

Ekstrakti začinskog i ljekovitog bilja kao prirodni inhibitori polifenol oksidaza

Bulaš, Natalija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:151562>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

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

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**EKSTRAKTI ZAČINSKOG I LJEKOVITOG BILJA KAO PRIRODNI
INHIBITORI POLIFENOL OKSIDAZA**

ZAVRŠNI RAD

**NATALIJA BULAŠ
MATIČNI BROJ: 41**

Split, lipanj 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

EKSTRAKTI ZAČINSKOG I LJEKOVITOG BILJA KAO PRIRODNI
INHIBITORI POLIFENOL OKSIDAZA

ZAVRŠNI RAD

NATALIJA BULAŠ
Matični broj: 41

Split, lipanj 2020.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

**SPICE AND HERB EXTRACTS AS NATURAL INHIBITORS OF
POLYPHENOL OXIDASES**

BACHELOR THESIS

**NATALIJA BULAŠ
Parent number: 41**

Split, June 2020.

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Kemija hrane

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

EKSTRAKTI ZAČINSKOG I LJEKOVITOG BILJA KAO PRIRODNI INHIBITORI POLIFENOL OKSIDAZA

Natalija Bulaš, 41

Sažetak:

Hrana je izrazito kvarljiv medij, a jedno od najvažnijih vrsta kvarenja je ono uzrokovano enzimima, osobito polifenol oksidazama. Voće i povrće obiluje ovim enzimima i fenolnim spojevima, a oštećenjem biljnog tkiva dolazi do pucanja stanica pri čemu se oslobađaju polifenol oksidaze koje potom dolaze u doticaj sa supstratom-fenolima što se očituje pojavom posmeđivanja. U svrhu sprječavanja posmeđivanja primjenjuju se brojne tehnike konzerviranja, a posebno je atraktivna i uporaba prirodnih dodataka. U ovom radu ispitano je inhibicijsko djelovanje ekstrakata začinskog i ljekovitog bilja na polifenol oksidazu iz jabuke. Dobiveni rezultati su pokazali da su, između testiranih ekstrakata, samo ekstrakti masline, kurkume i češnjaka učinkovito inhibirali polifenol oksidazu i spriječili posmeđivanje.

Ključne riječi: biljni ekstrakti, enzimsko kvarenje, polifenol oksidaza, inhibitori posmeđivanja

Rad sadrži: 28 stranica, 17 slika, 3 tablice, 29 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Danijela Skroza - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Prof. dr. sc. Ladislav Vrsalović - član

Datum obrane: 9. lipnja 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28.

Mentor: Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assist. Prof

SPICE AND HERB EXTRACTS AS NATURAL INHIBITORS OF POLYPHENOL OXIDASE

Natalija Bulaš, 41

Abstract:

Food is a highly perishable medium, and one of the most important types of spoilage is caused by enzymes, especially polyphenol oxidases. Fruits and vegetables abound in these enzymes and phenolic compounds. Damaging plant tissues causes cells to break releasing polyphenol oxidases, which then come into contact with the phenol substrates-manifested by the appearance of browning. A number of preservation techniques has been used to prevent browning and the use of natural additives is of great interest. In this thesis, the inhibitory effect of spice and herb extracts on apple polyphenol oxidase was investigated. The results showed that, among the tested extracts, only olive, turmeric and garlic extracts effectively inhibited polyphenol oxidase and prevented browning.

Keywords: herbal extracts, enzymatic spoilage, polyphenol oxidase, inhibitors of enzymatic browning

Thesis contains: 28 pages, 17 figures, 3 tables, 29 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Danijela Skroza - PhD, assistant prof - chair person
2. Franko Burčul - PhD, assistant prof. - member
3. Ladislav Vrsalović - PhD, full prof. - member

Defence date: 9th June 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju,
Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić
Mekinić u razdoblju od rujna 2019. do lipnja 2020. godine.*

ZAHVALA

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na izuzetnoj pomoći, danim savjetima, idejama i pruženom vremenu tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem se i članovima Povjerenstva za obranu rada na izdvojenom vremenu i prijedlozima. Također, od srca hvala mojoj obitelji koja me podupire na mom životnom putu.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je istražiti djelovanje odabranih biljnih ekstrakata začinskog i ljekovitog bilja (maslina, kadulja, crni papar, klinčić, zeleni čaj, ružmarin, kurkuma, češnjak) na inhibiciju enzimske reakcije posmeđivanja pri čemu se kao model koristi ekstrakt polifenol oksidaza iz jabuke.

SAŽETAK

Hrana je izrazito kvarljiv medij, a jedno od najvažnijih vrsta kvarenja je ono uzrokovano enzimima, osobito polifenol oksidazama. Voće i povrće obiluje ovim enzimima i fenolnim spojevima, a oštećenjem biljnog tkiva dolazi do pucanja stanica pri čemu se oslobađaju polifenol oksidaze koje potom dolaze u doticaj sa supstratom-fenolima što se očituje pojavom posmeđivanja. U svrhu sprječavanja posmeđivanja primjenjuju se brojne tehnike konzerviranja, a posebno je atraktivna i uporaba prirodnih dodataka. U ovom radu ispitano je inhibicijsko djelovanje ekstrakata začinskog i ljekovitog bilja na polifenol oksidaze iz jabuke. Dobiveni rezultati su pokazali da su, između testiranih ekstrakata, samo ekstrakti masline, kurkume i češnjaka učinkovito inhibirali polifenol oksidaze i spriječili posmeđivanje.

Ključne riječi: biljni ekstrakti, enzimsko kvarenje, polifenol oksidaza, inhibitori posmeđivanja

SUMMARY

Food is a highly perishable medium, and one of the most important type of spoilage is caused by enzymes, especially polyphenol oxidases. Fruits and vegetables abound in these enzymes and phenolic compounds. Damaging plant tissues causes cells to break releasing polyphenol oxidases, which then come into contact with the phenol substrates-manifested by the appearance of browning. A number of preservation techniques has been used to prevent browning and the use of natural additives is of great interest. In this thesis, the inhibitory effect of spice and herb extracts on apple polyphenol oxidase was investigated. The results showed that, among the tested extracts, only olive, turmeric and garlic extracts effectively inhibited polyphenol oxidase and prevented browning.

Keywords: herbal extracts, enzymatic degradation, polyphenol oxidase, inhibitors of enzymatic browning

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| UVOD | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. Enzimsko posmeđivanje | 2 |
| 1.2.1. Čimbenici koji utječu na posmeđivanje | 5 |
| 1.2.2. Supstrati polifenol oksidaza | 6 |
| 1.3. Sprječavanje enzimskog posmeđivanja | 8 |
| 1.3.1. Djelovanje na kisik | 8 |
| 1.3.2. Djelovanje na enzim | 8 |
| 1.3.3. Djelovanje na supstrat | 9 |
| 1.3.4. Inhibitori posmeđivanja | 10 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 12 |
| 2.1. Biljni materijal | 12 |
| 2.2. Reagensi | 13 |
| 2.3. Uređaji | 13 |
| 2.4. Metode | 14 |
| 2.4.1. Ekstrakcija polifenol oksidaza | 14 |
| 2.4.2. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaza | 15 |
| 3. REZULTATI | 17 |
| 3.1. Rezultati određivanja učinka biljnih ekstrakata na polifenol oksidaze | 17 |
| 3.2. Testiranje učinka biljnih ekstrakata na polifenol oksidaze | 18 |
| 4. RASPRAVA | 23 |
| 5. ZAKLJUČAK | 25 |
| 6. LITERATURA | 26 |

UVOD

Hrana je izrazito kvarljiv medij zbog složenog kemijskog sastava. Razlikujemo različite vrste kvarenja hrane poput kemijskog, fizičkog, mikrobiološkog te enzimskog kvarenja. U ovom radu posebna pozornost se posvetila enzimskom kvarenju koje, uz ostale enzime, uzrokuju i skupina enzima zvanih polifenol oksidaze. Voće i povrće obiluje fenolnim spojevima, a prilikom branja te kod oštećenja biljnog tkiva ili tehnološke obrade dolazi do pucanja stanica pri čemu se oslobađaju polifenol oksidaze. Oslobođeni enzimi potom dolaze u doticaj sa supstratom-fenolima koji su također sadržani u sirovini, a krajnji produkt ovih enzimski-kataliziranih reakcija su složeni melanoidni pigmenti koji izazivaju pojavu posmeđivanja.

