

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA  
POLIFENOLOKSIDAZE U UZORCIMA KULTIVIRANE  
BOROVNICE**

DIPLOMSKI RAD

IVANA PERVAN

Matični broj: 170

Split, listopad 2017.



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

Diplomski studij kemijske tehnologije

Smjer: Mediteranske kulture

**ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA POLIFENOLOKSIDAZE U  
UZORCIMA KULTIVIRANE BOROVNICE**

DIPLOMSKI RAD

IVANA PERVAN

Matični broj: 170

Split, listopad 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Graduate study of chemical technology

Orientation: Mediteranean cultures

DETERMINATION OF THE POLYPHENOLOXIDASE ENZYME ACTIVITY  
IN CULTIVATED BLUEBERRY

DIPLOMA THESIS

IVANA PERVAN

Parent number: 170

Split, October 2017.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### DIPLOMSKI RAD

**Sveučilište u Splitu**

**Kemijsko – tehnološki fakultet Split**

**Diplomski studij kemijskog inženjerstva**

**Smjer: Mediteranske kulture**

**Znanstveno područje: biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: prehrambena tehnologija**

**Tema rada** je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko – tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Prof. dr. sc. Tea Bilušić

**Pomoć pri izradi:** Doc. dr. sc. Franko Burčul

#### **ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA POLIFENOLOKSIDAZE U UZORCIMA KULTIVIRANE BOROVNICE**

Ivana Pervan, Matični broj:170

**Sažetak:** Fenolni spojevi su ključni za prehrambena i organoleptička svojstva hrane poput boje, okusa, mirisa te njenog učinka na zdravlje čovjeka. Borovnice se smatraju jednim od najvažnijih prirodnih izvora polifenolnih spojeva među kojima dominiraju antocijani. Ovi visokovrijedni spojevi nalaze se najvećim dijelom u kožici ploda pa je njihova biodostupnost potrošačima velika. Borovnice, kao voće koje je izrazito bogato fenolnim spojevima, izuzetno su podložne procesu enzimskog posmeđivanja što znatno umanjuje njihovu nutritivnu vrijednost i skraćuje period konzumacije. U ovom radu uspoređen je utjecaj različitih tehnika obrade uzoraka borovnice na aktivnost enzima polifenoloksidaze, koji je odgovoran za proces posmeđivanja. Uspoređena je aktivnost enzima polifenoloksidaze u uzorcima svježe borovnice, uzorcima podvrgnutima termičkoj obradi – pasterizacija, liofiliziranim uzorcima te uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta. Aktivnost enzima polifenoloksidaze određena je uz pomoć brze spektrofotometrijske metode. Aktivnost enzima polifenoloksidaze pokazala se najnižom u liofiliziranim uzorcima borovnice što znači da je taj proces optimalan za očuvanje stabilnosti biološki aktivnih spojeva iz borovnice.

**Ključne riječi:** borovnica, polifenoloksidaza, fenoli, antocijani

**Rad sadrži:** 27 stranica, 8 slika, 3 tablice, 17 literaturnih izvora

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:** 1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

2. Doc. dr. sc. Franko Burčul

3. Prof. dr. sc. Tea Bilušić - mentor

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko – tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### DIPLOMA THESIS

**University of Split**

**Faculty of Chemistry and Technology**

**Graduate study of Chemical Technology**

**Orientation: Mediteranean Cultures**

**Scientific area: Biotechnical sciences**

**Scientific field: Food technology**

**Thesis subject** was approved by 21th Faculty Council of Chemistry and Technology

**Mentor:** Tea Bilušić, PhD, Full professor

**Technical assistance:** Franko Burčul, PhD, Assistant professor

#### DETERMINATION OF THE POLYPHENOLOXIDASE ENZYME ACTIVITY IN CULTIVATED BLUEBERRY

Ivana Pervan, Parent number:170

**Abstract:** Phenolic compounds are crucial for nutritional and organoleptic food traits, such as colour, taste, odour and due to their impact on human health. Blueberries are considered as one of the most important natural sources of polyphenolic compounds, amongst which anthocyanins are found as dominant ones. These valued compounds can mostly be found in the fruit membrane, which makes them being easily accessible to the consumers. Due to the fact that they are extremely rich in phenolic compounds, blueberries are susceptible to becoming brown by enzymatic activity, which leads to decreasing their nutritional value and shelf-life. This thesis compares the effect of different techniques of processing blueberry samples on the activity of polyphenoloxidase enzyme, which is responsible for the process of enzymatic browning. The activity of polyphenoloxidase enzyme in fresh blueberry samples which were subjected to thermal treatment such as pasteurization, is compared to lyophilized samples and to ones which were treated with high intensity ultrasound. Activity of polyphenoloxidase enzyme was determined by quick spectrophotometric method. It has been shown that the activity of polyphenoloxidase enzyme is the lowest in lyophilized blueberry samples, which makes that process optimal for preserving stability of biologically active compounds from blueberry.

**Keywords:** blueberry, polyphenoloxidase, phenolics, anthocyanins

**Thesis contains:** 27 pages, 8 figures, 3 tables, 17 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** 1. Ivana Generalić Mekinić, PhD, Assistant professor

2. Franko Burčul, PhD, Assistant professor

3. Tea Bilušić, PhD, Full professor - mentor

**Printed and electronic (PDF format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33.

Rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko – tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Tee Bilušić u veljači 2017. godine.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Tei Bilušić na posvećenom vremenu, razumijevanju i stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem i mag. nutr. Nikolini Liović s Katedre za hranu i prehranu, Fakulteta za menadžment u turizmu i ugostiteljstvu iz Opatije na suradnji i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela mog diplomskog rada.*

*Veliko hvala doc. dr. sc. Franku Burčulu na nesebičnoj pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog rada.*

*Hvala mojoj obitelji, dečku, prijateljima i kolegama na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog studija.*



## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Cilj rada bio je izolirati enzim polifenoloksidazu ekstrakcijom iz uzoraka kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) te odrediti aktivnost enzima.

Aktivnost enzima polifenoloksidaze određena je u uzorcima svježih plodova borovnice u odnosu na plodove koji su podvrgnuti procesu termičke obrade (pasterizacija), postupku liofilizacije te tretmanu ultrazvukom visokog intenziteta. Aktivnost enzima polifenoloksidaze određena je spektrofotometrijski.

## SAŽETAK

Fenolni spojevi su ključni za prehrambena i organoleptička svojstva hrane poput boje, okusa, mirisa te njenog učinka na zdravlje čovjeka. Borovnice se smatraju jednim od najvažnijih prirodnih izvora polifenolnih spojeva među kojima dominiraju antocijani. Ovi visokovrijedni spojevi nalaze se najvećim dijelom u kožici ploda pa je njihova biodostupnost potrošačima velika. Borovnice, kao voće koje je izrazito bogato fenolnim spojevima, izuzetno su podložne procesu enzimskog posmeđivanja što znatno umanjuje njihovu nutritivnu vrijednost i skraćuje period konzumacije.

U ovom radu uspoređen je utjecaj različitih tehnika obrade uzoraka borovnice na aktivnost enzima polifenoloksidaze, koji je odgovoran za proces posmeđivanja. Uspoređena je aktivnost enzima polifenoloksidaze u uzorcima svježe borovnice, uzorcima podvrgnutima termičkoj obradi – pasterizacija, liofiliziranim uzorcima te uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta. Aktivnost enzima polifenoloksidaze određena je uz pomoć brze spektrofotometrijske metode. Aktivnost enzima polifenoloksidaze pokazala se najnižom u liofiliziranim uzorcima borovnice što znači da je taj proces optimalan za očuvanje stabilnosti biološki aktivnih spojeva iz borovnice.

*Ključne riječi:* borovnica, polifenoloksidaza, fenoli, antocijani

## **ABSTRACT**

Phenolic compounds are crucial for nutritional and organoleptic food traits, such as colour, taste, odour and due to their impact on human health. Blueberries are considered as one of the most important natural sources of polyphenolic compounds, amongst which anthocyanins are found as dominant ones. These valued compounds can mostly be found in the fruit membrane, which makes them being easily accessible to the consumers. Due to the fact that they are extremely rich in phenolic compounds, blueberries are susceptible to becoming brown by enzymatic activity, which leads to decreasing their nutritional value and shelf-life.

