 4.2.1.3.). De Gregorio i sur. izravno su povezali pad sadržaja fenola (do kojeg dolazi porastom SZ) s porastom aktivnosti LOX enzima u plodu masline.[66] Rezultati trogodišnjeg praćenja korelacije između masenog udjela fenolnih spojeva u uljima i ukupne specifične aktivnosti LOX enzima (izražene kao zbroj specifičnih aktivnosti dobivenih mjerenjem količine nastalog produkta 9- i 13-*Z*,*E*-HPOD u jednoj minuti po miligramu ukupnih proteina) u plodovima, prikazani su za Oblicu na Slici 30. Porastom SZ plodova, jasno se uočava pad masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva, dok ukupna specifična aktivnost LOX enzima raste. Obrazac se ponavlja u svim godinama istraživanja. Rezultati usporedbe masenog udjela fenola i ukupne specifične aktivnosti lipoksigenaze, za sorte Levantinka i Lastovka prikazani su na Slikama 31. i 32. Kod sorti Levantinka i Lastovka uočava se prethodno opisan trend pada udjela ukupnih fenola i povećanja aktivnosti LOX enzima porastom SZ plodova.

Istraživanje o utjecaju fenolnih spojeva na sintezu hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima, koje su proveli Majetić Germak i sur.[85] izravno idu u prilog rezultatima njihovog inhibicijskog djelovanja na LOX enzim. Dodatkom fenolnih spojeva iz ploda masline

u maslinovo tijesto za vrijeme malaksacije, značajno je snižen maseni udio C_6 hlapljivih aldehida (*Z*-3-heksenal, heksanal i *E*-2-heksenal) i alkohola (heksanol i *E*-2-heksenol) u ulju. Ovo istraživanje predstavlja neizravnu potvrdu naših rezultata. Intervencijom fenolnim spojevima u LOX put za posljedicu je imalo kaskadni učinak snižavanja aktivnosti njegovih enzima. Zbog inhibicijskog djelovanja fenolnih spojeva na LOX enzim, oslobađa se manja količina 13-hidroperoksida masnih kiselina u maslinovo tijesto. Deficit supstrata uzrokuje nižu aktivnost HPL, što se odražava na aktivnost i ADH. Usporavanjem aktivnosti enzima unutar glavne grane LOX puta potiče se pojačana sinteza C_5 hlapljivih tvari, primijetili su Majetić Germak i suradnici.[85]

Budući raspolažemo s rezultatima trogodišnjeg praćenja odnosa ukupnih fenola i specifične aktivnosti LOX enzima, provedeno istraživanje predstavlja važan doprinos u boljem razumijevanju porasta specifične aktivnosti lipoksigenaze, do kojeg dolazi porastom SZ i sniženja udjela fenolnih spojeva u plodu. Međutim, porast enzimske aktivnosti, ne može se isključivo pripisati inhibicijskom utjecaju fenolnih spojeva na LOX. Provedenim molekularnim istraživanjima na sortama Leccino, Picula i Arbequina uočeno je povećanje ekspresije dvaju od tri izoenzima LOX tijekom zriobe plodova masline.[29] Nadalje, Muzzalupo i sur. potvrdili su oprečnu vezu između količine transkripcijskog produkta gena LOX i sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u procesu zriobe plodova sorte Coratina.[120]

Veća ekspresija LOX gena i pad udjela fenolnih spojeva, odgovorni su za zabilježenu veću specifičnu aktivnost LOX enzima tijekom perioda zriobe, osobito u periodu tamnjenja plodova masline (SZ ~ 3,5).

4.4. Hlapljive tvari djevičanskih maslinovih ulja sorte Oblica, Levantinka i Lastovka

4.2.4.1. Utjecaj sorte i roka berbe na sastav hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima

Rezultati ispitivanja sastava hlapljivih tvari u DMU ovisno o roku berbe u tri godine istraživanja prikazani su za sortu Oblica u Tablicama 15-17., za sortu Levantinka u Tablicama 18-20. i Lastovka u Tablicama 21-23.

Pregledom rezultata uočavaju se značajne razlike u sadržaju hlapljivih tvari među sortnim uljima ovisno o roku berbe i godini istraživanja. Općenito, najzastupljenije hlapljive tvari su aldehidi (*E*-2-heksenal, heksanal i pentanal), hlapljivi alkoholi (1-penten-3-ol, *Z*-3-heksen-1-ol, *E*-2-heksen-1-ol i heksanol), te hlapljivi esteri (heksil-acetat, butil-acetat i etil-butirat). Među navedenim hlapljivim spojevima najzastupljeniji su C_6 aldehidi, alkoholi, i esteri, dok se *E*-2-heksenal izdvaja kao najzastupljenija hlapljiva tvar u svim sortnim uljima, gotovo u svim rokovima berbe. Slično ispitivanje provela je Brkić Bubola na istarskim sortnim uljima Buže, Čerine i Rosinjole, te je potvrdila visok maseni udio C_6 hlapljivih aldehida, osobito *E*-2-heksenala.[74] Šarolić, također navodi *E*-2-heksenal kao najzastupljeniju hlapljivu tvar u dalmatinskim sortnim uljima Leccine, Lastovke, Oblice, Levantinke, Krvavice i Mašnjače.[79] Analiza provedena na talijanskim sortnim uljima ukazala je na široki raspon masenog udjela *E*-2-heksenala, od 2,74 mg kg^{-1} u ulju sorte Nocellara do 144,79 mg kg^{-1} u ulju sorte Coratina.[92] Maseni udio najzastupljenijeg hlapljivog aldehida odgovornog za svježe, zelene i gorke note u uljima Oblice kretao se od 6,388 do 40,720 mg kg^{-1}, u uljima Levantinke od 11,869 do 47,295 mg kg^{-1} i u uljima Lastovke od 5,811 do 31,934 mg kg^{-1}. Slične vrijednosti *E*-2-heksenala je prijavila Brkić Bubola u istarskim sortnim uljima, te je naročito njime bilo bogato ulje Buže (38,14 mg kg^{-1}).[74] Izneseni rezultati u skladu su s dominacijom *E*-2-heksenala i u drugim sortnim uljima prijavljenim u svijetu.[8,87,121,122]

Maseni udjeli ukupnih hlapljivih tvari, ukupnih aldehida, alkohola i estera u ovisnosti o roku berbe u tri uzastopne godine istraživanja prikazane su za sortu Oblica na Slici 33., za sortu Levantinka na Slici 34. i sortu Lastovka na Slici 35.

Značajne razlike u masenim udjelima *E*-2-heksenala se uočavaju ovisno o roku berbe i godini istraživanja u sve tri sorte. Promjene njegovog udjela u ulju tijekom zriobe, možemo pratiti preko promjena masenog udjela ukupnih hlapljivih aldehida kojima on dominira (Slike 33-35.).

Očekivano, slične promjene uočene su i u sadržaju ukupnih hlapljivih tvari, koje su u ulju Oblice 2013. godine postigli maksimum u 4. roku berbe (43,993 mg kg^{-1}). Nedovoljni podaci za 2014. godinu ograničavaju istraživanje na samo tri roka berbe, te u zadnjem roku bilježimo najveći maseni udio hlapljivih tvari (54,687 mg kg^{-1}), dok je u 2015. godini najviši maseni udio zabilježen u 3. roku berbe (48,113 mg kg^{-1}). Stupnjevi zrelosti plodova u kojima se zabilježio najviši sadržaj hlapljivih spojeva u uljima Oblice, u tri godine istraživanja kretali su se od 2,07 do 3,06 (Tablica 10).

Maksimalne vrijednosti masenih udjela hlapljivih tvari u sortnim uljima Levantinke postignute su u 2013. i 2015. godini u jednakim rokovima berbe kao i kod sorte Oblica, te su iznosile 41,909 mg kg^{-1} i 41,880 mg kg^{-1}. Iznimno, u 2014. godini je zabilježena maksimalna vrijednost masenog udjela hlapljivih tvari u 2. roku berbe (55,932 mg kg^{-1}). Stupnjevi zrelosti plodova kod kojih je izmjeren najviši sadržaj hlapljivih tvari u uljima kretali su se u sličnim vrijednostima kao kod sorte Oblica od 1,56 do 2,99 (Tablica 10).

Ulja sorte Lastovka sadrže zamjetno niže vrijednosti ukupnih hlapljivih tvari od sortnih ulja Oblice i Levantinke (Tablice 21-23.). Najviši maseni udio ukupnih hlapljivih tvari zabilježen je u ulju 4. roka berbe (32,152 mg kg^{-1}) u 2013., dok su u 2014. godini gotovo izjednačene vrijednosti u 2. i 3. roku berbe (31,588 i 30,697 mg kg^{-1}). U ulju Lastovke 6. roka berbe u 2015. godini zabilježen je najviši maseni udio hlapljivih tvari (35,032 mg kg^{-1}). U širokom rasponu stupnja zrelosti plodova od 1,37 do 3,64 zabilježen je maksimalni sadržaj hlapljivih tvari u uljima sorte Lastovka (Tablica 10.).

