

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Marko TUHTAR

**VSEBNOST ANTOCIANOV IN DRUGIH SNOVI V
ALKOHOLNEM JAGODNEM IZVLEČKU
EVROPSKEGA ČRNEGA BEZGA (*Sambucus nigra* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Marko TUHTAR

**VSEBNOST ANTOCIANOV IN DRUGIH SNOVI V ALKOHOLNEM
JAGODNEM IZVLEČKU EVROPSKEGA ČRNEGA BEZGA
(*Sambucus nigra* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CONTENT OF ANTHOCYANINS AND OTHER COMPOUNDS IN
ALCOHOLIC BERRY EXTRACT OF THE EUROPEAN
ELDERBERRY (*Sambucus nigra* L.)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti Oddelku za agronomijo na Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo. Analiza bezgovega mošta, vina in starega bezgovega vina je bila opravljena v laboratoriju Katedre za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo., Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Roberta VEBERIČA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Robert VEBERIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Denis RUSJAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Marko TUHTAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 634.747:663.25(043.2)
- KG sadjarstvo/črni bezeg/*Sambucus nigra*/sadno vino
- AV TUHTAR, Marko
- SA VEBERIČ Robert (mentor)
- KZ SI - 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2016
- IN VSEBNOST ANTOCIANOV IN DRUGIH SNOVI V ALKOHOLNEM
JAGODNEM IZVLEČKU EVROPSKEGA ČRNEGA BEZGA (*Sambucus nigra* L.)
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP VIII, 34 str., 26 sl., 25 ref.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Evropski črni bezeg (*Sambucus nigra* L.) postaja čedalje pomembnejša rastlina v raziskavah preventivne medicine, saj je bil že v preteklosti prepoznaven po izrednih zdravilnih lastnostih. Namen diplomskega dela je analizirati vsebnost alkoholnih izvlečkov (sadno vino) in ugotoviti kakovostne parametre, ki bi jih pridelovalci morali zagotoviti. Merili smo vsebnost sekundarnih metabolitov (antocianov iz skupine flavonoidov ter fenolnih kislin) ter vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativni potencial bezgovega vina. Želeli smo preučiti tudi spremembo vsebnosti fenolnih spojin, tako v bezgovem moštu kot tudi v mladem in v starem alkoholnem izvlečku (vinu) iz bezgovih jagod, po treh letih v steklenici. Prav tako smo želeli preveriti, kakšen vpliv imajo te snovi na barvne parametre mošta in bezgovega vina. Ugotovili smo povezavo med vsebnostjo fenolnih spojin in antioksidativnim potencialom v bezgovem vinu ter, da je antioksidativni potencial bezgovega vina enak kot pri rdečem vinu. Od fenolnih spojin je v alkoholnem izvlečku količinsko največ antocianov, ki so v tesni korelaciji z barvnim odtenkom, njihova vsebnost pa se med staranjem vina bistveno zmanjšuje. Podobno smo določili tudi zmanjšanje vsebnosti skupnih fenolov in antioksidativnega potenciala. V primerjavi z večino rdečih vin ima naš alkoholni izvleček zmerno vsebnost etanola, intenzivno rdečo obarvanost in višji pH. V primerjavi z drugimi sadnimi vini ima bezgov alkoholni izvleček tudi večjo vsebnost etanola.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC UDC 634.747:663.25(043.2)

CX fruit growing/black elderberry/*Sambucus nigra*/fruit wine

AU TUHTAR, Marko

AA VEBERIČ, Robert (supervisor)

PP SI - 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy

PY 2012

TI CONTENT OF ANTHOCYANINS AND OTHER SUBSTANCES IN THE
ALCOHOLIC STRAWBERRY EXTRACT OF THE EUROPEAN ELDERBERRY
(*Sambucus nigra* L.)

DT Graduation thesis (University studies)

NO VIII, 34 p., 26 fig., 25 ref.

LA sl

AL sl/en

AB European black elderberry (*Sambucus nigra* L.) is becoming increasingly important in plant research and preventive medicine, as it was in the past, and still is, recognized for its extraordinary health properties. From a technological point of view, the purpose of the thesis is to determine the quality parameters that producers have to achieve for a high quality product. The content of secondary metabolites (anthocyanins, phenolic acids and other flavonoids), as well as the total content of phenolic compounds and anti-oxidative potential of elderberry wine was determined. In addition, we wanted to examine the change in the content of phenolic compounds in elderberry juice and both young and aged elderberry wine. We determined the correlation between the total content of phenolic compounds and antioxidant potential in elder wine, and found that the antioxidant potential of elder wine is similar to that of the red wine, and that the content of total phenolic compounds and antioxidant potential of elder wine are in a close relationship. Among phenolic compounds, the highest part in alcoholic extract is represented by anthocyanins, which are in close correlation with colour shade and their content is significantly decreasing during wine aging. We also determined decrease in total phenolic content and anti-oxidative potential. Compared to most red wines elderberry wine has a moderate concentration of ethanol, intense red coloration and a higher pH value. Compared to other fruit wines elderberry alcoholic extract also has a higher content of ethanol.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 VZROK ZA RAZISKAVO	1
1.2 CILJ RAZISKAVE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA UPORABE ČRNEGA BEZGA (<i>SAMBUCUS NIGRA</i> L.)	3
2.2 RASTNE RAZMERE	4
2.2.1 Izbor rastišča in lega	4
2.2.2 Tla	4
2.3 RAZMNOŽEVANJE BEZGA	5
2.3.1 Razmnoževanje s setvijo	5
2.3.2 Razmnoževanje z olesenelimi potaknjenci	5
2.3.3 Razmnoževanje z grebeničenjem ali osipavanjem	6
2.3.4 Razmnoževanje s cepljenjem	6
2.4 SAJENJE	6
2.4.1 Priprava in zahteve glede tal	6
2.4.2 Sadike in sajenje	6
2.4.3 Nega nasada	7
2.4.4 Rez bezga	7
2.4.5 Negovanje tal in gnojenje	8
2.5 MORFOLOŠKE IN BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI ČRNEGA BEZGA	8
2.5.1 Botanična klasifikacija	8