This thesis compares the effect of different techniques of processing blueberry samples on the activity of polyphenoloxidase enzyme, which is responsible for the process of enzymatic browning. The activity of polyphenoloxidase enzyme in fresh blueberry samples which were subjected to thermal treatment such as pasteurization, is compared to lyophilized samples and to ones which were treated with high intensity ultrasound. Activity of polyphenoloxidase enzyme was determined by quick spectrophotometric method. It has been shown that the activity of polyphenoloxidase enzyme is the lowest in lyophilized blueberry samples, which makes that process optimal for preserving stability of biologically active compounds from blueberry.

*Key words:* blueberry, polyphenoloxidase, phenolics, anthocyanins

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2. OPĆI DIO</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1. Uloga voća u prehrani	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2. Nutritivna i zdravstvena vrijednost borovnice	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3. Enzim polifenoloksidaza u voću	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3.1. Metode inhibicije aktivnosti enzima polifenoloksidaze	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1. Kemikalije	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2. Uređaji	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3. Materijali i obrada uzoraka	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4. Ekstrakcija (izolacija) polifenoloksidaze	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.5. Određivanje aktivnosti enzima polifenoloksidaze	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4. REZULTATI</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## 1. UVOD

Hrana i prehrana proučavaju se otkad je čovjeka. Puno je odgovorenih pitanja, temeljne postavke su poznate, no još je veći broj neodgovorenih pitanja. Pogledi na hranu i prehranu danas dobivaju novu dimenziju pa je posebno zanimljiva nova hrana na tržištu, označena primjerice kao funkcionalna, organska ili ekološka hrana. Svi trendovi kreću se u smjeru otkrivanja veze između sastojaka hrane i njihove uloge u organizmu, odnosno njihovom utjecaju na zdravlje ili bolest.<sup>1</sup>

Sve je očiglednija veza između prehrane i zdravlja. Suvremena proizvodnja i prerada hrane nude tržištu brojne namirnice koje s nutritivnog i zdravstvenog stajališta nisu zadovoljavajuće. Sve više se konzumira prerađena i tzv. instant hrana iz koje su uklonjeni važni sastojci kao što su vitamini, minerali, biljna vlakna i drugi. Smatra se da su konzumacija prerađene hrane, hrane koja ima nizak sadržaj biljnih vlakana i sve češća upotreba masti jedni od najznačajnijih faktora za nastanak velikog broja bolesti suvremene civilizacije. Iz tog razloga se sve češće savjetuje veća konzumacija svježeg voća i povrća koje obiluje biološki aktivnim tvarima. Fitokemikalije u svježem voću i povrću značajne su kao produkti metabolizma biljaka, a vrlo važnu ulogu imaju u ljudskoj prehrani jer ostvaruju funkcije zaštite organizma i jačanja imuniteta. Danas su prisutna vrlo opsežna istraživanja antioksidativnih svojstava voća i povrća. Brojni znanstvenici tvrde da konzumacijom hrane bogate antioksidansima pomažemo organizmu u obrani od različitih bolesti koje uzrokuju slobodni radikali.<sup>2</sup>

Bobičasto voće je jedan od neprocjenjivih darova prirode jer obiluje vrlo važnim fitokemikalijama koje su neophodne za dobro zdravlje. Širok je spektar načina upotrebe ovih plodova, od konzumacije svježih, do njihove prerade i priprave sokova, kompota, džemova, itd. No, kod bobičastog voća vrijedi pravilo: najvrijednije i najiskoristivije za organizam je svježe ubrano i u sirovom obliku.

Borovnica je prvak u sadržaju antioksidansa među svim voćem (druga antioksidansima najbogatija vrsta hrane prema ORAC testu), a većina antioksidansa nalazi se u kožici ploda što povećava biodostupnost antioksidansa onomu tko je konzumira.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Uloga voća u prehrani

Kvaliteta hrane mjeri se nutritivnim atributima kao što je energetska vrijednost, sastav biološki aktivnih komponenti (fitokemikalija), esencijalnih i neesencijalnih nutrijenata i dr. U novije vrijeme, voće i povrće postaju predmet brojnih znanstvenih istraživanja, koja u velikoj mjeri potvrđuju njihovu svestranu prehrambenu vrijednost.

Makro- i mikronutrijenti voća i povrća su produkti metabolizma biljnih vrsta. Primarne komponente metabolizma biljaka su makronutrijenti: ugljikohidrati, masti, bjelančevine, dok sekundarni metaboliti nisu dio glavnog metabolizma, ali imaju značajne funkcije u zaštiti biljaka od bolesti i stresa izazvanog utjecajima iz okoline. Istovremeno ovi spojevi igraju važnu ulogu u ljudskoj prehrani jer ostvaruju funkcije zaštite organizma i jačanja imuniteta.<sup>3</sup>

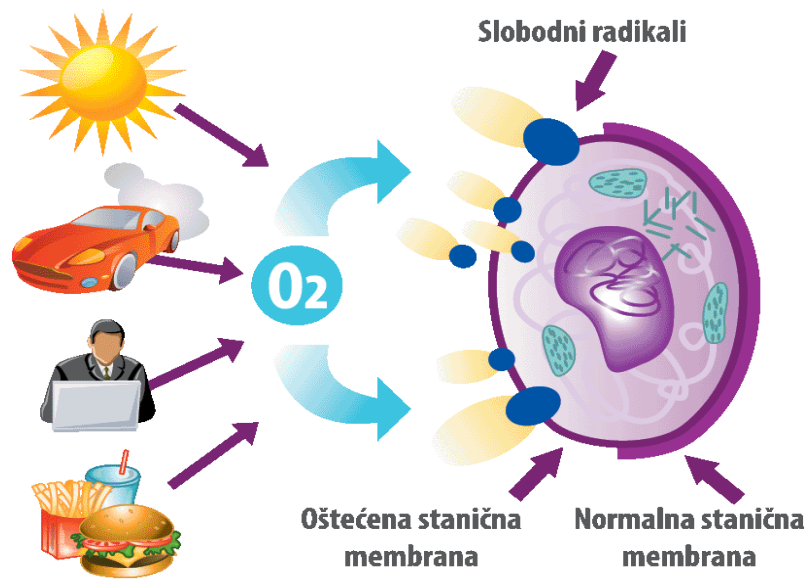
Svježe voće ima relativno malu energetska vrijednost (izuzev banane i orašastih plodova), a s druge strane ima visok sadržaj vode (izuzev orašastog voća). Voće je dobar izvor tekućine za organizam, a voda pomaže i kod izlučivanja probavnih sokova i enzima tijekom probave hrane. Visok sadržaj vode (80–95%) i osjetljivo tkivo voća pogoduju mikrobiološkom kvarenju pa je rok trajnosti svježeg voća često ograničen i relativno kratak.

Voće je bogato različitim ugljikohidratima (do 20%), počevši od jednostavnih šećera kao što su glukoza i fruktoza pa sve do složenijih ugljikohidrata: celuloze, hemiceluloze, inulina i drugih. Ugljikohidrati su značajan izvor energije u dijetetskoj prehrani jer se sporije resorbiraju u probavnom traktu, a posebno u odnosu na većinu slatkih industrijski dobivenih prehrambenih proizvoda. Zbog toga se svježe voće preporučuje u dijetama kod različitih bolesti, kao što su bolesti krvožilnog sustava, dijabetesa, visokog tlaka itd. U tom pogledu značajnu ulogu imaju i sirova biljna vlakna iz voća: celuloza, hemiceluloza, škrob, pektini, gume, sluzi i dr.<sup>3</sup>

U voću je prisutan relativno mali sadržaj proteina i lipida. Zato se svježe voće i povrće smatra uglavnom ugljikohidratnom hranom. Orašasti plodovi razlikuju se od drugog voća zbog toga što imaju značajnu energetska vrijednost te obiluju mastima i proteinima što im daje visoku kaloričnost.