U ulju sorte Oblica uočen je dvostruko viši maseni udio heksanala (4,492 mg kg^{-1}), od njegove vrijednosti utvrđene u ulju sorte Lastovka (2,023 mg kg^{-1}). Između ove dvije sorte se smjestila sorta Levantinka s masenim udjelom heksanala od 3,628 mg kg^{-1}. Jednako istraživanje proveli su Šarolić i sur. i zaključili da ulje sorte Levantinka ne sadrži heksenal.[61] Oni su istraživanje ograničili na jednu godinu i samo jedan uzorak plodova (SZ = 4,3). Niski maseni udio heksanala u ovom istraživanju također je zabilježen u uljima Levantinke dobivenim preradom zrelih plodova (SZ = 5,17 i 5,88) u 2015. godini. Uvidom u rezultate trogodišnjeg istraživanja, zaključujemo da sorta Levantinka pokazuje najveće međugodišnje oscilacije u sadržaju heksanala (Tablice 18-20.).

Maseni udio heksanala u analiziranim sortnim uljima Dalmacije veći je do deset puta od vrijednosti koje su prijavili Brkić Bubola i sur. u sortnim uljima Buže (0,433 mg kg^{-1}), Čerine (0,296 mg kg^{-1}) i Rosinjole (0,352 mg kg^{-1}).[60] Po sadržaju heksanala, ispitivanim uljima su bliska talijanska ulja, osobito sorte Ciciarello (3,15 mg kg^{-1}).[92]

Cilj ovog rada je bio uspostava veze između aktivnosti LOX enzima u plodovima i sinteze poželjnih hlapljivih tvari u pripadajućim uljima. Specifičnu aktivnost enzima koju opažamo možemo neizravno povezati sa sadržajem heksanala, prvog hlapljivog aldehida proizašlog iz 13-*Z,E*-HPOD-a, budući da je za supstrat korištena linolna kiselina. Najviši maseni udio heksanala uočen je u ulju dobivenom preradom plodova srednjeg stupnja zrenja, dok specifična aktivnost LOX enzima nastavlja rasti i postiže maksimalnu vrijednost u zrelim

plodovima. Treba istaknuti da heksanal može nastati i kemijskim putem, tj. oksidacijom masnih kiselina, zato ga nalazimo i u uljima koja su dobivena preradom zelenih plodova maslina.[123]

Morales i Aparicio navode da se ulja poželjnih zelenih i svježih mirisa dobiju preradom plodova niskog stupnja zrelosti (SZ = 1,5-2).[73] Obzirom na iznesene rezultate istraživanja, najbogatija hlapljivim tvarima (od kojih najviše pridonosi *E*-2-heksenal) su ulja dobivena preradom plodova srednjeg stupnja zrelosti. Do sličnog zaključka došli su Angerosa i Basti, te navode da *E*-2-heksenal doseže maksimalni maseni udio u razdoblju promjene boje ploda iz zeleno-žute u ljubičastu. Sniženje masenog udjela ovog poželjnog aldehida u uljima, koji slijedi u kasnijim rokovima berbe, oni objašnjavaju nižom aktivnošću enzima uključenih u njegovu sintezu.[94] Sličan obrazac promjene C_6 aldehida, opisali su Cevik i sur.[124] koji u ulju zrelih plodova turske sorte Gemlik bilježe visok maseni udio *E*-2-heksenala. Kalua i sur.,[82] te Baccouri i sur.,[125] neovisno jedni o drugima, zamijetili su trend rasta masenog udjela *E*-2-heksenala koji u srednjim rokovima berbe doseže maksimalnu vrijednost u osam različitih kultivara.

Maseni udio hlapljivih alkohola kreće se u ulju Oblice od 2,265 do 20,766 mg kg^{-1}, ulju Levantinke 2,039 do 9,713 mg kg^{-1}, te ulju Lastovke 1,701 do 11,873 mg kg^{-1}. Ovisno o sorti i godini istraživanja maseni udjeli hlapljivih alkohola značajno se razlikuju ovisno o roku berbe (Tablice 15-23.). Napredovanjem zriobe bilježi se značajan porast masenog udjela hlapljivih alkohola u uljima Oblica, Levantinka i Lastovka u 2013 godini. Međutim, u uljima iz 2015. godine uočen je drugačiji trend, maseni udio hlapljivih alkohola postiže maksimalnu vrijednost 15 do 30 dana ranije. Ovaj pomak moguće je objasniti uvidom u vrijednosti stupnja zrelosti plodova, odnosno u 2013. i 2015. godini, najviši maseni udjeli alkohola zabilježeni su u uljima dobivenim od plodova gotovo jednakog stupnja zrelosti (Tablica 10.). Salas i sur. su prijavili najvišu aktivnost ADH, odgovorne za redukciju alifatskih aldehida u alkohole, u ulju dobivenom iz plodova u fazi intenzivnog tamnjenja. Snižavanje udjela C_6 hlapljivih aldehida u uljima, do kojeg dolazi s porastom SZ, Salas i sur. pripisuju povećanoj aktivnost ADH.[72] Rezultati naših istraživanja pokazuju da porastom masenog udjela ukupnih alkohola, dolazi do pada masenog udjela C_6 hlapljivih aldehida, što se najbolje uočava u uljima dobivenim od najzrelijih plodova (Slike 33-35.).

Najzastupljeniji hlapljivi alkoholi u sortnim uljima srednje Dalmacije su *E*-2-heksen-1-ol i *Z*-3-heksen-1-ol. Najviši maseni udio ovih alkohola zabilježen je u uljima dobivenim preradom zrelih plodova. Ulja zelenih plodova Oblice i Levantinke, imaju znatno veći udio *Z*-

3-heksen-1-ola u odnosu na *E*-2-heksen-1-ol, a omjer prelazi u korist *E*-2-heksen-1-ola samo u uljima dobivenim preradom zrelih plodova (Tablice 15-20.). Različito tome, ulja dobivena preradom zelenih plodova Lastovke sadrže približno jednak omjer *E*-2-heksen-1-ola i *Z*-3-heksen-1-ola, a napredovanjem zriobe omjer i ovdje prelazi u korist *E*-2-heksen-1-ola (Tablica 21-23.). Moguće, da je u zelenim plodovima Oblice i Levantinke nešto veća aktivnost ADH. Zriobom, u svim istraživanim sortama, raste aktivnost *Z*-3,*E*-2-enal-izomeraze što za posljedicu ima povećavanje masenog udjela *E*-2-heksen-1-ola u ulju dobivenom preradom zrelih i prezrelih plodova. Aparicio i Morales navode ove alkohole, osobito *E*-2-heksen-1-ol, kao indikatore prezrelosti plodova masline,[73] što možemo potvrditi rezultatima ovog istraživanja.

Izrazito visoki maseni udjeli heksanola utvrđeni su u uljima Oblice (3,954 mg kg^{-1}) i Lastovke (5,937 mg kg^{-1}) visokog stupnja zrelosti u 2013. godini. Visoke vrijednosti heksanola prijavila je Brkić Bubola[74] za sortu Buža i Runcio i sur.[92] za sortu Pendolino. Ostale vrijednosti za heksanol su znatno niže i u skladu s rasponima prijavljenim u španjolskim[122] i tuniskim sortnim uljima.[126] Iako se heksanol u ranijim istraživanjima nije smatrao dobrim analitičkim indikatorom dozrijevanja,[73] u novijim istraživanjima navodi ga se kao indikator dozrijevanja i kultivarnih razlika.[82] U našem istraživanju, najviše vrijednosti heksanola zabilježene su u uljima dobivenim preradom plodova kod kojih su 2/3 ploda ljubičasto obojene (SZ ~3,5).