U svrhu sprječavanja kvarenja hrane primjenjuju se brojne tehnike konzerviranja od kojih su najznačajnije one koje se temelje na dovođenju ili odvođenju topline te dodatku aditiva. Velik broj prehrambenih aditiva je sintetskog podrijetla i smatra se potencijalno štetnima za ljudski organizam pa proizvođači hrane teže smanjenju njihove upotrebe ili zamjeni sintetskih oblika prirodnim dodacima koji mogu učinkovito spriječiti reakcije kvarenja i produljiti vijek trajanja namirnice. Među najčešće korištenim prirodnim dodacima nalazi se začinsko, aromatično i ljekovito bilje bogato različitim fitokemikalijama koje odlikuje dobro antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje te učinkovitost u inhibiciji različitih enzima koji uzrokuju kvarenja.

Cilj ovog rada bio je istražiti koji od odabranih biljnih ekstrakata začinskog i ljekovitog bilja djeluju kao učinkovit inhibitor enzimskih reakcija posmeđivanja pri čemu se kao model koristio ekstrakt polifenol oksidaza iz jabuke.

1. OPĆI DIO

1.1. Enzimsko posmeđivanje

Reakcije posmeđivanja pojavljuju se u različitim vrstama hrane tijekom manipulacije s njom, njene prerade i skladištenja. Poznato je da kod voća, povrća i određenih proizvoda ribarstva enzimsko posmeđivanje nastupa kada su biljna ili životinjska tkiva izložena kisiku iz zraka tijekom rukovanja, obrade i skladištenja navedenih namirnica upravo zbog aktivnosti enzima polifenol oksidaze koji su prirodno prisutni u navedenim sirovinama. Razlikujemo dvije osnovne vrste reakcija koje se javljaju i to: ne-enzimsko posmeđivanje (npr. Maillardova reakcija i karamelizacija) te enzimsko posmeđivanje. [1]

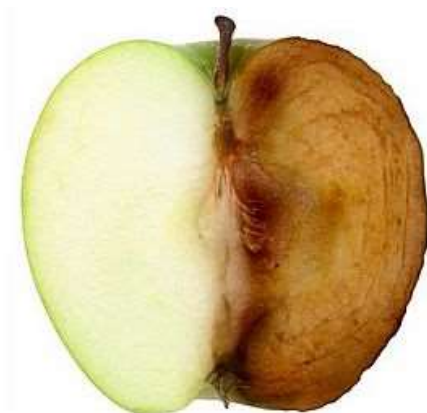
Enzimsko posmeđivanje je skup reakcija koje se uobičajeno događaju u različitim namirnicama, osobito voću i povrću, uslijed djelovanja prisutnih enzima na supstrate koje navedene namirnice sadrže. [2] Najznačajniji prehrambeni enzimi koji su ujedno i glavni uzročnici procesa posmeđivanja su polifenol oksidaze, peroksidaze i katalaze, a od njih najznačajnijima se smatraju polifenol oksidaze. [3]

Enzimi su smješteni unutar stanica i obično se nalaze u citoplazmi, dok su supstrati na koje djeluju smješteni, uglavnom, u vakuolama. Kako bi došlo do međusobne reakcije ove dvije komponente trebaju stupiti u kontakt uz prisustvo kisika. Iz ovog razloga reakcije enzimskog posmeđivanja se ne događaju u netaknutim biljnim stanicama već započinju tek nakon oštećenja tkiva rezanjem, guljenjem, otkošćavanjem, mljevenjem ili nekim drugim procesom dezintegracije tkiva. [2]

Kod procesa posmeđivanja početna faza je obično enzimska nakon čega slijede složene, ne-enzimske, sekundarne reakcije koje u konačnici i rezultiraju promjenom boje odnosno pojavom tamno obojenih produkata. [4] Kod posmeđivanja uzrokovanog polifenol oksidazama dolazi do oksidacije fenola u kinone koji dalje sudjeluju u procesima kondenzacije i zajedno s visokomolekularnim spojevima daju tamno obojene spojeve, smeđe do crne boje, tzv. melanoide. [5]

Enzimsko posmeđivanje može biti poželjno ili nepoželjno ovisno o vrsti namirnice. Korisno je za razvoj boje i okusa u prehrambenim proizvodima poput čaja, kave i kakaa te u proizvodima od datulja, groždica i šljiva, dok se negativan učinak može primijetiti kao nepoželjna promjena boje uslijed neadekvatne manipulacije s raznim voćem i povrćem koja obično uključuje stajanje na zraku narezanog ili usitnjenog voća, dulje zagrijavanje pri sušenju, neadekvatno skladištenje, itd. [3, 6]

Enzimsko posmeđivanje je od iznimne važnosti u industriji voća i povrća, osobito za one plodove koji obiluju fenolnim spojevima kao što su primjerice jabuke, kruške, banane, breskve, zelena salata i krumpir koji su posebno osjetljivi tijekom prerade i skladištenja jer ove promjene, odnosno pojava nepoželjnog smeđeg obojenja skraćuje rok trajanja prerađenih i neprerađenih namirnica te značajno umanjuje njihovu privlačnost krajnjem potrošaču. [2, 5, 6] Osim negativnog učinka na vanjski izgled namirnice, reakcije posmeđivanja utječu i na ostala organoleptička svojstva iste, uključujući okus, miris i teksturu te samu nutritivnu vrijednost. [2, 4] Izuzev utjecaja na samu kvalitetu namirnice te obzirom da su senzorske odlike jedan od najznačajnijih čimbenika za prihvatljivost proizvoda od strane potrošača, ovi procesi uzrokuju i iznimne ekonomske gubitke i za proizvođače i za trgovce. [5, 7]

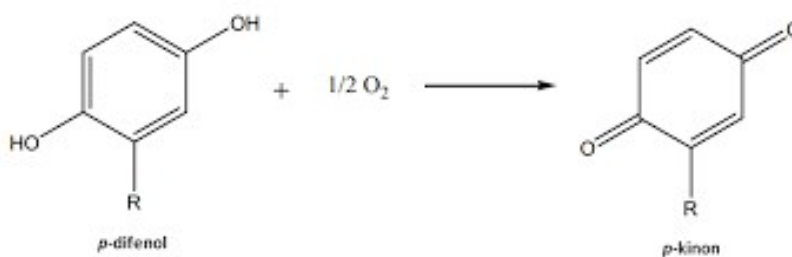


Slika 1. Enzimsko posmeđivanje jabuke

1.2. Polifenol oksidaza

Polifenol oksidaza (PPO, 1,2 benzenediol:kisik oksidoreduktaza, EC 1.10.3.1), poznata i kao polifenolaza, fenolaza, katekol oksidaza, krezolaza ili katekolaza, je skupina metalo-enzima široko rasprostranjenih u prirodi i prisutnih u većini biljnih tkiva kao i u gljivicama, bakterijama i životinjama. U biljkama se ovi enzimi obično nalaze u kloroplastima premda tijekom procesa zrenja ili starenja može doći do njihova oslobađanja iz ovih staničnih struktura. Ova skupina enzima sadrži bakar kao protetsku skupinu koji im omogućuje kataliziranje oksidacije fenolnih skupine aromatskog spoja uz prisustvo kisika iz zraka. [5, 6, 8, 10]

PPO kataliziraju oksidaciju katekola (npr. *o*-difenola) u odgovarajuće *o*-kinone, ali također mogu djelovati i na supstituirane katekole. Ovaj enzim se razlikuje od tirozinaze (EC 1.14.18.1 monofenol monooksigenaze) koja katalizira hidroksilaciju monofenola u difenole te potom oksidaciju nastalih difenola u kinone. [5, 8] Nastali kinoni su elektrofilne, visoko reaktivne molekule koje mogu polimerizirati što rezultira stvaranjem tamno obojenih pigmenta. [2, 11]



Slika 2. Shema djelovanja polifenol oksidaza [4]

1.2.1. Čimbenici koji utječu na posmeđivanje

Tri osnovna čimbenika koja utječu na procese posmeđivanja su enzim, supstrat te kisik ili neko drugo oksidirajuće sredstvo. [3]

Iako intenzitet reakcija ovisi prvenstveno o koncentraciji enzima i fenolnih supstrata te količini dostupnog kisika, od ostalih čimbenika utjecaj ima i pH vrijednosti medija, temperatura, svjetlost, ali i vrsta i stupanj zrelosti ploda te njegova mehanička oštećenja. [12]

Temperatura je važan čimbenik koji utječe na katalitičku aktivnost PPO i to na dva načina: učinkom zagrijavanja i hlađenja. Metode konzerviranja bazirane na dovođenju topline su najkorištenije u svrhu inaktivacije enzima i uništenja mikroorganizama koji su uzročnici kvarenja hrane, dok snižavanje temperature smanjuje brzinu enzimski-kataliziranih reakcija zbog snižavanja kinetičke energije, učinka na slabiju mobilnosti enzima i supstrata i smanjenja vjerojatnosti kolizije molekula. [6] Visoka temperatura dovodi do denaturacije enzima koja se prema nekim studijama događa čak i pri 50 °C, dok kratkotrajno izlaganje temperaturi od 70-90 °C je uglavnom dovoljno za djelomičnu ili potpunu inaktivaciju enzima.[5]

Također, utjecaj temperature uvelike ovisi o izvoru enzima. Navodi se da su optimalne temperature za maksimalnu aktivnost PPO bile 25 °C za pepermint, 20 °C za kivi voće, 25 °C za šljivu, 30 °C za te 37 °C za breskve koristeći katekol kao supstrat. [11, 13] Ansari i sur. [8] su također dokazali da na aktivnost PPO izuzetno utječe temperatura. PPO aktivnost je određena na temperaturnom području od 10-30 °C pri čemu je enzim izoliran iz jabuke pokazao maksimalnu aktivnost na 20 °C. Iznad ovih temperaturnih vrijednosti aktivnost se naglo smanjivala. Ipak, optimalna temperatura PPO može se mijenjati ovisno o vrsti korištenog supstrata.