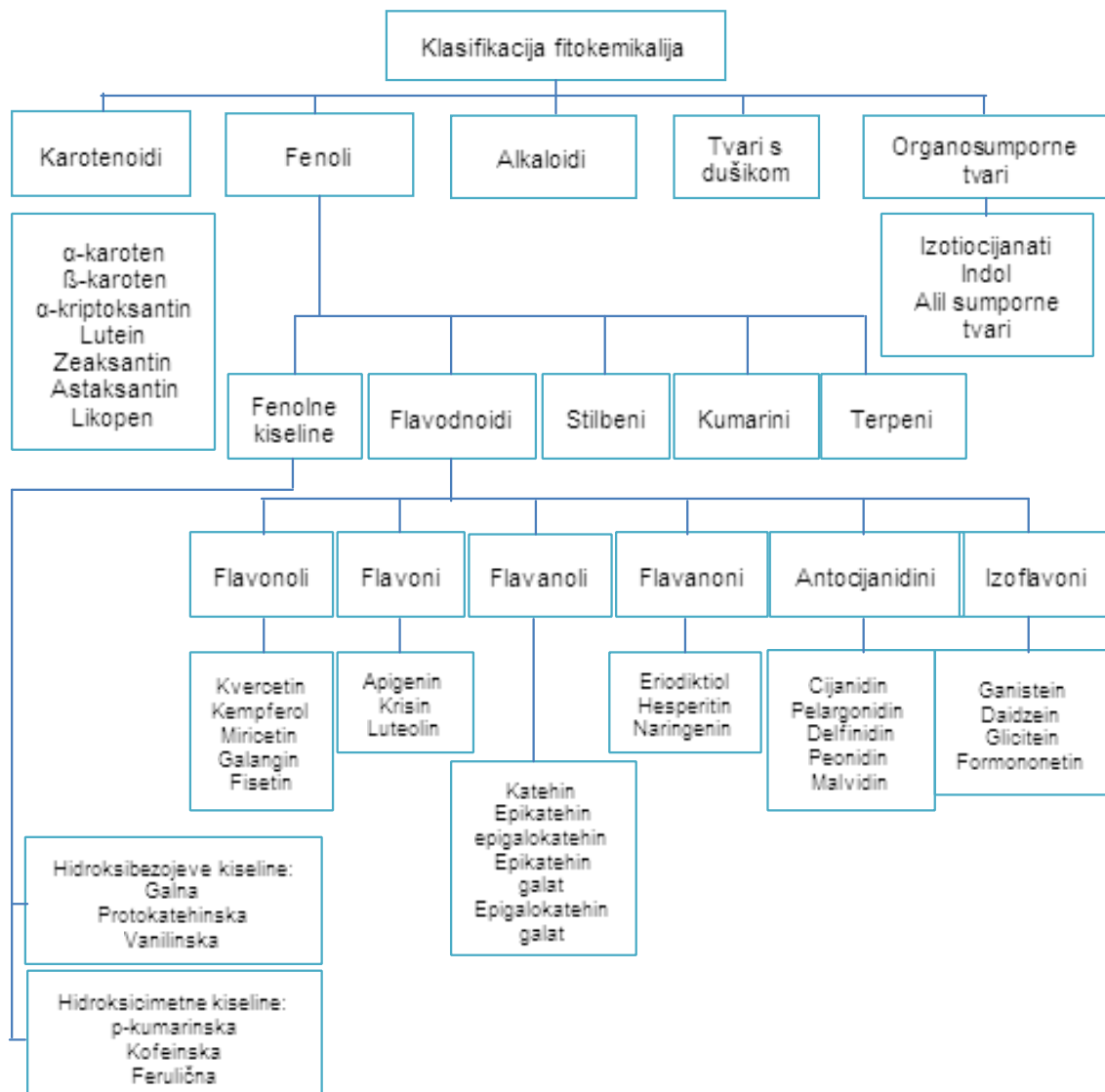
Voće je bogato voćnim kiselinama (jabučna, vinska, limunska) koje mu daju osvježavajući okus.

Fitokemikalije postaju sve značajniji nutritivni atribut hrane, što voće stavlja na vrh ljestvice pravilne prehrane. Tu se prije svega ubrajaju: minerali, vitamini, enzimi, voćne kiseline, klorofili, karotenoidi, polifenoli, betalaini, različiti glikozidi, alkaloidi, izotiocijanati, kapsaicin, terpeni, fitosteroli i drugi mikronutrijenti, a svi su od izuzetnog značaja za zdravlje. Pozitivna djelovanja navedenih spojeva koja su opisana u znanstvenim istraživanjima obuhvaćaju: antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotonično, antialergijsko, antiulkusno, analgetsko, antimalarično i hipoglikemijsko djelovanje. Neke fitokemikalije su dokazano značajni antioksidansi.<sup>3</sup> Antioksidansi su tvari koje mogu odgoditi, zaustaviti ili spriječiti oksidacijsko kvarenje hrane na način da doniraju slobodan elektron ili vodikove atome slobodnim radikalima. Zaustavljanje oksidacije je od izuzetnog značaja za pojedine prehrambene proizvode te se ono može spriječiti uklanjanjem kisika, upotrebom niskih temperatura, inaktivacijom enzima koji kataliziraju oksidaciju, upotrebom prikladne ambalaže i inhibitora oksidacije (aditiva).<sup>1</sup> Najpoznatiji su vitamin C i E,  $\beta$ -karoten, enzimi, minerali (Se i Zn), polifenolni spojevi i drugi. Danas se provode vrlo opsežna istraživanja antioksidativnih svojstava voća i povrća. Antioksidansi u ljudskoj prehrani ostvaruju funkcije zaštite organizma i jačanja imuniteta, a konzumacija hrane bogate antioksidansima pomaže organizmu u obrani od različitih bolesti.<sup>3</sup>



**Slika 1.** Oštećenja stanice uslijed djelovanja izvora slobodnih radikala<sup>4</sup>





**Slika 2.** Klasifikacija fitokemikalija<sup>1</sup>

## 2.2. Nutritivna i zdravstvena vrijednost borovnice



**Slika 3.** Plodovi borovnice<sup>5</sup>

Borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) je grmolika biljka iz porodice vrijesova (lat. *Vacciniaceae*) koja daje jestive plodove u obliku tamnoplavih boba. Najveći proizvođač borovnice u svijetu su Sjedinjene Američke Države odakle ova vrsta i potječe.

Grane biljke su zelene i oštroidne, a obrasle su ovalnim zašiljenim listovima s kratkim peteljka. Početkom ljeta se iz kuglastih cvjetića razvijaju crno-plave bobice veličine graška. Cvjetovi sadrže i muške i ženske spolne organe, odnosno i tučak i prašnike. Borovnica je višegodišnja biljka koja je plodonosna u periodu od šest do trideset godina pa je zbog toga i jako ekonomski isplativa. Biljka dolazi na rod tijekom ljetnih mjeseci, a branje se vrši 2 do čak 5 puta.<sup>6</sup>

Kod borovnice su osim plodova ljekoviti i listovi, ali i korijen. Iako je borovnicu najbolje konzumirati u svježem stanju, često se prerađuje u džemove, sokove, koncentrate, a koristi se i u pekarstvu te konditorskoj industriji itd.

Sadržaj šećera u plodovima borovnice je u prosjeku oko 5%, a kod sušenih borovnica naraste do 30%. Bobice sadrže 85% vode, oko 0,7% proteina, do 0,4% masti i 2,7% vlakana. Od minerala ima najviše kalija (89 mg/100 g), a od ostalih dosta fosfora, magnezija i kalcija (do 10 mg/100 g).<sup>1</sup>

U Tablici 1. prikazan je kemijski sastav ploda borovnice.

**Tablica 1.** Hranjive (nutritivne) vrijednosti ploda borovnice<sup>7</sup>

Voda (g)	124,63
Vlakna (g)	3,6
Ugljikohidrati (g)	21,45
Proteini (g)	1,1
Masti (g)	0,49
Vitamin C (mg)	124,63
Folat (µg)	9
Vitamin A (µg)	4
Vitamin K (µg)	28,6
Kalcij (mg)	9
Magnezij (mg)	9
Fosfor (mg)	18
Kalij (mg)	114
Natrij (mg)	1

Mnogi nutricionisti smatraju flavonoide najzanimljivijom skupinom biološki aktivnih spojeva koja se prirodno pojavljuje u hrani. Hrana koja je ovim spojevima, poput borovnice, smatra se funkcionalnom hranom, a mnogi dokazi govore o tome kako njezina konzumacija iznimno pozitivno utječe na ljudsko zdravlje. Fenolni spojevi imaju sposobnost smanjenja oksidativnog oštećenja nastalog djelovanjem slobodnih radikala koje se povezuje s nastankom različitih oboljenja.<sup>8</sup>

Borovnice su jedan od najbogatijih izvora fenola i sadrže značajne količine antocijana, flavanola i fenolnih kiselina odnosno brojnih spojeva koji imaju visoku biološku aktivnost. Dominanti fenolni spojevi u bobicama borovnice su flavonoidi, a tipična modro-plava boja ploda borovnice potječe od prisutne podskupine flavonoida-antocijana.