Gotovo linearni pad vrijednosti masenog udjela, porastom SZ plodova, zabilježen je za C_5 hlapljivi alkohol 1-penten-3-ol. U uljima Oblice vrijednosti masenog udjela 1-penten-3-ola kretale su se od 2,152 do 0,333 mg kg^{-1}, te uljima Levantinke 1,686 do 0,272 mg kg^{-1}. Ulja Lastovke su sadržavala niži maseni udio 1-penten-3-ol, od 1,140 do 0,265 mg kg^{-1}. Opadanje vrijednosti ovog alkohola koji se povezuje s maslačnim i mekim zelenim mirisima napredovanjem zrenja, opisali su i Kalua i sur., kod sortnih ulja Mission i Paragon. Suprotno tome, vrijednost masenog udjela 1-penten-3-ola u uljima Leccino, Corregiola ostala je jednaka, dok je u ulju sorte Manzanilla značajno porasla. Ovi podaci poslužili su da Kaula i sur., izdvoje 1-penten-3-ol kao drugi indikator dozrijevanja i kultivarnih razlika.[82]

U istraživanim sortama utvrđeni su znatno niži maseni udjeli hlapljivih estera obzirom na masene udjele hlapljivih aldehida i alkohola (Tablice 15-23.). Iznimno visoke vrijednosti hlapljivih estera, među kojima dominira heksil-acetat, uočavaju se u ulju Levantinke dobivenom preradom plodova 5. roka berbe (4,119 mg kg^{-1}) u 2015. godini. U uljima Oblice (0,842 mg kg^{-1}) i Lastovke (0,478 mg kg^{-1}) najviši maseni udio hlapljivih estera sadržala su ulja

dobivena preradom plodova srednjeg stupnja zrelosti. Napredovanjem zriobe uočava se postepeni porast masenog udjela heksil-acetatata, kojeg se povezuje s poželjnim slatkim i voćnim mirisima u ulju. U uljima dobivenim od prezrelih plodova, zabilježen je pad vrijednosti masenog udjela heksil-acetata, stoga je opravdan navod Aparicia i Moralesa koji ovaj hlapljivi ester izdvajaju kao indikator srednjeg stupnja zrelosti plodova.[73] Prijavljene vrijednosti i ponašanje hlapljivih estera tijekom zriobe u dobroj su korelaciji s vrijednostima dobivenim u istarskima autohtonim sortama.[74] Angerosa ovako nizak sadržaj C_6 hlapljivih estera pripisuje niskoj aktivnosti AAT enzima, prema alkoholima kratkog lanca.[86]

U provedenom istraživanju pratile su se i promjene u masenim udjelima organskih kiselina tijekom zriobe plodova (Tablice 15-23.). Nisu uočene velike razlike u masenom udjelu etanske, butanske i heksanske kiseline u periodu zriobe. Velike razlike, u sadržaju ovih kiselina se uočavaju među sortama, te unutar iste sorte ovisno o godini istraživanja. U ulju Levantike i Lastovke uočen je nešto niži maseni udio ukupnih organskih kiselina, naročito niske vrijednosti sadržavala su ulja Levantinke 2014. i 2015. godine i Lastovke u 2015. godini. Ulja Oblice sadržavala su približno jednake vrijednosti udjela ukupnih organskih kiselina u sve tri godine istraživanja. Organske kiseline nisu produkti LOX puta, i povezuju se s nepoželjnim (kiselim, gorkim i ustjalim) okusno-mirinim doživljajem.[127]

4.2.4.2. Odnos C_6 i C_5 hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima

Na Slikama 36-38., prikazan je odnos masenog udjela ukupnih C_6 i C_5 hlapljivih tvari (Dodatak 2.), za svaku sortu u ovisnosti o roku berbe i godini istraživanja. Znatno niže vrijednosti uočavaju se u sadržaju C_5 hlapljivih tvari u odnosu na C_6 hlapljivih tvari. One kod sorte Levantinka svoj maksimum postižu u ulju dobivenom od zelenih plodova (2,075 mg kg^{-1}). Ista pojava uočena je 2015. godine u uljima sorti Oblica (2,794 mg kg^{-1}) i Lastovke (1,661 mg kg^{-1}). Suprotno tome, u uljima dobivenim preradom zrelih i prezrelih plodova Oblice i Lastovke u 2013. godini uočen je visok sadržaj C_5 hlapljivih tvari. Sličan odnos između sadržaja C_6 i C_5 hlapljivih tvari je utvrdila Brkić Bubola u istarskim sortnim uljima.[74] Očekivani, niski maseni udio C_5 hlapljivih tvari u ulju, rezultat je aktivnosti bočnog ogranka LOX puta. Već spomenutim homolitičkim cijepanjem nastalih hidroperoksida masnih kiselina oslobađaju se alkoksi radikali od kojih kemijskim reakcijama nastaju 1,3-pentenski radikali. Nastali dienski radikali

dimeriziraju ili reagiraju s hidroksilnim radikalima te nastaju C_5 alkoholi koji se dalje enzimatski prevode u C_5 hlapljive produkte.[122,128,129]

Spomenuto je da se maksimalni sadržaj C_5 hapljivih tvari postignuo u različitim rokovima berbe u 2013. i 2015. godini. Međutim, važno je naglasiti da u periodima zabilježenih viših vrijednosti C_5 hapljivih tvari, zabilježene su niže vrijednosti C_6 hlapljivih tvari. Odnos među sadržajem C_6 i C_5 hlapljivih tvari indirektno nam pruža uvid u aktivnost drugog enzima u kaskadnom LOX putu. Poznato je da niska aktivnost HPL enzima, dovodi do nakupljanje hidroperoksida masnih kiselina, što moze uzrokovati da LOX direktno cijepa sintetizirane hidroperokside, a kao posljedica ovakve enzimske aktivnosti povećava se udio C_5 hlapljivih spojeva u ulju.[62] Postizanje maksimalnih vrijednosti C_5 hlapljivih tvari u uljima dobivenim od plodova posve različitog SZ u 2013. i 2015. godini, kod sorte Oblica i Lastovka, moguće je objasniti većom aktivnošću bočnog ogranka LOX puta. Kako je obrazac za obje sorte unutar godine jednak, može se pretpostaviti da je aktivnost HPL enzima pod utjecajem klimatoloških parametra, na koje su osjetljivije sorte Oblica i Lastovka. Uvidom u prosječne količine padalina kroz mjesece kolovoz, listopad i studeni u 2013. i 2015. uočavaju se značajne razlike (Dodatak 4.).

Promjene masenog udjela ukupnih C_6 hlapljivih tvari slijede prethodno opisani trend (Poglavlje 4.2.4.1.), te se najviše vrijednosti uočavaju u uljima dobivenim preradom plodova maslina srednjeg stupnja zrelosti (SZ ~3,5).

4.2.5. Utjecaj aktivnosti LOX enzima na sadržaj C_6 hlapljivih tvari

Poželjna mirisna svojstva djevičanskih maslinovih ulja pripisuju se sadržaju C_6 i C_5 hlapljivih tvari proizašlih iz LOX puta U ovom dijelu naglasak je stavljen na sintezu dominantnijih C_6 hlapljivih tvari koji nastaju u primarnoj grani puta. Rezultati trogodišnjeg praćenja promjene specifične aktivnosti LOX enzima (izražene preko količine nastalog produkta 13-*Z,E*-HPOD) u plodu i masenog udjela ukupnih C_6 i C_5 hlapljivih tvari u djevičanskom maslinovom ulju, ovisno o roku berbe prikazani su za Oblicu na Slici 39., te Slikama 40. i 41. za Levantinku i Lastovku.

Već opisani rast specifične aktivnosti lipoksigenaze, porastom roka berbe (SZ ploda) u dobroj je korelaciji s masenim udjelom ukupnih C_6 hlapljivih spojeva u sortnim uljima Oblice i Lastovke u sve tri godine istraživanja. Kod sorte Oblica 2013. i 2015. uočen je pravilan

obrazac u kojem sadržaj C_6 hlapljivih tvari postiže maksimalnu vrijednost dva tjedna prije nego LOX enzim postigne maksimalnu aktivnost. Nedovoljni podaci ne dopuštaju potpunu analizu u 2014. godini, ali u prva tri roka uočava se paralelan porast C_6 hlapljivih tvari i specifične aktivnosti enzima. Gotovo jednak odnos u sadržaju C_6 hlapljivih tvari i specifične enzimske aktivnosti se uočava u uljima Lastovke u 2013. godini. Blaga odstupanja se bilježe pred kraj istraživanja u 2015. godini, gdje je maksimalna specifična aktivnost LOX enzima uočena u 5. roku berbe, a neprekidan rast masenog udjela C_6 hlapljivih tvari primjetan je kroz cijeli period zriobe plodova. U uljima Levantinke zabilježen je linearni rast enzimske aktivnosti porastom roka berbe, u svim godinama istraživanja. Maksimalna vrijednost C_6 hlapljivih tvari u ovim uljima, kao i u uljima Oblice, postignuta je 2013. godine u 3. roku i 2015. godine u 4. roku berbe.