Prema istraživanju Ansari i sur. [8] PPO su pokazale veliku aktivnost u neutralnom i alkalnom pH mediju, dok je aktivnost naglo opala snižavanjem pH vrijednosti. Općenito, većina biljnih PPO pokazuje maksimalnu aktivnost pri neutralnom pH, ali optimalni pH za PPO aktivnost može varirati ovisno o čimbenicima kao što su izvor enzima, zrelost ploda, metoda ekstrakcije, temperatura, vrsta supstrata te vrsta i koncentracija pufera. U njihovom istraživanju optimalan pH je bio 7. Optimalnom pH vrijednosti za aktivnost PPO se smatraju vrijednosti između 6 i 7, dok ova skupina enzima ne pokazuje aktivnost pri vrijednostima nižim od 4. [5, 8]

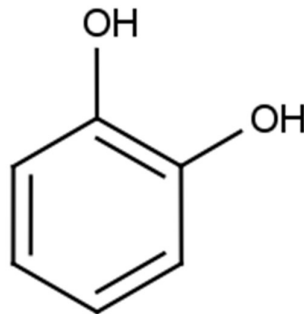
Zabilježene su optimalne pH vrijednosti enzima PPO iz različitih izvora: 6,5 za krumpir, 7,0 za banane, 6,5 za artičoku, 4,5 za zelene masline itd. [11]

1.2.2. Supstrati polifenol oksidaza

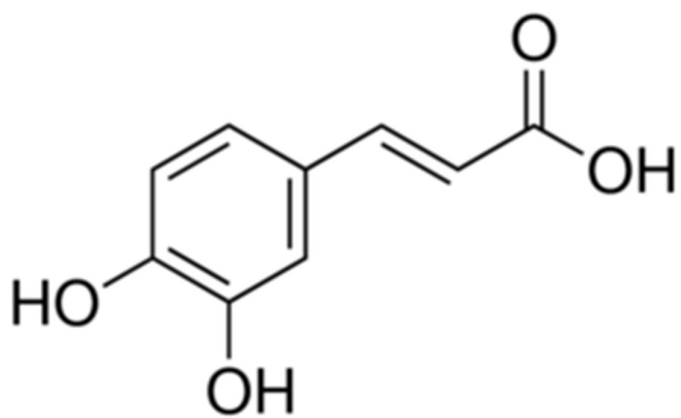
Poznato je da PPO imaju široku supstratnu specifičnost. Općenito, supstrati PPO u reakcijama enzimskog posmeđivanja su fenoli s hidroksilnim skupinama u *orto*- ili *para*- položaju. [5]

Dakle, enzim iz bilo kojeg izvora može oksidirati niz jednostavnih *orto*-fenola poput kava kiseline i njenih konjugata, katekolnih derivata ili dihidroksifenilalanina (DOPA). [13] Pročišćeni ili djelomično pročišćeni enzimi PPO iz jabuka djeluju na različite polifenolne skupine različitim intenzitetom. Kao najbolji supstrati PPO izdvajaju se 4-metilkatekol, katekol ili klorogenska kiselina. [4]

Fenolni i polifenolni spojevi imaju dobra antioksidativna svojstva zbog čega imaju pozitivnu ulogu za ljudsko zdravlje, no mogu imati i negativan utjecaj kod voća i povrća jer uzrokuju pojavu žutih i smeđih pigmenata. Sadržaj fenolnih tvari utječe na svojstva poput boje, okusa i aroma te ista pridonose kvaliteti voća i povrća. [5]



Slika 3. Struktura katekola [15]



Slika 4. Struktura kava kiseline [16]

1.3. Sprječavanje enzimskog posmeđivanja

PPO se nalaze u gotovo svim biljkama kao i u morskim plodovima, a zbog velikog ekonomskog značaja i dobiti, odnosno potencijalnih gubitaka navedenih prehrambenih industrija, inhibicija ovih enzima je od velike važnosti pa je široko proučavana. [6]

Inhibicija enzimskog posmeđivanja temelji se na primjenjivanju fizikalnih i kemijskih metoda s ciljem da se ukloni jedan ili više čimbenika koji uzrokuju posmeđivanje. Većina strategija za kontrolu procesa posmeđivanja su ili inhibiranje aktivnosti PPO ili pretvaranje kinona u bezbojne tvari [17] pri čemu se PPO uglavnom inhibiraju djelovanjem topline ili uklanjanjem jednog od potrebnih sastojaka O₂, enzima, Cu²⁺ ili supstrata. [11, 18]

1.3.1. Djelovanje na kisik

Jedan od glavnih čimbenika koji izazivaju pojavu enzimskog posmeđivanja je kisik. Kisik sudjeluje i u katekolaznoj i krezolaznoj aktivnosti PPO gdje se reducira u vodu. Enzimsko posmeđivanje se može inhibirati uklanjanjem kisika iz reakcija, a to se postiže pakiranjem u ambalažu nepropusnu za kisik, pakiranjem u atmosferi dušika te potapanjem svježih narezanih jabuka u otopine natrijevog klorida ili kiselina itd. [5]

1.3.2. Djelovanje na enzim

S ciljem sprječavanja enzimskog posmeđivanja na enzim se obično djeluje sljedećim postupcima:

A. Termičkim tretiranjem (inaktivacija)

Inaktiviranje enzima na način da se primijeni jedan od postupaka konzerviranja dovođenjem topline je zasigurno najpoznatiji i najčešći. Na taj način u sekundarnoj ili tercijarnoj strukturi enzima utječe se na katalitičku aktivnost istog, ali vrlo često korištenje visokih temperatura ima negativne učinke na aromu, teksturu i boju prehrambenih proizvoda. Najčešće korištene metode termičke inaktivacije su

blanširanje (pri temperaturi od 70 do 105 °C), pasterizacija (pri temperaturi od 60 do 85 °C), konzerviranje sušenjem (dehidratacija) te postupci hlađenja koji se temelje na procesima odvođenja topline. [5]

B. Reakcije s tvarima koje stvaraju komplekse s bakrom

Spojevi kao što su halidi, cijanidi, CO₂, aminokiseline, peptidi, proteini, H₂O₂, alkoholi itd. imaju svojstvo stvaranja kelata s bakrom koji je neophodan za aktivnost PPO. Među navedenim su najvažniji halidi koji se vežu na bakar u aktivnom mjestu enzima PPO i tako smanjuju njegovu aktivnost. [5]

C. Reakcije sa spojevima strukture slične supstratima

Poznato je da PPO mogu stupiti i u reakcije sa spojevima čija je kemijska struktura slične onoj supstrata (fenola) kao što su karboksilne kiseline (Trolox), aromatske amino kiseline, terpeni.