Antocijani u borovnici:

- Malvidin (ljubičasta boja)
- Petunidin (plavo-ljubičasta boja)
- Delfinidin (ljubičasta boja)
- Cijanidin (crvena boja)

Antocijani su biljni pigmenti topljivi u vodi, vrlo nestabilni tijekom prerade i skladištenja. Na njihovu stabilnost ponajprije utječu pH, temperatura, aktivitet vode, kisik, svjetlost, enzimi, ali i njihova koncentracija te njihova struktura.<sup>9</sup>

### **2.3. Enzim polifenoloksidaza u voću**

Tijekom čuvanja i prerade prehrambenih proizvoda dolazi do različitih, poželjnih ili nepoželjnih promjena boje namirnica. Ovim promjenama je posebno podložno voće i povrće. Promjena boje (posmeđivanje) do koje dolazi za vrijeme prerade i čuvanja voća i povrća ili proizvoda od voća i povrća može biti enzimska ili neenzimska. U biljnom tkivu prisutni su tzv. autohtoni enzimi kao sastavni dio stanice. Endogeni (autohtoni) enzimi mogu imati korisne i štetne posljedice djelovanja, a oni imaju utjecaj na:

- starenje i kvarenje voća i povrća nakon branja
- oksidaciju fenolnih spojeva fenolazom, što dovodi do tamnjenja-posmeđivanja
- razgradnju pektinskih tvari nakon berbe, što vodi ka omekšavanju za vrijeme sazrijevanja<sup>10</sup>

Voće i povrće tijekom transporta, skladištenja i konzerviranja dolaze u dodir sa brojnim tvarima koje ne ulaze u njihov sastav. Gotovo je neizbježan kontakt sa kisikom iz zraka pri čemu može doći do oksidacije spojeva koji su podložni oksidaciji. Kisik može biti prisutan i u biljnom tkivu ili može nastati kao produkt njegovog raspadanja. Oksidacijski procesi nisu poželjni jer dovode do smanjenja biološke i nutritivne vrijednosti voća i povrća.

Općenito, oksidacije u voću i povrću mogu se svrstati u:

- autooksidacije (bez katalizatora-enzima)
- oksidacije katalizirane metalnim ionima
- oksidacije katalizirane enzimima.

Oksidacije katalizirane enzimima odvijaju se veoma brzo, a nepoželjne promjene boje mogu se zapaziti u vremenu od nekoliko minuta do nekoliko sati. Nepoželjni oksidacijski procesi započinju nakon oštećenja ili uništenja žive stanice. Tom prilikom dolazi do narušavanja normalne ravnoteže enzima i do njihove dezorganizacije u stanici.<sup>10</sup> Kod enzimskog posmeđivanja voća i povrća, kao i njihovih prerađevina, najznačajniji je enzim

polifenoloksidaza. Ovaj enzim sadrži bakar kao prostetsku skupinu, a poznat je pod drugim imenima kao npr. katehol oksidaza, *o*-difenolaza, fenolaza i PPO.<sup>11</sup>

Enzimsko posmeđivanje predstavlja negativnu pojavu koja je vezana za promjenu boje i sastava voća i povrća kojemu je, na bilo koji način, narušena osnovna struktura (primjenom postupaka guljenja, rezanja, drobljenja) ili stanje ravnoteže. Promjena boje je kompleksan proces tijekom kojeg se monofenolni spojevi, uz prisustvo polifenoloksidaze i kisika, hidrosiliraju u difenole, koji se kasnije oksidiraju do *o*-kinona. Nastali kinoni su jako reaktivni i u neenzimskim reakcijama s fenolnim spojevima, aminokiselinama, itd. daju smeđe do crno obojene melanoidne pigmente. Za ove procese je zajedničko da započinju kontaktom između fenolnih spojeva smještenih u vakuolama i enzima smještenih u citoplazmi, do kojeg dolazi tek kada je narušena stanična struktura.<sup>10</sup>

Za odvijanje procesa enzimskog posmeđivanja neophodno je prisustvo određenog supstrata na kojeg djeluju enzimi. Supstrati PPO u reakcijama enzimskog posmeđivanja su monofenoli, odnosno difenoli s hidroksilnim skupinama u *orto*, odnosno u *para* položaju.

Fenolni spojevi su važni za postizanje arome i boje proizvoda od voća i povrća (sokovi, vina, itd.). Zahvaljujući svojim antioksidacijskim svojstvima imaju antikancerogeno djelovanje, a neki zbog mehanizma zaštite od oksidacije pojedinih lipoproteina, sprječavaju oboljenja srca. Fenolni spojevi, također, mogu imati i negativan učinak, osobito kod proizvoda od voća i povrća (sokovi, vina, minimalno procesirano voće i povrće) gdje mogu sudjelovati u tvorbi nepoželjnih taloga, odnosno žutih i smeđih pigmenata. Boja, trpkost, gorčina i aroma su svojstva koja ovise o sadržaju fenolnih tvari.<sup>10</sup>

### 2.3.1. Metode inhibicije aktivnosti enzima polifenoloksidaze

Brzina reakcija enzimskog posmeđivanja ovisi o sadržaju polifenoloksidaze, sadržaju i tipu fenolnih tvari, pH, temperaturi i kisiku. Za sprječavanje tih reakcija uglavnom se primjenjuju metode koje su usmjerene na inhibiranje i prevenciju djelovanja enzima polifenoloksidaze, ali i uklanjanje komponenti koje su neophodne za odvijanje reakcija (kisika, enzima, bakra ili supstrata). Inhibicija enzimskog posmeđivanja općenito nastupa direktnom inhibicijom polifenoloksidaze, neenzimskom redukcijom *o*-kinona i kemijskom modifikacijom ili uklanjanjem fenolnog supstrata polifenoloksidaze.<sup>12</sup>

#### Inhibicija usmjerena prema enzimima

PPO može na više načina djelovati u cilju sprječavanja enzimskog posmeđivanja:

- Termičko tretiranje (inaktivacija)
- Reakcije s tvarima koje stvaraju komplekse s bakrom kao aktivnim središtem: halidi, cijanidi, CO<sub>2</sub>, natrij dierilditio-karbamat, azidi, aminokiseline, peptidi, proteini, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alkoholi
- Reakcije sa spojevima strukture sličnim supstratima
- Djelovanje sa spojevima koje snizuju pH.

#### *Termička inaktivacija:*

Inaktiviranje enzima je najpoznatiji i najčešći postupak. Djelovanjem topline u sekundarnoj ili terciarnoj strukturi molekule enzima utječe na katalitičku aktivnost enzima. Primjena visokih temperatura povezana je sa negativnim promjenama arome, teksture i boje prehrambenih proizvoda. Učinak topline na aktivnost PPO je veoma različit s obzirom na izvor PPO.<sup>13</sup>

Enzimsko posmeđivanje može biti kontrolirano u nekom voću i povrću blanširanjem pri čemu se inaktivira PPO. Ovo je najpoznatiji i najčešće primjenjivani postupak inaktiviranja enzima.<sup>10</sup>

Blanširanje se provodi u rasponu od 70 do 105 °C i više, dok se pasterizacija općenito koristi u temperaturnom rasponu od 60 do 85 °C. Blanširanje je termički postupak koji ima široku primjenu u obradi voća i povrća, ali zbog visoke temperature tijekom blanširanja dolazi do gubitka vitamina, boje, arome, ugljikohidrata i drugih u vodi

topljivih tvari. Temperature blanširanja ovise o termostabilnosti enzima i o prirodi same namirnice.<sup>13</sup>

Konzerviranje sušenjem (dehidratacijom) osigurava mikrobiološku i enzimsku stabilnost proizvoda, ali tijekom procesa dolazi do gubitka vitamina, pojave oksidacije, gubitka hlapljivih tvari, itd. Zbog navedenih nedostataka takvi se postupci zamjenjuju manje invazivnim metodama, kao što su sušenje zamrzavanjem (liofilizacija) i osmotska dehidratacija.