Općenito, napredovanjem zriobe plodova, povećava se aktivnost LOX enzima, što za posljedicu ima povećanje sinteze poželjnih C_6 hlapljivih tvari u djevičanskim maslinovim uljima. Međutim, najveći sadržaj hlapljivih tvari uočen je u ulju dobivenom iz plodova srednjeg SZ (2/3 ploda ljubičasto obojeno), dok se najviša aktivnost LOX enzima opaža u plodovima višeg SZ. Gotovo jednake promjene u sadržaju hlapljivih tvari ovisno o roku berbe u uljima sorte Coratino uočili su Muzzalupo i suradnici.[120] Oni su promatrali korelaciju između količine transkripcijskog produkta gena za LOX i pet kemijskih biomarkera (heksanal, *E*-2-heksenal, *E*-2-heksen-1-ol, 1-heksanol i *Z*-heksenol-acetat) njene aktivnosti u ovisnosti o SZ plodova. Analiza količine transkripcijskog produkta gena LOX, ukazala je na njeno kontinuirano nakupljanje u razdoblju zrenja plodova, dok su maseni udjeli promatranih C_6 hlapljivih tvari najvišu vrijednost postigle u uljima dobivenim iz plodova srednjeg stupnja zrelosti. Uočene vremenske razlike, u postizanju najviše vrijednosti hlapljivih tvari u ulju i aktivnosti LOX enzima u plodovima, moguće je obrazložiti time što mi promatramo samo aktivnost lipoksigenaze, prvog enzima u složenoj kaskadi biosinteze C_6 hlapljivih tvari. Uloga je LOX enzima da osigurava preteče, prvenstveno 13-*Z*,*E*-HPOD za daljnju sintezu C_6 hlapljivih spojeva. Aktivnost enzima ovisi i o dostupnosti supstrata (višestruko nezasićenih masnih kiselina) još jednom sortno specifičnom svojstvu. Sanchez-Ortiz i sur., su zabilježili da se dodatakom linolne i linolenske kiseline u maslinovo tijesto tijekom postupka proizvodnje, povećao sadržaja poželjnih C_6 hlapljivih tvari u uljima sorti Picula i Abequina.[122]

Salas i sur., kao rezultat svojih istraživanja iznose sličnu pretpostavku da je enzimski potencijal pojedine sorte u sintezi hlapljivih spojeva genetski predodređen.[9] Angerosa i sur.,

poslali su sličnu poruku. Oni navode da je sadržaj hlapljivih tvari, prvenstveno C_6 spojeva, najviše pod utjecajem sorte, dok klimatski i okolišni čimbenici djeluju posredno, preko stupnja zrelosti plodova.[86] U provedenom istraživanju uočava se snažan utjecaj sorte na aktivnosti LOX enzima i sadržaju hlapljivih C_6 tvari. U plodovima Lastovke zabilježena mu je i do deset puta niža specifična aktivnost, obzirom na druge istraživane sorte. Povezano s tim i maseni udio C_6 hlapljivih tvari u uljima Lastovke je značajno niže (Slike 39-41.).

Uočava se jasan odnos između sadržaja C_6 hlapljivih tvari u ulju i specifične aktivnosti LOX enzima u plodu maslina pojedine sorte unutar iste godine istraživanja. U plodovima Oblice, Levantinke i Lastovke je izmjerena najviša aktivnost enzima u 2014. godini, nedostatak podataka o ulju nam ne omogućava da se potpuno analizira sadržaj C_6 hlapljivih tvari, a analizom ulja u prva tri roka berbe zabilježen je njihov iznimno visok sadržaj. Rezultati iz 2014. iako su nepotpuni, od presudne su važnosti za objašnjenje klimatoloških utjecaja na aktivnost enzima i sadržaj hlapljivih spojeva u ulju. Rujan spomenute godine izdvaja se kao najkišovitije razdoblje u trogodišnjem istraživanju (Dodatak 4.). Servili i sur., navode da visok sadržaj vode u tlu, za poslijedicu ima niži sadržaj fenolnih spojeva u plodu, a time i veću aktivnost LOX enzima, što se odražava na viši sadržaj poželjnih C_6 hlapljivih tvari u uljima.[130]

Suprotno tome, u plodovima sve tri sorte u 2015. godini koja je bila izrazito topla, uočena je niža aktivnost LOX enzima, što se odrazilo na niži sadržaj hlapljivih tvari u uljima, osobito u ulju Lastovke (Slika 41.).

§ 5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenih istraživanja na plodovima i uljima autohtonih dalmatinskih sorti maslina Oblica, Levantinka i Lastovka, analiziranih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Porast specifične aktivnosti LOX enzima uočava se povećanjem stupnja zrelosti ploda (roka berbe) masline sorte Oblica, Levantinka i Lastovka. Najveći skok u specifičnoj aktivnosti LOX enzima se uočava u periodu intenzivnog tamnjenja ploda (SZ~3).
- Lipoksigenazna aktivnost je sortno specifično svojstvo. U plodovima Oblice i Levantinke izmjerena je približno jednaka specifična aktivnost, različito tome, u plodovima Lastovke je izmjerena znatno niža specifična aktivnost enzima.
- Analizom primarnih produkata oksidacije linolne kiseline je uočeno da LOX enzim iz plodova maslina ispitivanih sorti katalizira sintezu 9-hidroperoksi-10,12-oktadekadeinske kiseline (9-*Z,E*-HPOD) i 13-hidroperoksi-9,11-oktadekadeinske kiseline (13-*Z,E*-HPOD) u omjeru približno 1:2.
- Obzirom na produktnu specifičnost koju enzim pokazuje, LOX iz plodova Oblice, Levantinke i Lastovke pipada ne-tradicionalnim lipoksigenazama (LOX-1).
- Ispitivanjem vremenskog tijeka reakcije u kojem se ispitivalo djelovanje LOX enzima na linolnu kiselinu, ukazalo je da se kod sorte Oblica produženjem trajanja reakcije iznad 30 minuta ne pridonosi rastu koncentracija produkta 9- i 13-*Z,E*-HPOD, različito tome kod sorti Levantinka i Lastovka produženjem trajanja reakcije, koncentracija produkata se povećava.
- Najviša aktivnost LOX enzima zabilježena je kod pH vrijednosti od 6,5. Pomak prema pH vrijednost 7,0 se uočava u plodovima sorte Oblica, ranog stupnja zrelosti (SZ = 0,45).
- Nekompetitivni inhibitor, nordihidroguaretična kiselina (NGDA), kao i polifenolni spojevi prisutni u plodu masline inhibiraju aktivnost LOX enzima.
- Udio ukupnih fenolnih spojeva u ulju sortno je karakterističan i ovisi o stupnju zrelosti plodova. Porastom stupnja zrelosti plodova uočava se sniženje udjela fenolnih spojeva

u uljima istraživanih sorti. Najviši raspon u sadržaju ukupnih fenola zapažen je u uljima sorte Oblica.

- Sastav hlapljivih tvari je svojstvo sorte.
- Djevičanska maslinova ulja istraživanih autohtonih dalmatinskih sorti su pokazala različite profile hlapljivih tvari. Zapažene su kvantitativne razlike u sadržaju pojedinih aldehida, alkohola i estera. Sortna ulja Lastovke su sadržavala značajno niže koncentracije hlapljivih tvari od sortnih ulja Oblice i Levantinke.
- Stupanj zrelosti plodova ima značajan utjecaj na sastav hlapljivih tvari u istraživanim uljima. Ulja dobivena preradom zrelih plodova (SZ oko 3) sadržavala su najviše masene udjele poželjnih C_6 hlapljivih tvari, među kojima dominiraju aldehidi, naročito *E*-2-heksenal.
- Najveće oscilacije u masenom udjelu heksanala, uočene su u sortnim uljima Levantinke.
- Najveći maseni udio *E*-2-heksen-1-ola je opažen u uljima dobivenim preradom plodova sorte Lastovka, najvišeg stupnja zrelosti. Zrenjem plodova raste udio i mijenja se odnos između *Z*-3-heksen-1-ola i *E*-2-heksen-1-ola.
- U svim istraživanim uljima, napredovanjem zriobe, uočava se linearan pad masenog udjela 1-penten-3-ola.
- Sortna ulja Levantinka imala su najveći udio hlapljivih estera.
- Pored sorte i stupnja zrelosti ploda, zapažen utjecaj na specifičnu aktivnost LOX enzima u plodu, te sadržaj fenolnih spojeva i hlapljivih tvari u ulju, imali su klimatski uvjeti u pojedinoj godini berbe.
- Napredovanjem zriobe se uočava porast specifične enzimske aktivnosti LOX enzima i sadržaj C_6 hlapljivih tvari u sortnim uljima Oblice, Levantinke i Lastovke. Međutim, dok se rast specifične aktivnosti enzima uočava kroz gotovo cijeli proces zrenja (SZ oko 4, plodovi potpuno ljubičaste potkožice) sadržaj ukupnih C_6 hlapljivih tvari postiže maksimalnu vrijednost nešto ranije (SZ oko 3, plodovi 2/3 obojani u ljubičasto).
- Na temelju prethodno iznesenih opažanja može se zaključiti da je maseni udio ukupnih C_6 hlapljivih komponenti u maslinovom ulju bilo najveći početkom i sredinom studenog. S obzirom na tu činjenicu ne bi trebalo žuriti u ranu berbu.
- Produženjem vremena malaksacije (miješanja paste tijekom ekstrakcije ulja) kod sorti Levantinka i Lastovka mogao bi se dobiti veći udio hlapljivih tvari, veća voćnost, što je pozitivno svojstvo maslinovog ulja. Pri tom bi se trebalo paziti na ostale parametre

kvalitete ulja (slobodne masne kiseline, peroksidni broj i ekstincije u UV-području). Sve ove nalaze bi trebalo iskušati u stvarnoj, komercijalnoj proizvodnji maslinovog ulja.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ADH	alkohol-dehidrogenaza
AH	lipolitička grupa enzima
Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
ATT	alkoholacil-transferaza
BHT	butilhidroksiltoluen
β-ME	2-merkaptoetanol
BSA	albumin iz goveđeg seruma
C_n	hlapljiva tvar sa n-brojem ugljikovih atoma
DMU	djevičansko maslinovo ulje
DTT	1,4-ditioeritritol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EPPS	4-(2-hidroksiletil)-1-piperazinetansumporna kiselina
FAOSTAT	Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda
FID	plameno-ionizacijski detektor
Gly	glicin
HEPES	4-(2- hidroksiletil)-1-piperazinpropansumporna kiselina
His	histidin
HPL	hidroperoksid lijaza
9-Z,E-HPOD	9-hidroperoksi-10,12-oktadekadeinska kiselina
13-Z,E-HPOD	13-hidroperoksi-9,11-oktadekadeinska kiselina
HS-SPME	metoda mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi
HT	hlapljive tvari
Ile	izoleucin
ΔK	razlika u ekstinkcijskim koeficijentima
Km	Michaelis-ova konstanta
K_λ	specifična ekstinkcija pri valnoj duljini λ
LA	linolna kiselina