D. Djelovanje sa spojevima koji snižavaju pH

Aktivnost PPO se optimalno kreće pri pH vrijednostima između 6 i 7, dok enzimi ne pokazuju aktivnost pri pH vrijednostima ispod 4, a u potpunosti je inaktivna kod pH vrijednosti ispod 3. Za snižavanje pH vrijednosti pa samim time i sprječavanje posmeđivanja se koristi limunska kiselina. [5, 8]

1.3.3. Djelovanje na supstrat

Drugi način djelovanja je djelovanje na supstrat koje se temelji na primjeni reducirajućih sredstava od kojih su najznačajniji:

A. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina ili vitamin C u inhibiciji PPO može reagirati na više načina: kompeticijski, nekompeticijski i stvaranjem kelatnih kompleksa. Ovaj spoj ima sposobnost redukcije kinona nastalih oksidacijom polifenola natrag do fenolnih spojeva. Također, može djelovati i neposredno na enzim tvoreći kelatne spojeve s njegovom prostetskom skupinom. [4]

B. Sulfiti i tiolni spojevi

Sumporovi spojevi mogu spriječiti enzimsko posmeđivanje na nekoliko načina. Primjerice poznati su kao reducirajuća sredstva i njihovim djelovanjem dolazi do redukcije obojenih *orto*-kinona u bezbojne i manje reaktivne fenole, međutim, mogu reagirati i s međuproduktima reakcije čime sprječavaju daljnje posmeđivanje. Najpoznatiji sumporovi spojevi koji se koriste u tu svrhu su sumporov dioksid, natrijev i kalijev metabisulfit, natrijev i kalijev disulfit te natrijev sulfit. [5]

C. Aminokiseline, peptidi i proteini

Između *o*-kinona i aminokiselina može doći do kemijskih reakcija poput kovalentnog vezivanja *o*-kinona s tiolnom skupinom cisteina i tioeterske skupine metionina i amino skupine lizinskog ostatka u proteinima. [5]

1.3.4. Inhibitori posmeđivanja

U fizikalne metode sprječavanja posmeđivanja spadaju metode kojima dolazi do uklanjanja kisika, primjerice pakiranje u modificiranu atmosferu (MA) te postupci hlađenja ili zagrijavanja, dok kemijske metode podrazumijevaju korištenje sredstava za sprječavanje enzimskog posmeđivanja. [18]

Termička obrada se smatra najučinkovitijim načinom inaktivacije PPO, međutim, ova metoda može rezultirati gubitkom nutritivne vrijednosti i kvalitete primjerice raspadom vitamina i aminokiselina, a također vrlo često uzrokuje gubitak ili degradaciju sastojaka koji doprinose boji i okusu namirnice. Postoje dva aspekta temperaturnog učinka: toplinska obrada koja rezultira inaktiviranjem te niske temperature kojima se inhibira brzina reakcija kataliziranim enzimima. [6]

Posljednjih godina ne-termički tretmani konzerviranja hrane su pobudili značajan interes za primjenu u svrhu smanjenja ili inhibicije aktivnosti enzima obzirom da se izbjegavanjem termičke obrade znatno smanjuju i negativni učinci na samu kvalitetu hrane. Tako je niz studija pokazalo pozitivne učinke homogenizacije djelovanjem visokog tlaka i ultrazvuka velike snage na enzimsku aktivnost. [10]

Kemijska sredstva koja su se pokazala učinkovitim i učestalo se koriste protiv posmeđivanja i za očuvanje kvalitete hrane su najčešće sulfiti, natrijev klorid, cistein, kojinska kiselina, askorbinska kiselina i cimetna kiselina. [19, 20]

Osim toga, neki spojevi koji sadrže tiol, sulfite, aromatske karboksilne kiseline i metalne kelatore su se također pokazali učinkoviti u kontroli enzimskog posmeđivanja. [11]

Tradicionalno, procesi posmeđivanja hrane se najčešće kontroliraju korištenjem sulfita čija je primjena široko rasprostranjena u prehrambenoj industriji; od svježih do onih smrznutih odnosno prerađenih prehrambenih proizvoda. [8] Sulfiti su ujedno i najpoznatiji redukcijski agensi te su učinkoviti i najčešće korišteni protiv mikrobiološkog kvarenja hrane, međutim, njihova je upotreba ograničena zbog štetnih učinaka na zdravlje ljudi. Stoga su primjenu pronašla brojna druga kemijska sredstva poput askorbinske kiseline, cisteina, polikarboksilne kiseline (npr. limunska, vinska, jabučna i jantarna kiselina), flavonoida, salicilne kiseline, dipeptidi itd. [11]

Sprječavanje enzimskog posmeđivanja kemijskim sredstvima postiže se na nekoliko načina. Prvi način je dodatak tvari koje reduciraju obojene dopakinone ili tvari koje reagiraju s kinonima i tvore nebojene spojeve, zatim tvari koje denaturiraju proteinsku strukturu PPO te u konačnici dodatkom ireverzibilnih, kompeticijskih i nekompeticijskih inhibitora. [4, 21] Tako primjerice askorbinska kiselina reducira *o*-kinone do monofenola ili difenola; cistein stvara bezbojne produkte u reakcijama s *o*-kinonima; zatim kojinska kiselina inhibira PPO i izbjeljuje melanin do bezbojnog spoja; benzojeva i cimetna kiselina čine kompleks s bakrom na aktivnom mjestu PPO, natrijev klorid smanjuje pH vrijednost. [1]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

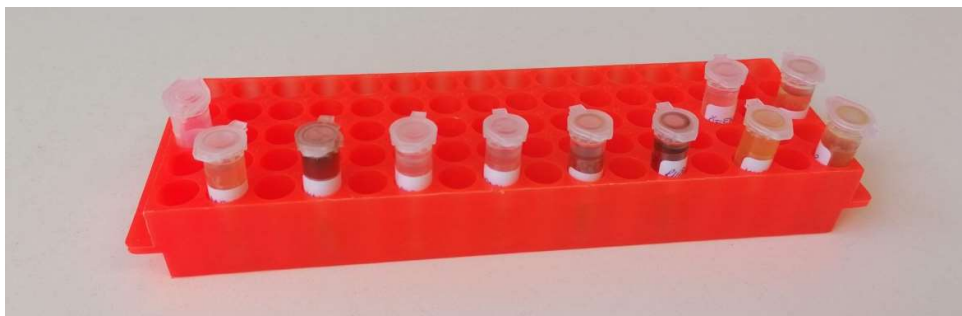
2.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu rada kao izvor PPO korištene su jabuke sorte Idared kupljene u lokalnoj trgovini. Do postupka ekstrakcije (izolacije) enzima jabuke su čuvane u hladnjaku na temperaturi +4 °C.

Za testiranje učinkovitosti prirodnih ekstrakata u inhibiciji enzima korišteno je osam različitih biljnih ekstrakata (začinskog, ljekovitog i aromatičnog bilja). Svježi biljni materijal je nakon kupnje liofiliziran te homogeniziran u fini prah korištenjem ručnog mlinca prije postupka ekstrakcije. Biljni materijal je ekstrahiran destiliranom vodom u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od dva sata pri 60 °C. Pripremljeni ekstrakti su skladišteni u zamrzivaču do analize.

Tablica 1. Korišteno bilje

| NAZIV | LATINSKI NAZIV |
|-------------------|----------------------------------|
| Maslina | <i>Olea europaea L.</i> |
| Kadulja | <i>Salvia officinalis L.</i> |
| Crni papar | <i>Piper nigrum L.</i> |
| Klinčić | <i>Syzygium aromaticum L.</i> |
| Zeleni čaj | <i>Camellia sinensis L.</i> |
| Ružmarin | <i>Rosmarinus officinalis L.</i> |
| Kurkuma | <i>Curcuma longa L.</i> |
| Češnjak | <i>Allium sativum L.</i> |



Slika 5. Korišteni biljni ekstrakti

2.2. Reagensi

- Natrij hidrogen fosfat, p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrijhidrogenfosfat, p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Triton X-100 (Sigma-AldrichGmbH, Steinheim, Njemačka)
- Polivinil pirolidon, PVP (Sigma-AldrichGmbH, Steinheim, Njemačka)
- L-(+)-askorbinska kiselina, p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Katekol (Sigma-AldrichGmbH, Steinheim, Njemačka)

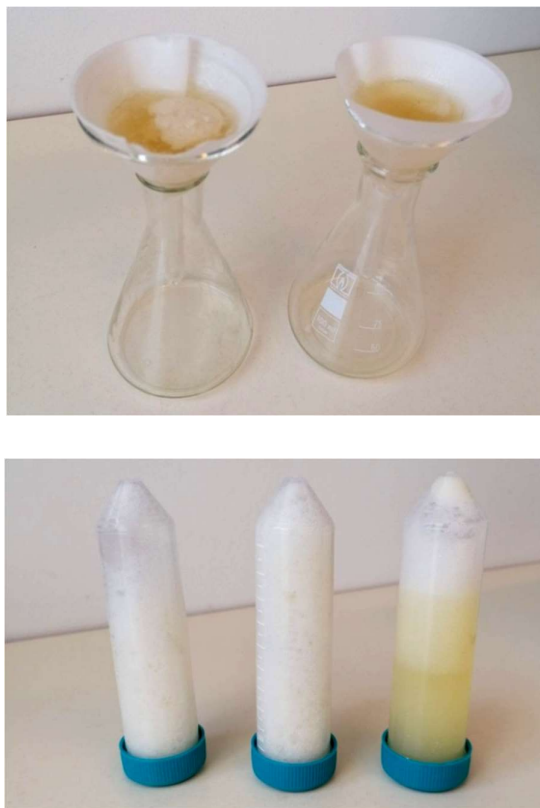
2.3. Uređaji

- Kuhinjski štapni mikser (Model 980, Moulinex, Francuska)
- Centrifuga; Avanti J-25 (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, SAD)
- Analitička vaga; Mettler P1210 (Mettler-Toledo International Inc., Columbus, SAD)
- Ultrazvučna kupelj; Transsonic 310/H (Elma, Njemačka)
- Čitač mikrotitarskih ploča; Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)