Hlađenje podrazumijeva privremeno skladištenje hrane na temperaturama iznad točke smrzavanja te se kao proces općenito postiže uz korištenje hladnog zraka, vode, leda ili vakuuma. Čuvanje i skladištenje pri niskim temperaturama tijekom distribucije i maloprodaje su neophodni za prevenciju posmeđivanja u voću, povrću i morskim plodovima, budući da su temperature hlađenja učinkovite u smanjenju aktivnosti PPO.<sup>13</sup>

Budući da uslijed termičkog tretiranja hrane dolazi do znatnih promjena organoleptičkih svojstava, odnosno njenog sastava, sve više se radi na pronalasku metoda konzerviranja gdje bi se reducirala primjena topline. To su metode u kojima se kombinira utjecaj topline, ultrazvuka i povišenog tlaka na aktivnost polifenoloksidaze. Učinak ultrazvuka na enzimsku aktivnost znatno raste sa porastom amplitude ultrazvučnih valova: vrijeme decimalne redukcije, pri konstantnoj temperaturi opada logaritamski sa porastom amplitude.<sup>10</sup>

*Reakcije sa spojevima koje stvaraju komplekse s bakrom kao aktivnim središtem u enzimu:*

Spojevi koji imaju svojstvo stvaranja kelata s bakrom se mogu koristiti u svrhu sprječavanja posmeđivanja, budući da su esencijalni za aktivnost PPO.

Halidi su značajni inhibitori PPO, vežu se na bakar u aktivnom mjestu enzima i tako smanjuju njegovu dostupnost. pH ima značajan utjecaj na inhibiciju halida zbog interakcije između negativnog naboja inhibitora i pozitivnog naboja imidazolne skupine u aktivnom središtu PPO. Optimalni pH za inhibiciju je 3,5 do 5,0.

Neka sredstva koja se koriste za haliranje su CaCl<sub>2</sub>, NaCl, askorbinska kiselina, sorbinska kiselina, karboksilne kiseline (limunska, jabučna, vinska, oksalna kiselina), makromolekule (porfirini, proteini, polisaharidi), EDTA.

L-cistein je djelotvoran inhibitor enzimskog posmeđivanja. Koncentracije cisteina i drugih tiolnih spojeva potrebnih za postizanje prihvatljive razine inhibicije posmeđivanja ipak su pokazale da imaju negativne učinke na okus. Inhibicija sa cisteinom smatra se posljedicom formiranja bezbojnih tiol-konjugiranih *o*-kinona. Cistein je također pokazao sposobnost da reducira *o*-kinone u njihove fenolne prekursore.<sup>13</sup>

#### *Djelovanje s tvarima koje snizuju pH:*

Aktivnost PPO ovisi o izvoru enzima i o supstratu, pH se kreće između 6 i 7. Enzimi ne pokazuju aktivnost pri pH vrijednosti ispod 4, dok je enzim potpuno inaktivan kod pH vrijednosti ispod 3. Limunska, askorbinska, jabučna i vinska kiselina se koriste u cilju sprječavanja enzimskog posmeđivanja sa sniženom pH vrijednosti.<sup>13</sup>

#### Djelovanje na supstrate

Inhibicija usmjerena prema supstratima podrazumijeva uklanjanje kisika procesiranjem (primjena vakuuma, potapanje u vodi ili sirupu) ili primjenom reducirajućih sredstava (askorbinske kiseline, eritorbinske kiseline, propil galata, butiliranog hidroksianisola, butiliranog hidroksitoluena). Inhibicija supstrata uklanjanjem fenola podrazumijeva stvaranje kompleksa s odgovarajućim spojevima (ciklodekstrini, ciklosan, polisaharidi sa sumporom) ili enzimskom modifikacijom fenola (metiltransferaze, protokatehual 3,4-dioksidogeneze).

Inhibicija usmjerena prema produktima ostvaruje se primjenom reducirajućih sredstava (sulfiti, askorbinska kiselina i analozi, cistein i druge tiolne tvari), aminokiselina, peptida, proteina, citosana. Reducirajuća sredstva reagiraju s produktima oksidacije PPO i sprječavaju nastajanje obojenog produkta, odnosno neenzimskog dijela reakcije koji rezultira nastajanjem melanina. Nazivaju se reducirajućim sredstvima budući da drže supstrat u reduciranom obliku.<sup>14</sup>

#### Djelovanje na kisik

Obzirom da je jedan od uvjeta nastanka posmeđivanja prisustvo kisika, da bi se spriječilo nastajanje smeđe boje treba ukloniti uzrok koji dovodi do njenog nastanka. To znači da treba ukloniti kisik, a to se može učiniti na više načina. Neki od njih su potapanje svježeg



voća i povrća u vodu ili u otopine kiselina (limunske, askorbinske), otopinu šećera ili kuhinjske soli, pakiranje u vakuumu, u modificiranoj atmosferi, itd.<sup>10</sup>

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Kemikalije**

Prilikom izrade ovog rada korištene su slijedeće kemikalije:

- katehol (1,2-dihidroksi-benzen)
- detergent triton X-100
- poli(vinilpoli-pirolidon) (PVPP)

Navedene kemikalije pribavljene su od tvrtke Sigma – Aldrich, Steinheim, Njemačka.

Ostale korištene kemikalije:

- natrijev- klorid (NaCl)
- natrijev- hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- natrijev- dihidrogenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- natrijev fosfatni pufer 0,2 M (pH = 6,5)
- natrijev fosfatni pufer 0,05 M (pH = 6,5)

Navedene kemikalije pribavljene su od tvrtke Kemika, Zagreb, Hrvatska ili pripravljene u laboratoriju. Sve kemikalije su analitičke čistoće ili čišće.

#### **3.2. Uređaji**

Prilikom izrade ovog rada korišteni su slijedeći uređaji:

- uređaj za liofilizaciju (Labconco, SAD)
- ultrazvučni procesor visokog intenziteta (model UP 400 S, "dr. Hielscher" GMBH, Tetlow, Njemačka)
- uređaj za centrifugiranje (model 1200 R, Nüve, Turska)
- UV-Vis spektrofotometar (BioTek Synergy HTX, Winooski, VT, USA)

### 3.3. Materijali i obrada uzoraka

U istraživanju su korišteni uzorci plodova borovnice koji su nabavljeni na tržnici u Splitu, u srpnju 2015. godine. Uzorci su raspodijeljeni u četiri grupe: jedna skupina plodova koja se koristila kao uzorak borovnice u svježem stanju (mehanički homogenizirano), druga grupa plodova pasterizirana je na 80 °C tijekom 5 minuta, treća grupa plodova odmah nakon nabavke je liofilizirana u uređaju za liofilizaciju na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu, pri temperaturi od -55 °C. Četvrta grupa plodova je pohranjena na temperaturi od -20 °C, do trenutka kada je u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu obrađena ultrazvučnim procesorom visokog intenziteta.

Tablica 2. prikazuje eksperimentalni dizajn tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (preuzeto iz diplomskog rada Zvonimira Mostarca, 2016)<sup>15</sup>.

Ukupno 11 uzoraka smrvljenih plodova borovnice obrađeno je sondom pri čemu su korištene različite temperature tretmana, različita snaga te različito vrijeme trajanja postupka obrade.

**Tablica 2.** Dizajn tretmana uzoraka borovnice ultrazvukom visokog intenziteta<sup>15</sup>

Uzorak	Amplituda (%)	Tretman vrijeme (min)	P (W)	T <sub>1</sub> (°C)	T <sub>2</sub> (°C)
A1	100	6	60	7	72
A2	50	6	37	10	50
A3	50	9	30	10	66
A4	100	9	52	12	78
A5	75	6	45	12	65
A6	50	3	45	15	45
A7	75	6	48	15	68
A8	75	3	57	17	45
A9	100	3	70	16	35
A10	75	6	47	19	50
A11	75	9	42	21	70

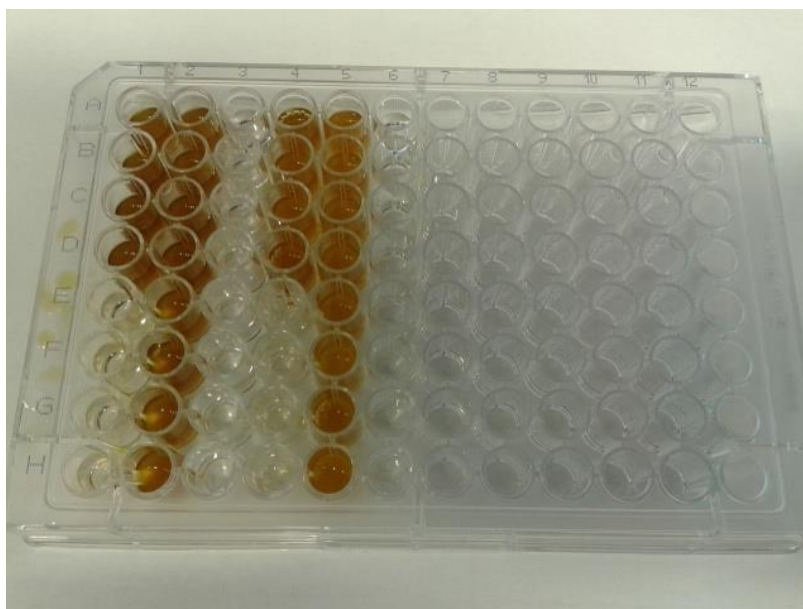
P – Snaga (W), T<sub>1</sub> – početna temperatura (°C), T<sub>2</sub> – krajnja temperatura (°C)