LnA	linolenska kiselina
LOX	lipoksigenaza
MES	2-(N-morfilino)etansumporna kiselina
NAD	nikotin-amid dinukleotid
NADP-ADH	nikotin-amid dinukleotid ovisna alkohol-dehidrogenaza
NGDA	nordihidroguaretična kiselina
Oep1LOX1	rekombinantni protein LOX (Uniprot: ACG56281)
Oep2LOX1	rekombinantni protein LOX (Uniprot: EU513351)
Oep1LOX2	rekombinantni protein LOX (Uniprot: EU513352)
Oep2LOX2	rekombinantni protein LOX (Uniprot: EU513353)
PAL	L-fenilalanin amonij-lipaza
PB	peroksidni broj
PDB	proteinska banka podataka
Phe	fenilalanin
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluorid
PR-HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti na obrnutim fazama
PUFA	višestruko nezasićene masne kiseline
PVPP	polivinil-polipropiledon
SD	standardna devijacija
SMK	slobodne masne kiseline
SZ	stupanj zrelosti ploda
Tyr	tirocidin
Val	valin

§ 7. LITERATURNI IZVORI

[1] J. Elloumi, R. Ben-Ayed i S. Aifa, *Curr Biotechnol*. **2** (2012) 115–124.

[2] Pravilnik o uljima od ploda i komine masline, *Narodne novine* **7**, Zagreb, 2009.

[3] C. M. Kalua, M. S. Allen, D. R. Bedgood, A. G. Bishop, P. D. Prenzler i K. Robards, *Food Chem.* **100** (2007) 273–286.

[4] F. Angerosa, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **104** (2002) 639–660.

[5] R. Aparicio i G. Luna, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104** (2002) 614–627.

[6] J. Sanchez i J. Salas u J. Harwood i R. Aparicio (ur.), *Handb. olive oil Anal. Prop.* Springer, 2000, str. 79–99.

[7] P. Kandylis, A. S. Vekiari, M. Kanellaki, N. Grati Kamoun, M. Msallem i Y. Kourkoutas, *LWT - Food Sci. Technol.* **44** (2011) 1333–1341.

[8] X. Berlioz, B. Cordella, C. Cavalli, J. F. Lizzani-Cuvelier, L. Loiseau i A. M. Fernandez, *LWT - Food Science and Technology*, J. *Agric. Food Chem.* **54** (2006) 10092–10101.

[9] J. J. Salas, *J. Agric. Food Chem*. **52** (2004) 3155–3158.

[10] F. Kotti, K. Jaziri, F. Arab, Y. Mater, S. Sifi, N. Fares, M. Hammami i M. Gargouri, *Food Biotechnol.* **24** (2010) 95–105.

[11] P. Luaces, C. Sanz i A. G. Pérez, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 6309–6313.

[12] E. Braidot, E. Petrussa, S. Micolini, F. Tubaro, A. Vianello i F. Macrì, *J. Exp. Bot.* **55** (2004) 1655–1662.

[13] J. Maury, C. Palmieri-Thiers, V. Brunini-Bronzini De Caraffa, V. Lorenzi, C. Gambotti, J. Giannettini i L. Berti, *Adv. Olive Resour.* **661** (2009) 1–22.

[14] A. Andreou i I. Feussner, *Phytochemistry* **70** (2009) 1504–1510.

[15] C. Palmieri-Thiers, J.C. Alberti, S. Canaan, V. Brunini, C. Gambotti, F. Tomi, E. H. Oliw, L. Berti i J. Maury, *Arch. Biochem. Biophys.* **509** (2011) 82–89.

[16] V. Lorenzi, J. Maury, J. Casanova i L. Berti, *Plant Physiol. Biochem.* **44** (2006) 450–454.

[17] M. Ridolfi, S. Terenziani, M. Patumi i G. Fontanazza, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 835–839.

[18] J. J. Salas, M. Williams, J. L. Harwood i J. Sánchez, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76** (1999) 1163–1168.

[19] B. A. Vick u T. S. Moore (ur.) *Oxygenated Fatty Acids of the Lipoxygenase Pathway*, *Lipid metabolism in Plants*, Boca Raton, 1993, str. 167–191.

[20] I. Ivanov, D. Heydeck, K. Hofheinz, J. Roffeis, V. B. O'Donnell, H. Kuhn i M. Walther, *Arch. Biochem. Biophys.* **503** (2010) 161–174.

[21] J. Siedow, *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42** (1991) 145–188.

[22] D. Shibata i B. Axelrod, *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **12** (1995) 213–228.

[23] B. Feng, Z. Dong, Z. Xu, X. An, H. Qin, N. Wu, D. Wang i T. Wang, *J. Cereal Sci.* **52** (2010) 387–394.

[24] A. Liavonchanka i I. Feussner, *J. Plant Physiol.* **163** (2006) 348–357.

[25] R. Wang, W. Shen, L. Liu, L. Jiang, Y. Liu, N. Su i J. Wan, Plant Mol. Bio., **66** (2008) 401-414.

[26] L. C. Sanz, A. G. Perez, J. J. Rlos i J. M. Olias, *J. Agric. Food Chem.* **50** (1993) 696–699.

[27] C. Palmieri-Thiers, S. Canaan, V. Brunini, V. Lorenzi, F. Tomi, J. L. Desseyn, U. Garscha, E. H. Oliw, L. Berti i J. Maury, *Biochim. Biophys. Acta* **1791** (2009) 339–346.

[28] M. N. Padilla, M. L. Hernández, C. Sanz i J. M. Martínez-Rivas, *Phytochemistry* **74** (2012) 58–68.

[29] M. N. Padilla, M. L. Hernández, C. Sanz i J. M. Martínez-Rivas, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 9097–9107.

[30] G. Coffa, A. N. Imber, B. C. Maguire, G. Laxmikanthan, C. Schneider, B. J. Gaffney i A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 38756–38766.

[31] C. Conde, S. Delrot i H. Gerós, *J. Plant Physiol.* **165** (2008) 1545–1562.

[32] F. Strikić, J. Gugić, T. Klepo, Stanje Hrvatskog maslinarstva, 2012, Glasilo biljne zaštite XII (4) 271-276.

[33] L. Najafian, A. Ghodsvali, M. H. Haddad Khodaparast, L. L. Diosady, *Food Res. Int.* **42** (2009) 171–175.

[34] E. Dag, A, Kerem, Z, Yogev, N, Zipori, I, Lavee, S, Ben-David, *Sci. Hort.* **127** (2011) 358–366.

[35] M. Uceda i L. Frías, Harvest dates. *Proceedings del Segundo Seminario Oleicola Internacional. COI, Córdoba* (1975) 125–128.

[36] H. Dıraman i H. Dibeklioğlu, C *J. Am. Oil Chem. Soc.* **86 (**2009) 663–674.

[37] M. Jukić Špika, Karakterizacija i genetička identifikacija djevičanskih maslinovih ulja sorti Oblica i Leccino u dalmatinskim maslinicima, Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.

[38] A. Bendini, L. Cerretani, A. Carrasco-pancorbo, A. M. Gómez-caravaca, A. Segura-carretero, A. Fernández-gutiérrez i G. Lercker, *Molecules* **12** (2007) 1679–1719.

[39] C. Di Vaio, S. Nocerino, A. Paduano i R. Sacchi, *J. Sci. Food Agric.* **93** (2013) 1134–1139.

[40] A. Rotondi, A. Bendini, L. Cerretani, M. Mari, G. Lercker i T. G. Toschi, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 3649–3654.

[41] J. Ayton, R. J. Mailer, A. Haigh, D. Tronson i D. Conlan, *J. Food Lipids* **14** (2006) 138–156.

[42] C. Davis, J. Bryan, J. Hodgson i K. Murphy, *Nutrients* **7 (**2015) 9139–9153.