2.4. Metode

2.4.1. Ekstrakcija polifenol oksidaza

U 100 g oguljene i narezane jabuke se doda 100 mL fosfatnog pufera (100 mM, pH=7,0) koji sadrži Triton X-100 (0,1 %), PVP (0,1 %) i askorbinsku kiselinu (10 mM) nakon čega se smjesa homogenizira pomoću štapnog miksera. Pripravljena smjesa se profiltrira kroz naborani filter papir te se filtrat dodatno izbistri centrifugiranjem pri 15000 g u trajanju od 10 minuta pri +4 °C. Dobiveni ekstrakt koristi se za daljnja ispitivanja. [4]



Slika 6. Postupak ekstrakcije polifenol oksidaza



Slika 7. Promjene obojenja pripravljenog ekstrakta polifenol oksidaza iz jabuke stajanjem istog na zraku i sobnoj temperaturi

2.4.2. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaza

Aktivnost PPO određena je kontinuiranim spektrofotometrijskim testom pri 420 nm bilježenjem absorbancije uzorka u vremenskim intervalima svake minute tijekom ukupno 15 minuta testa. Mikrotitarska pločica, u kojoj se vršilo ispitivanje uzorka, sastoji se od dvanaest stupaca i osam redaka. U otvore na pločici dodani su reagensi prema shemi u *Tablici 2*.

Tablica 2. Shema dodavanja otopina u otvore na mikrotitarskoj pločici prilikom mjerenja aktivnosti polifenol oksidaza

| | K | SP | UZ | SPU | PK |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ENZIM | 50 μ L | - | 50 μ L | - | 50 μ L |
| KATEKOL | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L |
| EKSTRAKT | - | - | 10 μ L | 10 μ L | 10* μ L |
| PUFER | 10 μ L | 60 μ L | - | 50 μ L | - |

K – kontrola enzima 100 % aktivnosti; **SP** – slijepa proba (sve osim enzima); **UZ** – aktivnost dodanog ekstrakta; **SPU** – slijepa proba za **UZ** (korekcija boje); **PK** – pozitivna kontrola (potpuna inhibicija enzima) sintetskim inhibitorom.

Prva tri stupca služe kao kontrola; prvi sadrži 60 μL fosfatnog pufera i 150 μL katekola (*Tablica 2, SP*), drugi sadrži 50 μL fosfatnog pufera, 150 μL katekola i 10 μL biljnog ekstrakta (*Tablica 2, SPU*), treći stupac sadrži 10 μL fosfatnog pufera, 150 μL katekola i 50 μL enzima PPO (*Tablica 2, K*).

Osam srednjih stupaca sadrži po 50 μL enzima PPO, 150 μL katekola (20 mM) i 10 μL odgovarajućeg biljnog ekstrakta (*Tablica 2, UZ*).

Posljednji stupac na pločici umjesto biljnog ekstrakta sadrži sintetski inhibitor enzima, natrijev tiosulfat koji služi kao pozitivna kontrola (*Tablica 2, PK*). Također, djelotvornosti inhibicije istraživanih ekstrakata na enzim PPO su određene usporedbom njihovih aktivnosti s aktivnosti sintetskog inhibitora. [22]



Slika 8. Mikrotitarski čitač koji se koristio za određivanje aktivnosti i inhibicije polifenol oksidaza

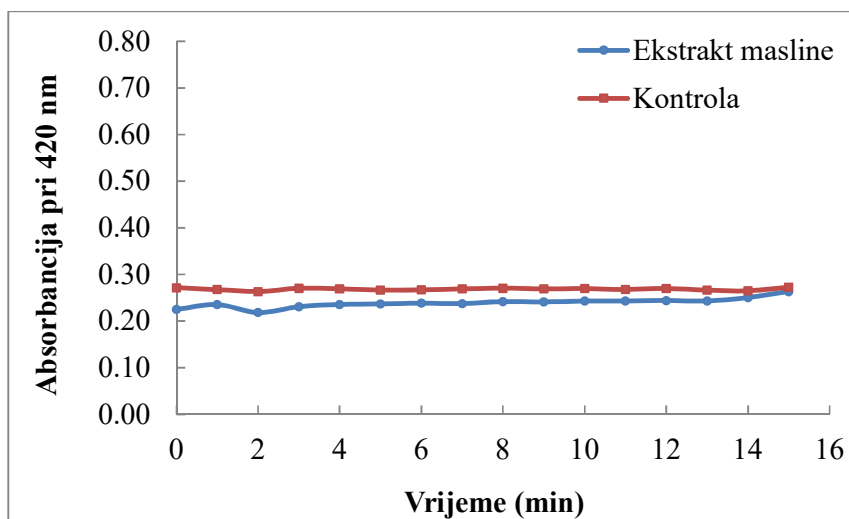
3. REZULTATI

3.1. Rezultati određivanja učinka biljnih ekstrakata na polifenol oksidaze

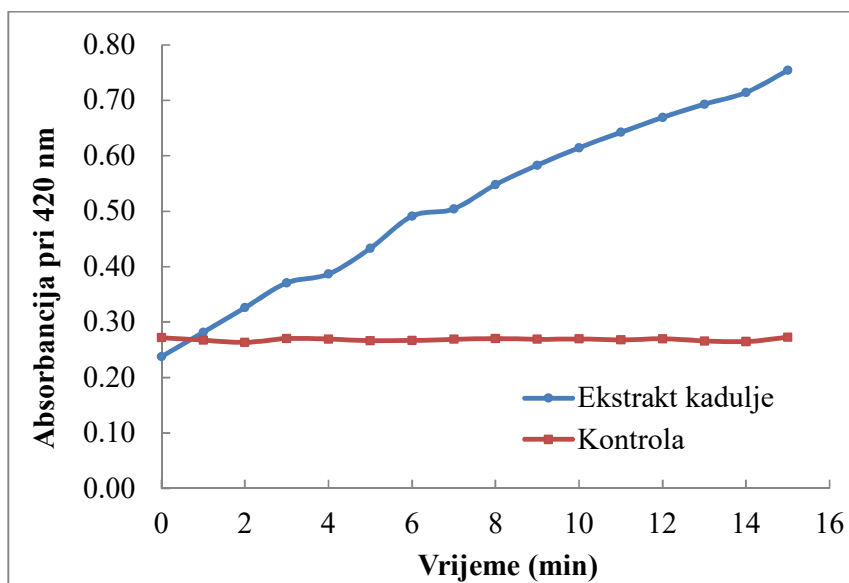
Tablica 3. Promjena absorbcije uzoraka tijekom određivanja aktivnosti polifenol oksidaza