### 3.4. Ekstrakcija (izolacija) polifenoloksidaze

Polifenoloksidaza je izolirana iz 4 različito obrađena uzorka borovnice na dalje opisan način. Ekstrakcijsko otapalo je sadržavalo 4% (w/v) poli(vinilpoli-pirolidona) (PVPP), 1% (v/v) detergenta triton X-100 i 1 M NaCl, sve otopljeno u 0,2 M fosfatnom puferu (pH=6,5). Svi uzorci su prethodno homogenizirani u kašu (pire), zatim je od svakog uzorka uzeto 4,5 mL kaše te je kaši dodan jednak volumen ekstrakcijskog otapala. Otopina je ponovno homogenizirana pri temperaturi od 4 °C u trajanju od 3 minute, a zatim centrifugirana pri 9000 ×g, temperaturi od 4 °C i u trajanju od 30 minuta. Dobiveni supernatant se koristio kao enzimski ekstrakt te je dalje korišten prilikom određivanja aktivnosti istog enzima.<sup>16</sup>

### 3.5. Određivanje aktivnosti enzima polifenoloksidaze

Postupak određivanja aktivnosti enzima polifenoloksidaze (PPO) proveden je prema metodi opisanoj u radu Terefe i sur. (2013)<sup>16</sup>. Za test aktivnosti PPO pripravljena je smjesa koja je sadržavala 300  $\mu$ L ekstrakta enzima i 1.5 mL 0,07 M katehola pripremljenog u 0,05 M fosfatnom puferu (pH=6,5). Uzorak slijepa probe pripremljen je na isti način osim što se umjesto ekstrakta enzima koristio 0,2 M fosfatni pufer (pH=6,5). Apsorbancija je praćena pri valnoj duljini od 420 nm i sobnoj temperaturi tijekom perioda od 10 minuta koristeći UV-Vis spektrofotometar. Aktivnost enzima PPO izražena je grafički (ovisnost promjene apsorbancije o vremenu) i računski (aktivnost enzima u obrađenim uzorcima u odnosu na aktivnost enzima u svježim uzorcima).

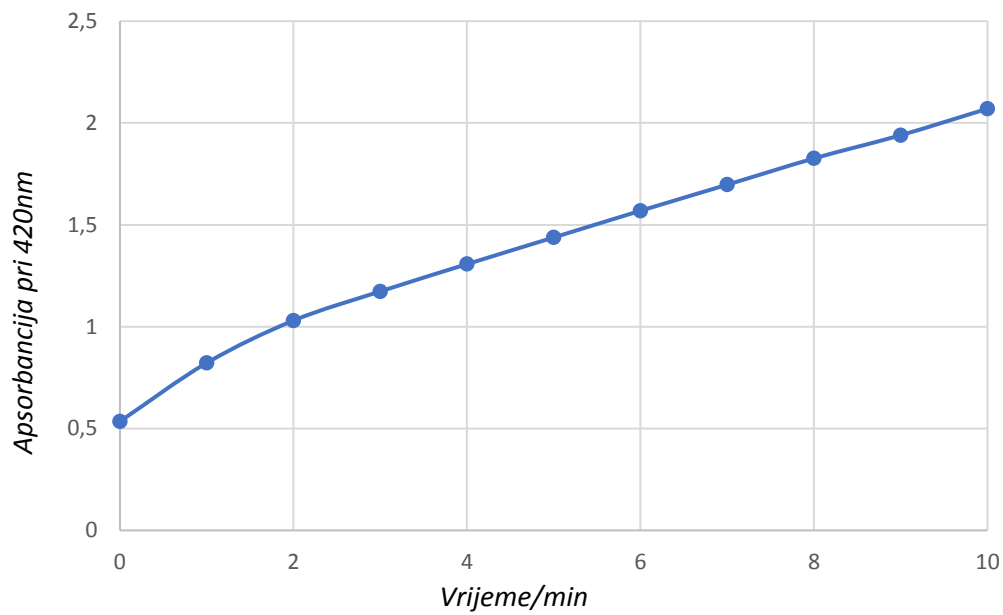


**Slika 4.** Mikrotitarska pločica s uzorcima nakon mjerenja aktivnosti polifenoloksidaze

## 4. REZULTATI

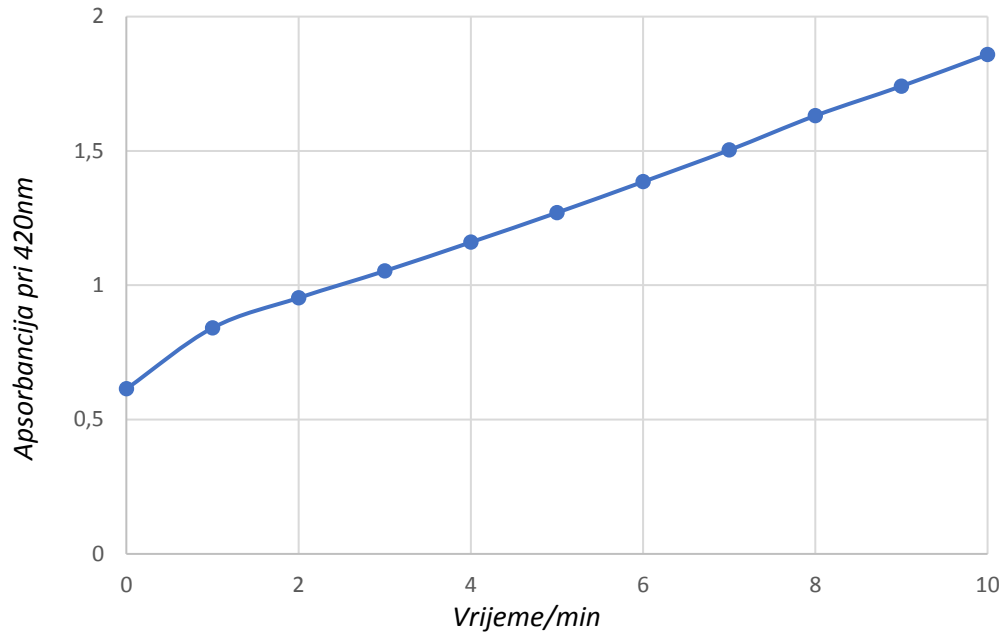
U laboratoriju je odrađeno 8 mjerenja za svaki uzorak, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Na Slici 5. nalazi se graf koji prikazuje ovisnost promjene apsorbancije o vremenu za svježe uzorke borovnice.



**Slika 5.** Graf ovisnosti promjene apsorbancije po minuti za svježe uzorke borovnice

Na Slici 6. nalazi se graf koji prikazuje ovisnost promjene apsorbancije o vremenu za pasterizirane uzorke borovnice.



**Slika 6.** Graf ovisnosti promjene apsorbancije o vremenu za pasterizirane uzorke borovnice

Smanjenje aktivnosti PPO u pasteriziranim uzorcima borovnice u odnosu na svježe uzorke izračunato je za 2. i 8. minutu mjerenja.