[43] M. N. Vissers, P. L. Zock i M. B. Katan, *Eur. J. Clin. Nutr.* **58** (2004) 955–965.

[44] M. Dimitriou, L. S. Rallidis, E. V Theodoraki, I. P. Kalafati, G. Kolovou i G. V. Dedoussis, *Public Health Nutr.* **19** (2015) 1–7.

[45] M. Rozati, J. Barnett, D. Wu, G. Handelman, E. Saltzman, T. Wilson, L. Li, J. Wang, A. Marcos, J. M. Ordovás, Y.-C. Lee, M. Meydani i S. N. Meydani, *Nutrition & Metabolism* **12** (2015).

[46] J. López-Miranda, F. Pérez-Jiménez, E. Ros, R. De Caterina, L. Badimón, M. I. Covas, E. Escrich, J. M. Ordovás, F. Soriguer, R. Abiá, C. Alarcón de la Lastra, M. Battino, D. Corella, J. Chamorro-Quirós, J. Delgado-Lista, D. Giugliano, K. Esposito, R. Estruch, J. M. Fernandez-Real, J. J. Gaforio, C. La Vecchia, D. Lairon, F. López-Segura, P. Mata, J. A. Menéndez, F. J. Muriana, J. Osada, D. B. Panagiotakos, J. A. Paniagua, P. Pérez-Martinez, J. Perona, M. A. Peinado, M. Pineda-Priego, H. E. Poulsen, J. L. Quiles, M. C. Ramírez-Tortosa, J. Ruano, L. Serra-Majem, R. Solá, M. Solanas, V. Solfrizzi, R. de la Torre-Fornell, A. Trichopoulou, M. Uceda, J. M. Villalba-Montoro, J. R. Villar-Ortiz, F. Visioli i N. Yiannakouris, *Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain)* 2008, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **20** (2010) 284-294.

[47] M. Z. Tsimidou u D. Bosoku (ur.), Olive Oil Quality, AOCS Press, Champaign, SAD, 2006, str 93–111.

[48] A Kiritsakis, *J. Am. Oil Chem. Soc.***75** (1998) 673–681.

[49] O. Koprivnjak, V. Majetić, K. Brkić Bubola i U. Kosić, *Food Technol. Biotechnol.* **50** (2012) 216–221.

[50] F. Caponio, T. Gomes i A. Pasqualone, *Eur. Food Res. Technol.* **212** (2001) 329–333.

[51] M. Servili i G. Montedoro, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. **104** (2002) 602–613.

[52] A. Kamal-Eldin i L. Appelqvist, *Lipids* **31** (1996) 671–701.

[53] D. Boskou (ur.), *Olive Oil, Chemistry and Technology*, 2nd Edition, AOCS Press, Champaign, SAD, 2006.

[54] F. Luchetti, *Agricultura*, **730** (1993) 384–385.

[55] Commission Regulation (EC) No 1989/2003, amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis., *Off. J. Eur. Union, No L 295/57*, **1999** (1999) 22–25.

[56] International Olive Oil Council, Trade Standard Applying to Olive Oil and Olive-Pomace Oil (2015).

[57] K. S. Minioti i C. A. Georgiou, *Food Chem.* **109** (2008) 455–461.

[58] M. Bonifači (ur.), Maslina i maslinovo ulje visoke kavkoće u Hrvatskoj, Rijeka, 1996.

[59] F. Angerosa, R. Mostallino, C. Basti i R. Vito, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 2940–2944.

[60] K. Brkić Bubola, O. Koprivnjak, B. Sladonja i I. Lukić, *Food Technol. Biotechnol.* **50** (2012) 192-198.

[61] M. Šarolić, M. Gugić, E. Friganović, C. I. G. Tuberoso i I. Jerković, *Molecules*, **20** (2015) 4395–4409.

[62] O. Koprivnjak (ur.), Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola, *MIH*, Poreč, 2006.

[63] S. Panzanaro, E. Nutricati, A. Miceli, i L. De Bellis, *Plant Physiol. Biochem.* **48** (2010) 741–745.

[64] J. M. Olias, A. G. Perez, J. J. Rios i L. C. Sanz, *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993) 2368–2373.

[65] M. N. Padilla, J. M. Martínez-Rivas, A. G. Pérez i C. Sanz, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 6477–6482.

[66] A. De Gregorio, G. Dugo i N. Arena, *J. Food Biochem.* **24** (2000) 417–426.

[67] M. D. Georgalaki, A. Bachmann, T. G. Sotiroudis, A. Porzel i I. Feussner, *JAOCS* **7** (1998) 155-159.

[68] J. J. Salas, J. Sánchez, U. S. Ramli, A. M. Manaf, M. Williams i J. L. Harwood, *Prog. Lipid Res.* **39** (2000) 151–180.

[69] M. Williams, J. J. Salas, J. Sanchez i J. L. Harwood, *Phytochemistry* **53** (2000) 13–19.

[70] J. Salas i J. Sanchez, *Plant Scienc*e **143** (1999) 19–26.

[71] A. G. Pérez, P. Luaces, J. J. Ríos, J. M. García i C. Sanz, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 6544–6549.

[72] J. Salas i J. J. and Sánches, *Phytochemistry* **48** (1998) 35–40.

[73] R. Aparicio i M. T. Morales, *J. Agric. Food Chem*. **46** (1998). 1116–1122.

[74] K. Brkić Bubola, Karakterizacija djevičanskih maslinovih uljaistarskih autohtonih sorti na temelju hlapljivih tvari i senzorskih svojstava, Doktorski Rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011.

[75] J. Reiners i W. Grosch, *J. Agric. Food Chem*. **46** (1998) 2754–2763.

[76] M. N. Criado, M. J. Motilva, T. Ramo i M. P. Romero, C *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **131 (**2006) 593–600.

[77] S. Patui, E. Braidot, C. Peresson, F. Tubaro, M. Mizzau, Z. Rabiei, L. Conte, F. Macrì i A. Vianello, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112** (2010) 780–790.

[78] T. Gallina-Toschi, L. Cerretani, A. Bendini, M. Bonoli-Carbognin i G. Lercker, *J.Sep.Sci.* **28** (2005) 859–870.

[79] M. Šarolić, Karakterizacija ulja dalmatinskih sorti maslina, Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Osijeku, 2014.

[80] K. Brkić Bubola, O. Koprivnjak, B. Sladonja, D. Škevin i I. Belobraji, , *Cro. J. Food Sci. Techn.* **4** (2012) 9–18.

[81] D. Škevin, D. Rade, D. Štrucelj, Ž. Mokrovšak, S. Neđeral i Đ. Benčić, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105** (2003) 536–541.

[82] C. M. Kalua, M. S. Allen, D. R. Bedgood, A. G. Bishop i P. D. Prenzler, *J. Agric. Food Chem*. **53** (2005) 8054–8062.

[83] F. Chem, *J. Agric. Food Chem*. **52** (2004) 7026–7032.

[84] M. Bengana, A. Bakhouche, J. Lozano-Sánchez, Y. Amir, A. Youyou, A. Segura-Carretero i A. Fernández-Gutiérrez, *Food Res. Int.* **54** (2013) 1868–1875.

[85] V. Majetić Germek, O. Koprivnjak, B. Butinar, L. Pizzale, M. Buc i L. S. Conte, *J. Agric. Food Chem.* (2013)

[86] F. Angerosa, M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposto i G. Montedoro, *J. Chromatogr. A* **1054** (2004) 17–31.

[87] F. Kotti, L. Cerretani, M. Gargouri, E. Chiavaro i A. Bendini, *J. Food Biochem.* **35** (2011) 681–698.

[88] A. Sánchez-Ortiz, C. Romero-Segura, C. Sanz i A. G. Pérez, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 812–822.

[89] Ž. Mirela, Utjecaj polifenolnih spojeva na svojstva i oksidacijsku stabilnost djevičanskih maslinovih ulja odabranih autohtonih sorta, Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.

[90] K. Kotsiou i M. Tasioula-Margari, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **117** (2015) 514–522.

[91] F. Angerosa, C. Basti i R. Vito, *Journal of agricultural and food chemistry* **47** (1999) 836–839.

[92] A. Runcio, L. Sorgonà, A. Mincione, S. Santacaterina i M. Poiana, *Food Chem.* **106** (2008) 735–740.

[93] G. Luna, M. T. Morales i R. Aparicio, *Food Chem.* **98** (2006) 243–252.

[94] F. Angerosa i C. Basti, *Ital. J. Food Sci.* **13** (2001) 421–428.

[95] B. Cavaliere, A. De Niro, F. Hayet, A. Lazez, B. Macchione, C. Moncef, E. Perri, G. Sidona i A. Tagarelli, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 1456-1462.

[96] F. Angerosa, R. Mostallino, C. Basti i R. Vito, *Food Chem*. **68** (2000) 283–287.

[97] L. Gašparec-Skočić i V. Milat (ur.), *Maslina i maslinovo ulje, Božji dar u Hrvata*, *Mavi,* Zagreb, 2011.