| Vrijeme (min) | Maslina | Kadulja | Crni papar | Klinčić | Zeleni čaj | Ružmarin | Kurkuma | Češnjak | Na ₂ S ₂ O ₃ | Kontrola |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|-------------|
| Korekcija boje | 0,228 | 0,129 | 0,148 | 0,494 | 0,215 | 0,606 | 0,158 | 0,055 | 0,258 | - |
| 0 | 0,453±0,009 | 0,367±0,002 | 0,425±0,012 | 0,819±0,020 | 0,461±0,042 | 1,052±0,037 | 0,362±0,002 | 0,262±0,002 | 0,262±0,001 | 0,272±0,005 |
| 1 | 0,464±0,007 | 0,411±0,020 | 0,452±0,009 | 0,899±0,010 | 0,559±0,020 | 1,073±0,035 | 0,362±0,002 | 0,259±0,002 | 0,260±0,001 | 0,268±0,003 |
| 2 | 0,447±0,001 | 0,455±0,011 | 0,471±0,009 | 0,951±0,013 | 0,563±0,034 | 1,212±0,011 | 0,365±0,001 | 0,263±0,002 | 0,257±0,002 | 0,264±0,003 |
| 3 | 0,459±0,001 | 0,500±0,007 | 0,493±0,002 | 1,010±0,016 | 0,612±0,025 | 1,253±0,017 | 0,366±0,001 | 0,261±0,002 | 0,254±0,002 | 0,271±0,002 |
| 4 | 0,464±0,002 | 0,516±0,003 | 0,523±0,012 | 1,022±0,008 | 0,637±0,025 | 1,271±0,016 | 0,366±0,002 | 0,257±0,002 | 0,259±0,004 | 0,269±0,003 |
| 5 | 0,465±0,002 | 0,562±0,011 | 0,545±0,004 | 1,050±0,008 | 0,634±0,029 | 1,339±0,021 | 0,366±0,002 | 0,257±0,002 | 0,259±0,003 | 0,267±0,002 |
| 6 | 0,467±0,002 | 0,620±0,013 | 0,575±0,007 | 1,076±0,012 | 0,645±0,024 | 1,351±0,013 | 0,366±0,002 | 0,259±0,003 | 0,259±0,001 | 0,267±0,002 |
| 7 | 0,466±0,005 | 0,633±0,060 | 0,617±0,010 | 1,117±0,009 | 0,669±0,020 | 1,387±0,010 | 0,369±0,004 | 0,259±0,003 | 0,258±0,002 | 0,269±0,002 |
| 8 | 0,470±0,004 | 0,677±0,009 | 0,656±0,014 | 1,130±0,010 | 0,690±0,019 | 1,422±0,006 | 0,366±0,001 | 0,258±0,003 | 0,255±0,002 | 0,271±0,001 |
| 9 | 0,469±0,002 | 0,712±0,005 | 0,681±0,016 | 1,153±0,012 | 0,728±0,021 | 1,454±0,004 | 0,367±0,002 | 0,259±0,003 | 0,259±0,002 | 0,269±0,003 |
| 10 | 0,471±0,004 | 0,743±0,005 | 0,715±0,022 | 1,174±0,004 | 0,749±0,024 | 1,488±0,013 | 0,368±0,002 | 0,262±0,003 | 0,259±0,004 | 0,270±0,002 |
| 11 | 0,472±0,003 | 0,771±0,009 | 0,747±0,028 | 1,190±0,003 | 0,750±0,021 | 1,515±0,013 | 0,367±0,003 | 0,259±0,002 | 0,259±0,001 | 0,268±0,003 |
| 12 | 0,472±0,013 | 0,798±0,050 | 0,738±0,009 | 1,201±0,018 | 0,751±0,009 | 1,544±0,004 | 0,368±0,002 | 0,260±0,001 | 0,259±0,003 | 0,270±0,003 |
| 13 | 0,471±0,004 | 0,822±0,018 | 0,779±0,037 | 1,217±0,008 | 0,809±0,042 | 1,569±0,008 | 0,367±0,004 | 0,259±0,004 | 0,256±0,002 | 0,266±0,005 |
| 14 | 0,479±0,001 | 0,843±0,023 | 0,838±0,039 | 1,234±0,005 | 0,782±0,013 | 1,580±0,019 | 0,372±0,002 | 0,260±0,002 | 0,257±0,002 | 0,265±0,003 |
| 15 | 0,492±0,003 | 0,883±0,024 | 0,863±0,039 | 1,246±0,007 | 0,794±0,013 | 1,592±0,025 | 0,370±0,005 | 0,260±0,002 | 0,258±0,002 | 0,273±0,003 |

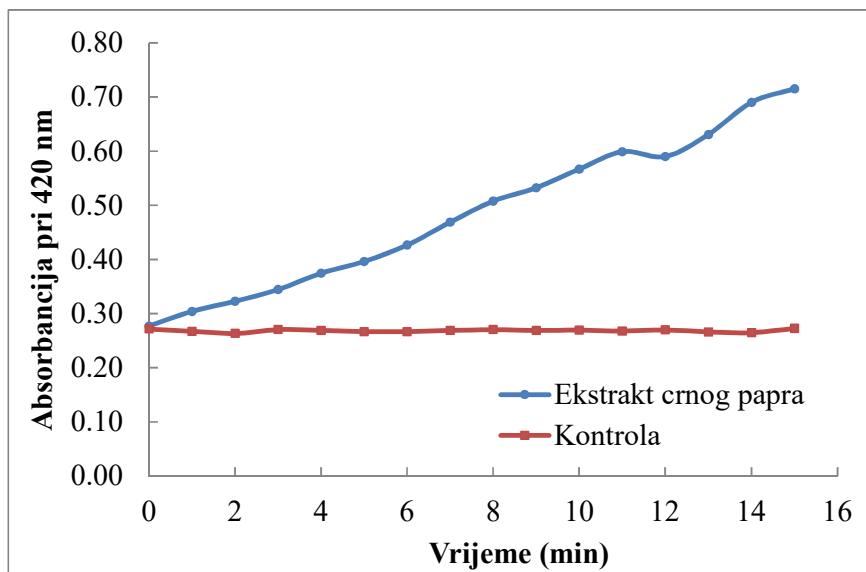
3.2. Testiranje učinka biljnih ekstrakata na polifenol oksidaze



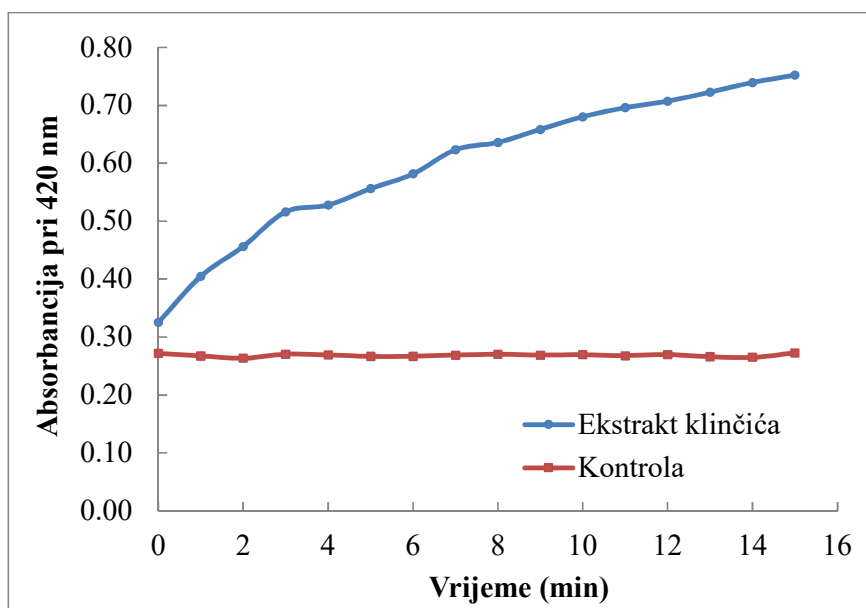
Slika 9. Učinak ekstrakta masline na polifenol oksidaze



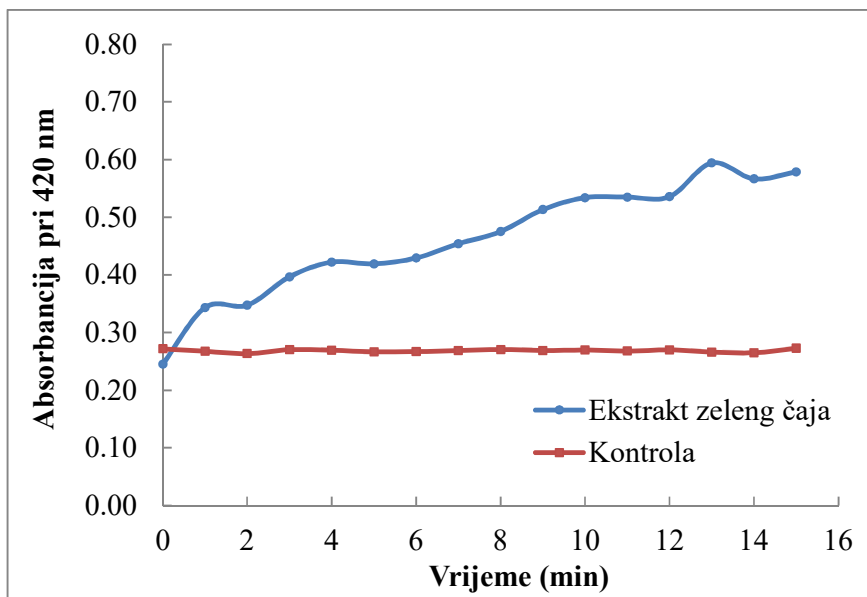
Slika 10. Učinak ekstrakta kadulje na polifenol oksidaze