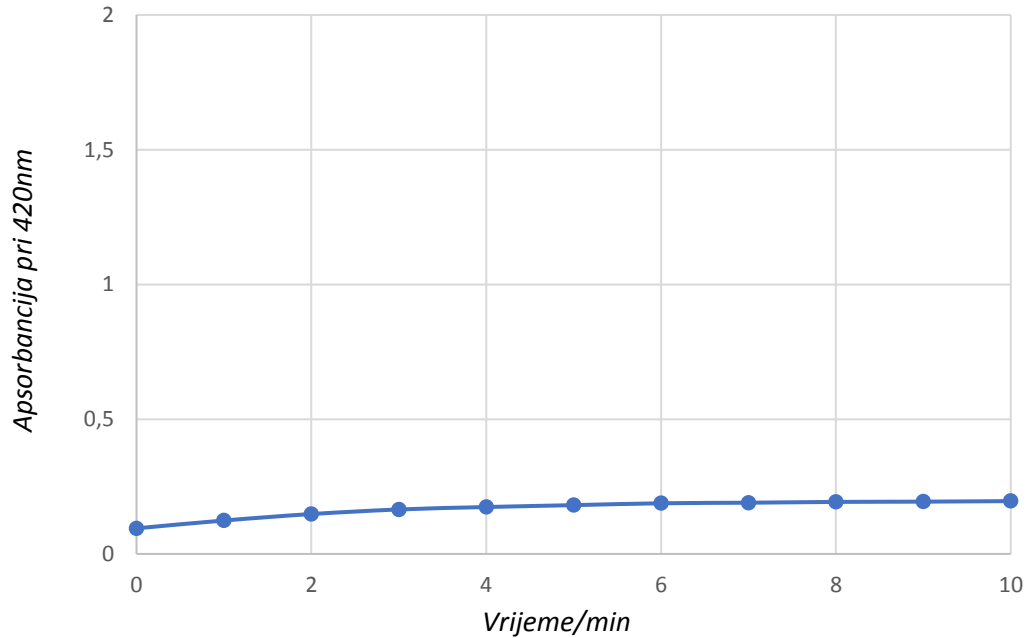
$$\% \text{ u 2. min.} = [\text{Abs(svj.)} - \text{Abs(past.)}] / \text{Abs(svj.)}$$

$$= (1,03 - 0,953) / 1,03 = 7,5\%$$

$$\% \text{ u 8. min.} = [\text{Abs(svj.)} - \text{Abs(past.)}] / \text{Abs(svj.)}$$

$$= (1,826 - 1,631) / 1,826 = 10,7\%$$

Na Slici 7. nalazi se graf koji prikazuje ovisnost promjene apsorbancije o vremenu za liofilizirane uzorke borovnice.



**Slika 7.** Graf ovisnosti promjene apsorbancije o vremenu za liofilizirane uzorke borovnice

Smanjenje aktivnosti PPO u liofiliziranim uzorcima borovnice u odnosu na svježe uzorke izračunato je za 2. i 8. minutu mjerenja.

$$\% \text{ u 2. min.} = [\text{Abs}(\text{svj.}) - \text{Abs}(\text{liof.})] / \text{Abs}(\text{svj.})$$

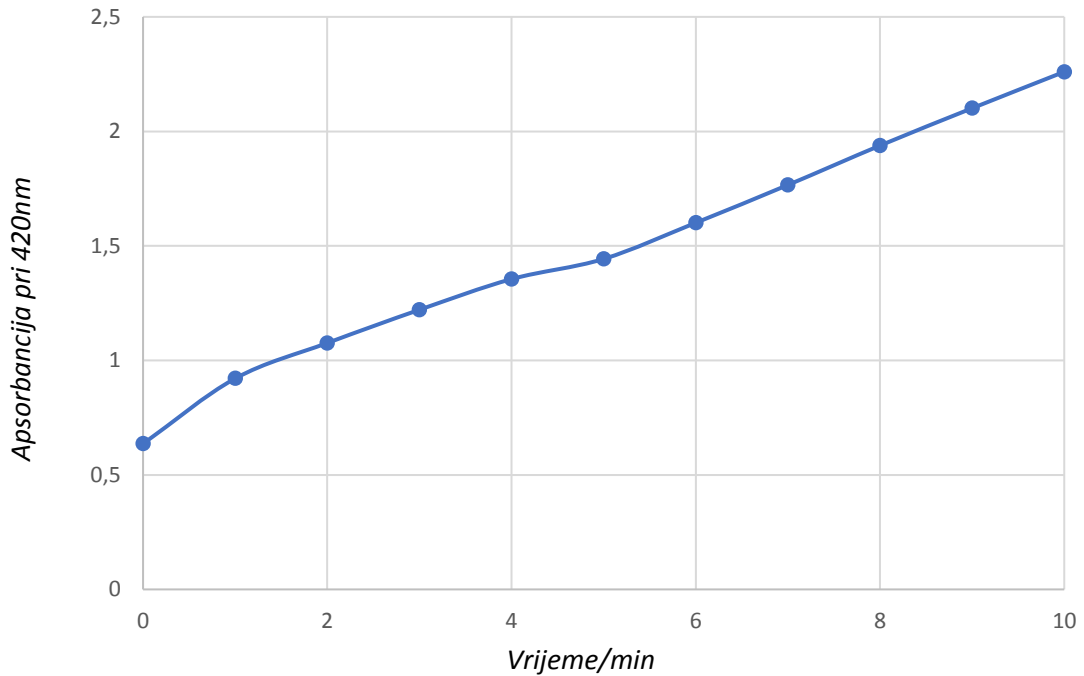
$$= (1,03 - 0,148) / 1,03 = 85,6\%$$

$$\% \text{ u 8. min.} = [\text{Abs}(\text{svj.}) - \text{Abs}(\text{liof.})] / \text{Abs}(\text{svj.})$$

$$= (1,826 - 0,193) / 1,826 = 89,4\%$$



Na Slici 8. nalazi se graf koji prikazuje ovisnost promjene apsorbancije o vremenu za uzorke borovnice tretirane ultrazvukom visokog intenziteta.



**Slika 8.** Graf ovisnosti promjene apsorbancije o vremenu za uzorke borovnice tretirane ultrazvukom visokog intenziteta

Smanjenje aktivnosti PPO u uzorcima borovnice tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na svježe uzorke izračunato je za 2. i 8. minutu mjerenja.

$$\% \text{ u 2. min.} = [\text{Abs(svj.)} - \text{Abs(UZV)}] / \text{Abs(svj.)}$$

$$= (1,03 - 1,076) / 1,03 = -4,5\%$$

$$\% \text{ u 8. min.} = [\text{Abs(svj.)} - \text{Abs(UZV)}] / \text{Abs(svj.)}$$

$$= (1,826 - 1,938) / 1,826 = -6,1\%$$

Tablica 3. prikazuje odnose smanjenja aktivnosti enzima polifenoloksidaze u različito tretiranim uzorcima u odnosu na aktivnost enzima u svježim uzorcima u 2. i 8. minuti mjerenja.

**Tablica 3.** Smanjenje aktivnosti PPO u tretiranim uzorcima u odnosu na aktivnost PPO u svježim uzorcima

<b>Uzorak</b>	<b>% u 2. min</b>	<b>% u 8. min</b>
pasterizirani	7,5	10,7
liofilizirani	85,6	89,4
UZV	-4,5	-6,1

## 5. RASPRAVA

Borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) se smatraju jednim od najbogatijih izvora fenolnih spojeva, koji posjeduju visoku biološku aktivnost. Od spomenutih spojeva u borovnicama dominiraju antocijani koji su odgovorni i za tamno-plavu boju plodova. Uloga fenola i drugih biološki aktivnih spojeva postaje sve više zanimljiva znanstvenicima zbog njihovog blagotvornog djelovanja na ljudsko zdravlje i ublažavanja različitih kroničnih oboljenja. Voće i povrće obiluje fenolnim spojevima čiji učinak ovisi o njihovom unosu i biodostupnosti, a njihovo je djelovanje često ograničeno i zbog loše apsorpcije.

Boja hrane je prvi i najznačajniji čimbenik za prihvatljivost prehranbenog proizvoda od strane potrošača, a prehranbeni proizvodi s visokom kvalitetom boje obično imaju veću vrijednost na tržištu. Promjena boje je kompleksan proces tijekom kojeg monofenolni spojevi, uz nazočnost polifenoloksidaze i kisika prelaze u kinone, koji sudjeluju u procesima kondenzacije i zajedno s visokomolekularnim spojevima daju smeđe do crno obojene pigmente. Enzimsko posmeđivanje je funkcija aktivnosti enzima i koncentracije supstrata u plodu te o njihovim koncentracijama ovisi stupanj posmeđivanja. Borovnice, kao voće koje je izrazito bogato fenolnim spojevima, izuzetno su podložne procesima posmeđivanja.