[98] L. Gallardo-Guerrero, M. Jaren-Galan, D. Hornero-Mendez i M. I. Minguez-Mosquera, *J. Sci. Food Agric.* **83** (2003) 1487–1492.

[99] M. Bradford, *Anal. Biochem*. **72** (1976) 248–254.

[100] B. Axelrod, T. M. Cheesbrough i S. Laakso, *Methods Enzymol.* **71** (1981) 441–452.

[101] Izvještaj "Method: Detrmination of free fatty acids, cold method, COI/T.20/Doc.No.34," Madrid, November 2015.

[102] HR EN ISO 3960:2010, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje peroksidnog broja - Jodometrijsko određivanje točke završetka, 2010.

[103] Izvještaj "Spectrophotometric investigation in the ultraviolet, COI/T.20/Doc.No.19/Rev.3," Madrid, February 2015.

[104] Izvještaj "Determination of biophenols in Olive Oils by HPLC, COI/T.20/Doc.No.29," Madrid, 2009.

[105] M. Contini i M. Esti, *Food Chem.* **94** (2006) 143–150.

[106] M. A. M. El Hadi, F. J. Zhang, F. F. Wu, C. H. Zhou i J. Tao, *Molecules* **18** (2013) 8200–8229.

[107] J. Ayton, R. J. Mailer i K. Robards, *Austr. J. Exp. Agric.* **41** (2001) 815–821.

[108] B. Soldo, M. Šprung, G. Mušac, M. Pavela-Vrančić i I. Ljubenkov, *Molecules* **21** (2016) 506.

[109] E. Kubicka, L. Jedrychowski i R. Amarowicz, *Grasas y Aceites* **50** (1999) 127–130.

[110] W. D. Loomis i J. Battaile, *Phytochemistry* **5** (1966) 423–438.

[111] D. Schiller, C. Contreras, J. Vogt, F. Dunemann, B. G. Defilippi, R. Beaudry i W. Schwab, *Hortic. Res.* **2** (2015) 15003.

[112] S. Liu i B. Han, *BMC Plant Biol.* **10** (2010) 228.

[113] K. Brkić Bubola, O. Koprivnjak, B. Sladonja, D. Škevin, and I. Belobrajić, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114** (2012) 1400–1408.

[114] M. Servili, B. Sordini, S. Esposto, S. Urbani, G. Veneziani, I. Di Maio, R. Selvaggini i A. Taticchi, *Antioxidants* **3** (2013) 1–23.

[115] D. Ryan, M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards i S. Lavee, *Sci. Hortic.* **92** (2002) 147–176.

[116] M. Y. Mousa, D. Gerasopoulos, I. Metzidakis i A. Kiritsakis, *J. Sci. Food Agr.* **71** (1996) 345–350.

[117] A. Gómez-Rico, M. D. Salvador, A. Moriana, D. Pérez, N. Olmedilla, F. Ribas i G. Fregapane, *Food Chem.* **100** (2007) 568–578.

[118] M. Patumi, R. D'Andria, V. Marsilio, G. Fontanazza, G. Morelli i B. Lanza, *Food Chem.* **77** (2002) 27–34.

[119] M. Jess Tovar, M. Paz Romero, J. Girona i M. Jos Motilva, L *J. Sci. Food Agric* **82** (2002) 892–898.

[120] I. Muzzalupo, B. Macchione, C. Bucci, F. Stefanizzi, E. Perri, A. Chiappetta, A. Tagarelli i G. Sindona, *ScientificWorld Journal.* **2012** (2012) 532179.

[121] F. M. Haddada, H. Manai, D. Daoud, X. Fernandez, L. Lizzani-Cuvelier i M. Zarrouk, *Food Chem.* **103** (2007) 467–476.

[122] A. Sánchez-Ortiz, A. G. Pérez i C. Sanz, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 7869–7873.

[123] S. Vichi, L. Pizzale, L. S. Conte, S. Buxaderas i E. Lopez-Tamames, *J. Agric. Food Chem* **51** (2003) 6572–6577.

[124] S. Cevik, G. Ozkan, M. Kiralan i A. Bayrak, *Acta Aliment.* **43** (2014) 526–537.

[125] O. Baccouri, A. Bendini, L. Cerretani, M. Guerfel, B. Baccouri, G. Lercker, M. Zarrouk i D. Daoud Ben Miled, *Food Chem.* **111** (2008) 322–328.

[126] N. Tena, A. Lazzez, R. Aparicio-Ruiz i D. L. Garcia-Gonzalez, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 7852–7858.

[127] M. T. Morales, G. Luna i R. Aparicio, *Food Chem.* **91** (2005) 293–301.

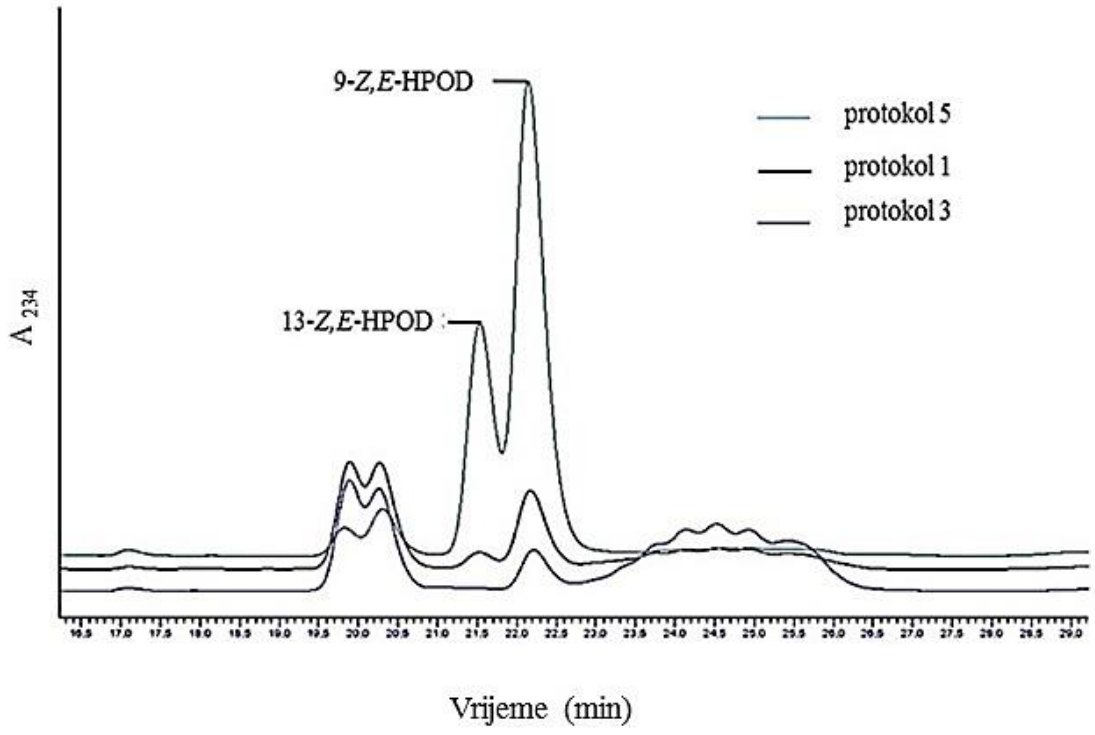
[128] I. Feussner i C. Wasternack, *Annu. Rev. Plant Biol.* **53** (2002) 275–297.

[129] N. Dudareva, A. Klempien, J. K. Muhlemann i I. Kaplan, *New Phytol.* **198** (2013) 16–32.

[130] M. Servili, S. Esposto, E. Lodolini, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Urbani, G. Montedoro, M. Serravalle i R. Gucci, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 6609–6618.

§ 8. DODATAK

Dodatak 1. Kromatogrami primarnih produkata oksidacije linolne kiseline dobiveni korištenjem proteinskih ekstrakata po protokolima Gallardo-Guerrero i sur. (1), Kotti i sur., (3) i Luaces i sur., (5). Najniža količina 9-*Z*,*E*-HPOD produkata i potpuni izostanak 13-*Z*,*E*-HPOD produkata uočava se upotrebom proteinskog ekstrakta izoliranom po protokolu br. 3, slijedi protokol br. 2, dok je najviša količina poželjnih produkata dobije upotrebom proteinskog ekstrakta izoliranog po protokolu br. 5.