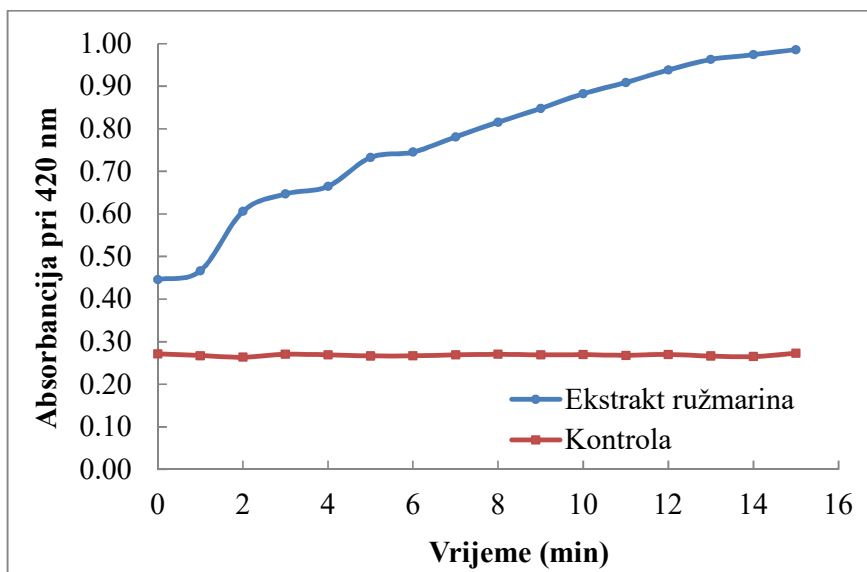
Slika 11. Učinak ekstrakta crnog papra na polifenol oksidaze



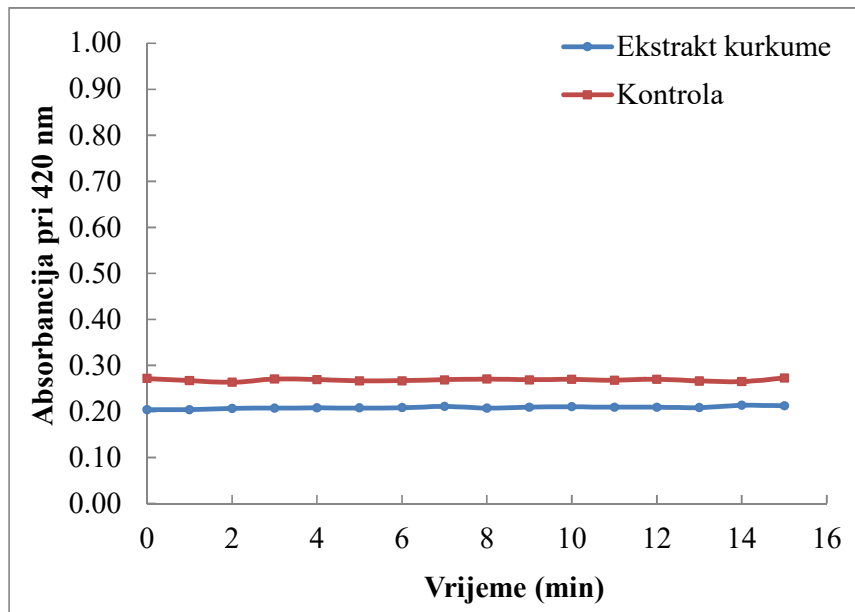
Slika 12. Učinak ekstrakta klinčića na polifenol oksidaze



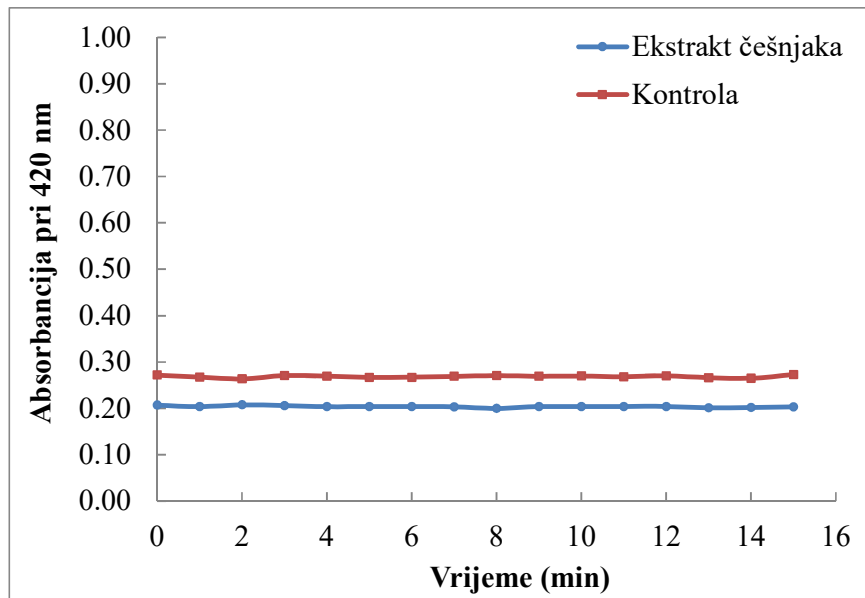
Slika 13. Učinak ekstrakta zelenog čaja na polifenol oksidaze



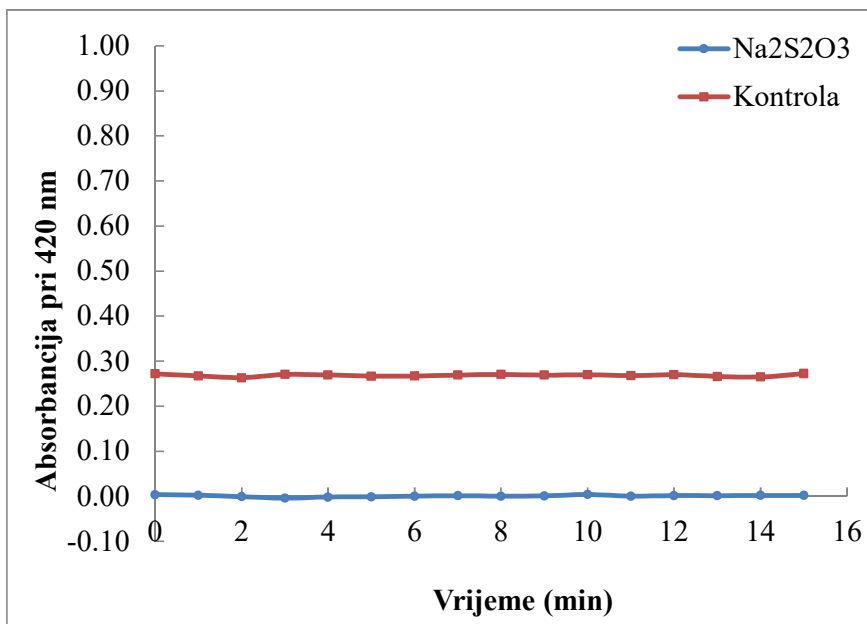
Slika 14. Učinak ekstrakta ružmarina na polifenol oksidaze



Slika 15. Učinak ekstrakta kurkume na polifenol oksidaze



Slika 16. Učinak ekstrakta češnjaka na polifenol oksidaze



Slika 17. Utjecaj Na₂S₂O₃ na enzim polifenol oksidaze

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti učinak prirodnih dodataka, odnosno ekstrakata začinskog, aromatičnog i ljekovitog bilja na enzim PPO pri čemu je praćen njihov inhibicijski učinak ili pak učinak kojim dodatak ekstrakta potiče enzimsku aktivnost. Kod određivanja enzimске aktivnosti i učinka ekstrakata na istu korištena je spektrofotometrijska metoda kojom se mjerila promjena absorbancije uzoraka odnosno promjena intenziteta obojenja u vidu pojave posmeđivanja. Promjena absorbancije uzoraka bilježena tijekom ispitivanja prikazana je u *Tablici 3* kao i korekcija obojenja biljnih ekstrakata. U svrhu bolje i preglednije interpretacije rezultati usporedbe enzimске aktivnosti po dodatku ekstrakata su prikazani grafički na slikama 8-16 pri čemu je kao kontrola korištena izmjerena aktivnost samog enzima i katekola (supstrata) koji su trenutno reagirali prije samog početka mjerenja.

Iz grafova ovisnosti promjene absorbancije o vremenu može se zaključiti da ekstrakti masline, kurkume, češnjaka kao i sintetskog $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ inhibiraju enzim PPO.

List masline je izvor različitih fitokemikalija od kojih se posebno ističe skupina spojeva zvani sekoiridoidi. Najpoznatiji i najdominantniji sekoiridoid masline je oleuropein koji je poznat zbog dobre biološke aktivnosti, dok se od ostalih fenolnih spojeva ističu fenolni alkoholi (tirozol i hidroksitirozol), jednostavni fenoli (kava kiselina, kumarinska kiselina, vanilinska kiselina itd.) i flavonoidi (verbaskozid, luteolin, diosmetin, rutin, apigenin i njihovi derivati). [23] Iako, prema našim saznanjima, utjecaj sekoiridoida masline prema PPO nije istraživan u brojnim studijama je dokazana njihova aktivnost prema ostalim enzimima koji primjerice sudjeluju u pojavi i razvoju različitih neurodegenerativnih oboljenja ili sudjeluju u metabolizmu. [24]

Drugi ekstrakt koji je pokazao dobru aktivnost bio je ekstrakt kurkume, začina koji je također poznat po tome da obiluje fenolnim spojevima, ali i terpenoidima. Među navedenima najznačajniji je kurkumin koji je i zaslužan za intenzivnu žutu boju ovog začina. I ovom spoju je znanstveno dokazana umjerena aktivnost u inhibiciji nekih biološki važnih enzima kao što su kolinesteraze, lipoksigenaze i tripsin [25], dok podaci o učinku na inhibiciju PPO nisu pronađeni.