U ovom radu uspoređen je utjecaj različitih tehnika obrade uzoraka borovnice na aktivnost enzima polifenoloksidaze. Uspoređena je aktivnost enzima polifenoloksidaze u uzorcima svježih borovnica, uzorcima podvrgnutima termičkoj obradi (pasterizacija na 80 °C/ 5 min), liofiliziranim uzorcima te uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta. Aktivnost enzima polifenoloksidaze mjerena je koristeći spektrofotometrijsku metodu. Koristeći UV-Vis spektrofotometar mjerena je apsorbancija u kontinuitetu pri valnoj duljini od 420 nm i sobnoj temperaturi tijekom perioda od 10 minuta. Napravljeno je osam mjerenja za svaki uzorak, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

Iz dijagrama ovisnosti promjene apsorbancije o vremenu za pojedine uzorke izračunato je smanjenje aktivnosti enzima PPO u odnosu na aktivnost enzima u svježem uzorku za 2. i 8. minutu kako bi se lakše uočile varijacije enzimske aktivnosti. Pretpostavljamo da u svježem uzorku enzim ima maksimalnu aktivnost jer struktura enzima nije narušena djelovanjem izvana.

Na Slici 4., gdje je prikazana mikrotitarska pločica s uzorcima nakon mjerenja, jasno se vidi smeđe obojenje na mjestima svježih uzoraka, (A1, B1, C1, D1), što dokazuje da je enzim aktivan i da je došlo do enzimskog posmeđivanja. Kod pasteriziranih i ultrazvukom tretiranih uzoraka imamo sličnu situaciju, također dolazi do posmeđivanja (vidljivo na slici). Ako pogledamo mikrotitarsku pločicu s uzorcima nakon mjerenja na mjestu gdje su se nalazili liofilizirani uzorci, ne uočavamo smeđe obojenje ili je ono jedva vidljivo (E1, F1, G1, H1), što nam govori da je aktivnost enzima nakon postupka liofilizacije mnogo manja u odnosu na njegovu aktivnost u svježim uzorcima. Ako usporedimo vrijednosti aktivnosti enzima PPO u 2. i 8. minuti za liofilizirane uzorke, vidimo da je aktivnost smanjena za gotovo 90% u odnosu na aktivnost PPO u svježem uzorku. Aktivnost enzima PPO za pasterizirane uzorke u odnosu na aktivnost u svježim uzorcima, smanjena je za 7,5% u 2. minuti mjerenja te 10,7% u 8. minuti mjerenja. Kod računanja aktivnosti enzima za uzorke tretirane ultrazvukom visokog intenziteta dobili smo negativne vrijednosti, što bi upućivalo na to da je aktivnost enzima PPO (nezatno) veća u tako tretiranim uzorcima nego u svježim uzorcima. Poznato je da ultrazvučni tretman denaturira enzim, što dovodi do konformacijskih promjena enzima i smanjenja njegove aktivnosti pa su dobiveni rezultati iznenađujući. Ako usporedimo dobivene vrijednosti za ultrazvukom tretirane uzorke s rezultatima dobivenim u sličnim istraživanjima, a objavljenima u knjizi *"Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation"*<sup>17</sup> vidimo da se vrijednosti uvelike razlikuju. U jednom istraživanju koje se provodilo na uzorcima jagoda, nakon obrade ultrazvukom dobivena je zaostala aktivnost enzima polifenolokidaze iznosila 25%. Učinak ultrazvuka na enzim ovisi o ultrazvučnom intenzitetu, trajanju procesa, temperaturi, tlaku, pH uzorka i drugim faktorima pa pretpostavljamo da je uzrok neočekivanom rezultatu pogreška u nekom od ovih parametara.

Zaključujemo da je kod liofiliziranih uzoraka borovnice aktivnost enzima PPO u odnosu na aktivnost PPO u svježim uzorcima najviše smanjena te je uzorak sačuvan od enzimskog posmeđivanja. Uspoređujući rezultate smanjenja aktivnosti enzima polifenoloksidaze za uzorke podvrgnute različitim tretmanima obrade u odnosu na aktivnost enzima u svježim uzorcima jasno je da postupak liofilizacije plodova borovnice predstavlja optimalan izbor u cilju očuvanja stabilnosti biološki aktivnih spojeva borovnice u odnosu na postupak pasterizacije te na tretman obrade plodova ultrazvukom visokog intenziteta.

## 6. ZAKLJUČAK

- aktivnost enzima polifenoloksidaza skraćuje rok trajanja plodova borovnice
- u svježim uzorcima borovnice aktivnost enzima polifenoloksidaze je maksimalna te dolazi do vidljivog enzimskog posmeđivanja
- u pasteriziranim i ultrazvukom tretiranim uzorcima također dolazi do enzimskog posmeđivanja što je vidljivo golim okom na mikrotitarskoj pločici s uzorcima
- smanjenje aktivnosti enzima PPO u pasteriziranim uzorcima iznosi 7,5% u 2. minuti, te 10,7% u 8. minuti mjerenja u odnosu na aktivnost enzima u svježim uzorcima
- aktivnost enzima PPO u uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta ima negativne vrijednosti u odnosu na aktivnost enzima u svježim uzorcima borovnice, te u usporedbi s rezultatima nekih sličnih istraživanja ove vrijednosti nisu prihvatljive
- aktivnost enzima PPO u uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta nije smanjena pa zaključujemo da se radi o eksperimentalnoj pogrešci
- vrijednost aktivnosti enzima PPO u liofiliziranim uzorcima smanjena je za gotovo 90% u odnosu na aktivnost istog enzima u svježim uzorcima u 8. minuti mjerenja
- postupak liofilizacije pokazao se optimalnim načinom inhibicije aktivnosti enzima polifenoloksidaze u odnosu na aktivnost enzima u svježim plodovima te u odnosu na aktivnost u plodovima podvrgnutim postupku pasterizacije i tretmanu ultrazvukom visokog intenziteta
- postupak liofilizacije plodova borovnice predstavlja optimalan izbor u cilju sprječavanja enzimskog posmeđivanja plodova, očuvanja stabilnosti biološki aktivnih spojeva te produžetka perioda konzumacije borovnice

## 7. LITERATURA

1. Alibabić V., Mujić I., *Pravilna prehrana i zdravlje*, Veleučilište u Rijeci, Rijeka 2016.
2. Živković R., *Dijetetika*, Medicinska naklada, Zagreb 2002.
3. [www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/znacaj-voca-i-povrca-u-prehrani](http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/znacaj-voca-i-povrca-u-prehrani) (29.08.2017.)
4. <http://matuzalem.hr/o-antioksidansima/> (22.09.2017.)
5. <http://porodica-zdravljeiljepota.blogspot.hr/2015/06/borovnica-riznica-zdravlja-i-ljepota.html> (23.09.2017.)
6. Sinha NK, Sidhu SJ, Barta J, Wu JSB, Cano MP, *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, Iowa, USA: John Wiley & sons, 2012.
7. Skinner M., Hunter D., *Bioactives in Fruit: Health Benefits and Functional Foods*, UK: John Wiley & sons, 2013.
8. Bravo L., Mateos R., *Analysis of Flavonoids in Functional Food and Nutraceuticals*. In: Hurst WJ, editor.; *Methods of Analysis for Functional Food* 2<sup>nd</sup> ed., Boca Raton, CRC Press; 2008. pp. 147-206.
9. Fotez A., *Utjecaj dodatka trehaloze i maltoze na udio fenola i antocijana u soku višnje*, Završni rad, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Osijek 2015.
10. [www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti](http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti) (31.08.2017.)
11. Sullivan ML, Brown B, Polyphenol oxidases as enzymes of plant specialised metabolism. *Front Plant Sci.* 2014; 5:783
12. Hui YH, Wai – Kit N, Nollet LML, Paliyath G, Simpson BK, *Food Biochemistry and Food Processing*, Blackwell Publishing, USA, 2006.
13. Bušić N., *Enzimsko posmeđivanje jabuka*, Završni rad, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Osijek 2014.
14. Vincek M., *Enzimsko i neenzimsko posmeđivanje*, Završni rad, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, Osijek 2014.
15. Mostarac Z., *Biološka aktivnost borovnice nakon različitih načina obrade*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet Split, Split 2016.
16. Terefe NS, Kleintschek T, Gamage T, Fanning KJ, Netzel G, Versteeg C, et al. Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innov Food Sci Emerg.* 2013; 19:57-65

17. Bermudez – Aguirre D., *Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation*, Elsevier Science, 2017.