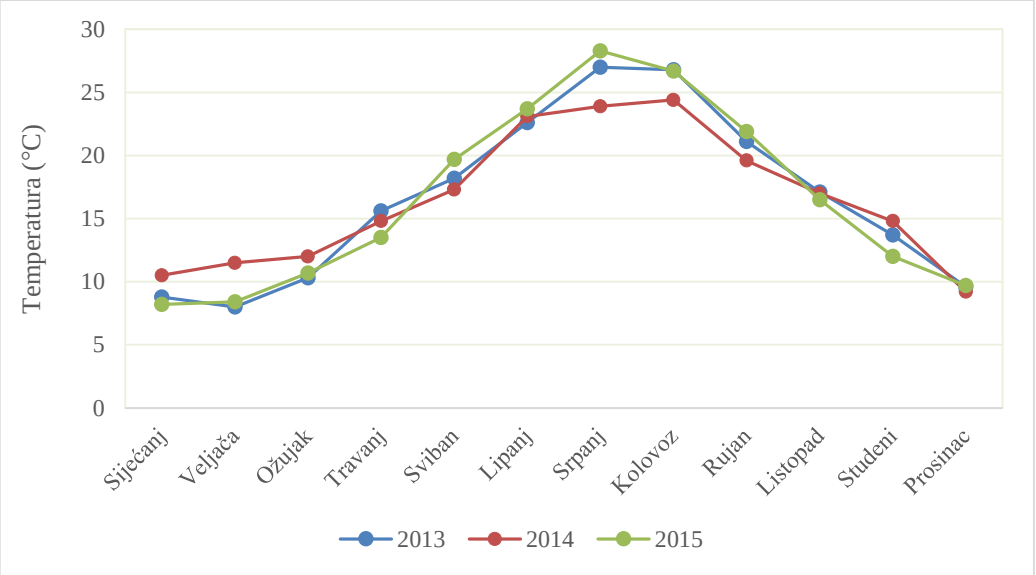


Dodatak 2. Podjela korištenih standarda u značajne skupine hlapljivih tvari.

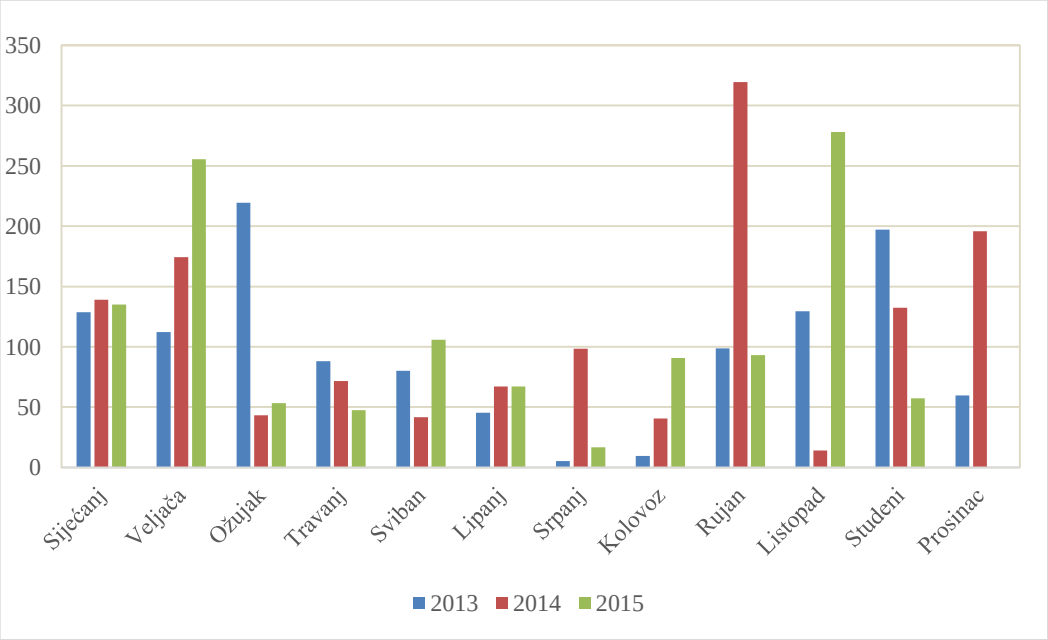
Skupine hlapljivih tvari	Hlapljiva tvar
aldehidi	pentanal
	heksanal
	E-2-heksenal
	oktanal
alkoholi	etanol
	smjesa butanola (butan-2-ol i 3-metil-2-butan-1-ol)
	1-penten-2-ol
	4-metilpenten-2-ol
	heksanol
	E-2-heksen-1-ol
	Z-3-heksen-1-ol
esteri	etil-acetat
	butil-acetat
	etil-butirat
	heksil-acetat
organske kiseline	etanska kiselina
	butanska kiselina
	heksanska kiselina

C_5	pentanal
	1-penten-2-ol
C_6	heksanal
	E-2-heksenal
	heksanol
	E-2-heksen-1-ol
	Z-3-heksen-1-ol
	heksil-acetat

Dodatak 3. Srednja mjesečna temperatura zraka (°C) izmjereni za 2013. i 2015. godinu u meteorološkoj postaji Kaštela, te za 2014. godinu u meteorološkoj postaji Šibenik.



Dodatak 4. Prosječne mjesečne količine oborina (mm) izmjerene za 2013. i 2015. godinu u meteorološkoj postaji Kaštela, te za 2014. godinu u meteorološkoj postaji Šibenik.



§ 9. ŽIVOTOPIS

Barbara Soldo rođena je 10. srpnja 1979. godine u Splitu, gdje je završila Srednju Zdravstvenu školu. Studij biologije i kemije upisuje 1999. godine na fakultetu Prirodoslovno-matematičkih znanosti i odgojnih područja u Splitu. Diplomirala je 2005. godine i stekla akademski naziv Profesor biologije i kemije. Od 2007. godine izabrana je kao znanstveni novak na Odjelu za kemiju, Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Splitu. Pod mentorstvom prof. dr. sc. Maje Pavele Vrančić i doc. dr. sc. Ivice Ljubenkova izradila je doktorsku disertaciju naslova „Utjecaj lipoksigenaze na sastav hlapljivih tvari u maslinovim uljima autohtonih dalmatinskih sorti". Kao znanstveni novak-asistent sudjeluje u izvođenju nastave iz više predmeta u području organske kemije i biokemije.

Znanstvene publikacije:

1. B. Soldo, M. Šprung, G. Mušac, M. Pavela-Vrančić, I. Ljubenkov, „ Evaluation of Olive Fruit Lipoxygenase Extraction Protocols on 9- and 13-*Z,E*-HPODE Formation", Molecules 21, 2016
   DOI:10.3390/molecules21040506

2. M. Šprung, V. Bučević-Popović, B. Soldo, M. Pavela-Vrančić, S.Orhanović, „Influence of subunit interface mutations on kinetic and dynamic properties of alkaline phosphatase from E.coli." , Croatica Chemica Acta. 86, pp 165-170, 2013
   DOI: 10.5562/cca2168

3. V. Bučević Popović, M. Šprung, B. Soldo, M. Pavela-Vrančić „The A9 core sequenc from NRPS adenylation domain is relevant for thioester formation.", ChemBioChem. 13, pp 1913-1920, 2012
   DOI: 10.1002/cbic.201290054

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. V. Bučević-Popović, M. Šprung, B. Soldo, S. Orhanović, M. Pavela-Vranči „Exploring the role of a conserved motif in the adenylation domain of a non-ribosomal peptide synthetase from Bacillus brevis“, Abstract of the 35th FEBS Congres, The FEBS Journal Volume 277, 2010.

2. V. Bučević-Popović, M. Šprung, B. Soldo, Barbara, S. Orhanović, M. Pavela-Vrančić „Exploring the role of a conserved motif in the adenylation domain of a non-ribosomal peptide synthetase from Bacillus brevis“ The Secret Life of Biomolecules, 10th Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Book of abstracts, 2009.

3. M. Šprung, S. Orhanović, V. Bučević-Popović, B. Soldo, M. Pavela-Vrančić „Kinetic and dynamic properties of interface mutants of alkaline phosphatase from E.coli“ Abstract of the 35th FEBS Congres, The FEBS Journal Volume 277, 2010.

4. V. Bučević-Popović, S. Orhanović, M. Šprung, B. Soldo, M. Pavela-Vrančić „Adenylation domain of nonribosomal peptide sythetase - the role of conserved motifs and protein-protein interactions“ Protein interaction modules - FEBS Practical Course. 2009.

5. M. Šprung, V. Bučević-Popović, S. Orhanović, B. Soldo, M. Pavela-Vrančić „Protein-protein interactions between the adenylation and peptidyl carrier domain in tyrocidine sythetase 1“, Supramolecular structure and function, International Summer school on biophysics, Book of abstracts, 2009.

6. S. Orhanović, M. Šprung, V. Bučević-Popović, B. Soldo, M. Pavela-Vrančič „Influence of mutations at the subunit interface on kinetic and dynamic properties of alkaline phosphatise from E. coli“, Book of Abstracts of the HDBMB 2008, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation, 2008.

7. V. Bučević-Popović, S. Orhanović, M. Šprung, B. Soldo, M. Pavela-Vrančič „Adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase-the role of conserved motifs and protein-protein interactions“, Protein interaction modules – FEBS Partical Curse. 2009.

8. V. Bučević Popović, M. Šprung, B. Soldo, S. Orhanović, M. Pavela-Vrančić „Exploring the role of A9 conserved motif in the adenylation domain of tyrocidine synthetase 1from Bacillus brevis“