Posljednji ekstrakt, koji se ujedno pokazao i najučinkovitijim, je bio ekstrakt češnjaka. Različite znanstvene studije su dokazale inhibicijski učinak prema PPO od strane ekstrakata, izolata i čistih spojeva iz češnjaka. [26-28] Yunniarti i sur. [26] su istraživali učinak različitih ekstrakata češnjaka prema komercijalno dostupnim PPO pri čemu su testirane etil-acetatne, kloroformske, acetonske i vodene frakcije ekstrakta češnjaka. Najučinkovitijim se pokazao etil-acetatni ekstrakt koji je enzim inhibirao preko 90 %, dok je vodeni ekstrakt imao učinak od 47 %. U studiji Yapi i sur. [27] također je potvrđena učinkovitost *Allium* vrsta, luka i češnjaka, u inhibiciji PPO. Diken [28] je testirao učinkovitost vodenih ekstrakata češnjaka pripremljenih pri različitim temperaturama (50 i 100 °C) i dokazao znatno bolje djelovanje ekstrakta pripremljenog pri višoj temperaturi iz čega se može pretpostaviti da bi i naši ekstrakti bili potencijalno učinkovitiji ukoliko bi se pripremili pri višoj temperaturi. Naravno, za krajnju potvrdu bila bi potrebna dodatna istraživanja.

Vodeni ekstrakti, koji su u ovom radu korišteni za inhibiciju enzima PPO iz jabuke, imali su različit udio fenola što je potvrđeno u istraživanju rađenom u završnom radu kolegice Tonke Mirjane Rašić [29]. Najviši udio fenola među testiranim ekstraktima imao je ekstrakt klinčića (6230 mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L) koji nije pokazao nikakvu aktivnost u inhibiciji PPO, dok su najniže koncentracije fenola dokazane u ekstraktima kurkume (214 mg GAE/L) i češnjaka (179 mg GAE/L) čija je učinkovitost u inhibiciji PPO dokazana u ovom istraživanju. Navedeno dodatno potvrđuje pretpostavku, odnosno zaključak, da fenolni spojevi iz biljnih ekstrakata nisu zaslužni za inhibiciju enzima.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti da se određeni ekstrakti začinskog i ljekovitog bilja mogu koristiti u svrhu inhibicije PPO. Od osam testiranih biljnih vodenih ekstrakata tri ekstrakta i to: ekstrakti masline, kurkume i češnjaka su uzrokovali inhibiciju enzima PPO, dok su svi ostali ekstrakti imali suprotno djelovanje te su potaknuli enzimsku aktivnost u reakcijskoj smjesi. Također, možemo zaključiti da se navedeni ekstrakti mogu koristiti kao učinkoviti prirodni inhibitori PPO kao zamjena za sintetski inhibitor $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

6. LITERATURA

1. Vinagre F, Silva M, Sulaiman A. Polyphenol oxidase in Fruit and Vegetables: Inactivation by Thermal and Non-thermal Processes, University of Auckland and, University Putra, Malaysia, 2018.
2. He Q, Luo Y. Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce, *Stewart Postharvest Review*, 2007;3(6):1-7.
3. Gudelj A. Praćenje parametara boje i teksture narezane jabuke sorte Cripps pink obrađene antioksidansima i skladištene u kontroliranoj atmosferi, diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
4. Janković I. Izolacija, pročišćavanje i djelomična karakterizacija polifenoloksidaze iz jabuka, diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, 2015.
5. Bušić N. Enzimsko posmeđivanje jabuka, diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, 2014.
6. Fang C. Characterization of polyphenol oxidase and antioxidants from pawpaw (*Asminatribola*) fruit, Master's Thesis, University of Kentucky, SAD, 2007.
7. Yıldız G. Control of enzymatic browning in potato with calcium chloride and ascorbic acid coatings, *Food and Health*, 2019;5(2):121-127.
8. Ansari R, Khan ZM, Mular S, Khan ND. Extraction and characterization of polyphenol oxidase from pulp of apple fruit. *Int. J. App. Res.* 2017;3(1):569-572.
9. <https://browningapplesinvestigation.weebly.com/introduction.html> (preuzeto 22.01.2020.)
10. Bot F, Calligaris S, Cortella G, Plazzotta S, Nocera F, Anese M. Study on high pressure homogenization and high power ultrasound effectiveness in inhibiting polyphenoloxidase activity in apple juice. *J. Food Eng.* 2018;221:70-76.
11. Aydemir T. Selected Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Extracted from *Rosmarinus Officinalis* L. *Int. J. Food Prop.* 2010;13(3):475-485.
12. Rendić I. Utjecaj sorte i različitih sredstava za obradu na održivost minimalno procesiranih krušaka, diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, 2014.

13. Taranto F, Pasqualone A, Mangini G, Tripodi P, MiazziMM, Pavan S, Montemurro C. Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *Int. J. Mol. Sci.*2017;18(2):377.
14. Constabel CP, Barbehenn R. Defensive Roles of Polyphenol Oxidase in Plants, *Induced Plant Resistance to Herbivory*, 2008., Chapter 12, 253-270.
15. <https://www.extrasynthese.com/catechol.html> (preuzeto 3.12.2019.)
16. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/60020?lang=en®ion=HR> (preuzeto 3.12.2019.)
17. Ali HM, El-Gizawy AM, El-Bassiouny REI, Saleh MA. Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products, *J. Food Sci. Tech.* 2015;52(6):3651-3659.
18. Kobeščak M. Određivanje parametara boje i teksture narezane jabuke Cripps pink skladištene u kontroliranoj atmosferi, diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
19. Vamós-Vigyázó L. Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables - a review of principles and practice, *Enzymatic Browning and its Prevention* C. Y. Lee and J. R. Whitaker, American Chemical Society, 1997.
20. Lambrecht HS. Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods, *Enzymatic Browning and its Prevention* C. Y. Lee and J. R. Whitaker, American Chemical Society, 1995.
21. Drobec SD. Praćenje mikrobiološke ispravnosti i senzorskih svojstava narezane jabuke sorte Cripps pink obrađene antioksidansima i skladištene u kontroliranoj atmosferi, diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
22. Olusola L, Oluwatosin A. Extraction of polyphenoloxidase from green and red apple fruits and the effect of pH variation on the activity of the enzyme, *Current Science Perspectives*,2016;2(2)14-18.
23. Generalić Mekinić I, Gotovac M, Skroza D, Ljubenkov I, Burčul F, Katalinić V. Effect of the extraction solvent on the oleuropein content and antioxidant properties of olive leaf (cv. Oblica, Lastovka and Levantinka) extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2014;6(1):7-14.
24. Figueiredo-González M, Reboredo-Rodríguez P, González-Barreiro C, Carrasco-Pancorbo A, Simal-Gándara J, Cancho-Grande B. Nutraceutical Potential of Phenolics from 'Brava' and 'Mansa' Extra-Virgin Olive Oils on the

- Inhibition of Enzymes Associated to Neurodegenerative Disorder in Comparison with Those of 'Picual' and 'Cornicabra'. *Molecules*, 2018;23(4):722.
25. Abbasi MA, Ilyas M, Aziz-ur-Rehman, Sonia A, Shahwar D, Raza MA, Khan KM, Ashraf M, Afzal I, Ambreen N. Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetyl cholinesterase, butyryl cholinesterase and trypsin. *Scientia Iranica C*, 2012;19(6):1580-1583.
 26. Yapi JC, Gnangui SN, Dabonne S, Kouame LP. Inhibitory Effect of Onions and Garlic Extract on the Enzymatic Browning of an Edible Yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv. Kponan) cultivated in Côte d'Ivoire. *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.*, 2015;3(1):219-231.
 27. Yuniarti T, Sukarno, Yuliana ND, Badijanto S. Inhibition of enzymatic browning by onion (*Allium cepa* L.): Investigation on inhibitory mechanism and identification of active compounds. *Curr. Res. Nut. Food Sci.* 2018;6(3)770-780.
 28. Diken ME. Inhibitory effect of garlic extracts on polyphenoloxidase. *J. BAUN Inst. Sci. Technol.*, 2020;22(1);240-247.
 29. Rašić TM, Određivanje antimikrobnog učinka začinskog bilja na *Enterococcus faecalis*, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019.