2.5.2	Listi	8
2.5.3	Socvetje	9
2.6	BEZGOVE JAGODE IN NJIHOVA SESTAVA	9
2.6.1	Barvila	9
2.7	SAMBUNIGRIN - KDAJ IN ZAKAJ JE BEZEG STRUPEN?	10
3	MATERIALI IN METODE	11
3.1	MATERIAL	11
3.2	METODE DELA	11
3.2.1	Kemikalije	15
3.2.2	pH	15
3.2.3	Vsebnost etanola	15
3.2.4	Vsebnost organskih kislin	15
3.2.5	Meritve barve	15
3.2.6	Identifikacija fenolnih spojin HPLC-MS	16
3.2.7	Merjenje vsebnosti skupnih fenolnih spojin	16
3.2.8	Določitev antioksidativnega potenciala z metodo s prostim radikalom DPPH	16
3.2.9	Statistična analiza	16
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	17
4.1	PH IN VSEBNOST SKUPNIH KISLIN	17
4.2	VSEBNOST ETANOLA	18
4.3	BARVNI PARAMETRI MOŠTA IN VINA	19
4.4	POSAMEZNE FENOLNE SPOJINE	20
4.5	VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN IN ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL	27
5	SKLEPI	29
6	POVZETEK	30
7	VIRI	31
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Primer bezgovega nasada iz olesenelih potaknjencev (Tuhtar, 2010).	5
Slika 2: Primer enoletne sadike, skrajšane na približno 1,2 m.	7
Slika 3: Primer bezgovih jagod (Tuhtar, 2010).	10
Slika 4: Ročno razpecljevanje bezgovih jagod (Tuhtar, 2010).	12
Slika 5: Dodajanje 1,5 kg jagod (Tuhtar, 2010).	13
Slika 6: Dodajanje 1 kg saharoze (Tuhtar, 2010).	13
Slika 7: Dodajanje 1,25 g suhega pivskega kvasa (Tuhtar, 2010).	14
Slika 8: Nalivanje vzorcev v 10 l posodo z vrelni veho (Tuhtar, 2010).	14
Slika 9: Povprečni pH s standardno napako bezgovega mošta, bezgovega vina in staranega vina.	17
Slika 10: Povprečna vsebnost vseh analiziranih kislin (g/L) s standardno napako v bezgovem moštu, bezgovem vinu in staranem vinu.	18
Slika 11: Vsebnost etanola % v/v v bezgovem moštu, bezgovem vinu in starem vinu.	18
Slika 12: Intenzivnost barve v bezgovem moštu, bezgovem vinu in starem vinu.	19
Slika 13: Barvni kot v bezgovem moštu, bezgovem vinu in starem vinu.	20
Slika 14: Vsebnost kempferol-3-rutinozida v različnih vinih.	20
Slika 15: Primerjava vsebnosti cianidin-3-rutinozida med različnimi obravnavanji.	21
Slika 16: Primerjava vsebnosti cianidin 3,5-diglukozida med različnimi obravnavanji.	21
Slika 17: Primerjava vsebnosti cianidin 3-sambubizoida med različnimi obravnavanji.	22
Slika 18: Primerjava vsebnosti cianidin 3-sambubizoid-5-glukozida med različnimi obravnavanji.	22
Slika 19: Primerjava vsebnosti cianidin 3-glukozida med različnimi obravnavanji.	23
Slika 20: Skupni antociani v bezgovem moštu, vinu in starem bezgovem vinu.	24
Slika 21: Primerjava vsebnosti kvercetin-3-rutinozida med različnimi obravnavanji.	25
Slika 22: Primerjava vsebnosti kvercetin-3-glukozida med različnimi obravnavanji.	25
Slika 23: Primerjava vsebnosti neoklorogenske kisline med različnimi obravnavanji.	26
Slika 24: Primerjava vsebnosti klorogenske kisline med različnimi obravnavanji.	26
Slika 25: Vsebnost skupnih fenolnih snovi (TPC) v mg GAE/L pri različnih obravnavanjih.	27
Slika 26: Antioksidativni potencial (AP) pri različnih obravnavanjih izražen v ekvivalentih troloksa v mM/l.	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

str.	stran
oz.	oziroma
°C	stopinje Celzija
%	odstotek
npr.	na primer
l.	leta
L	parameter, ki opisuje svetlost
t.j.	to je
TPC	celotna vsebnost fenolnih spojin
AP	antioksidativni potencial
pr.n.š.	pred našim štejetjem
m	meter
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
DPPH	1,1 -difetil-2-pikrilhidrazil
r^2	koeficient korelacije
H	barvni odtenek
CI	barvna intenziteta
MS	masni spektrometer

1 UVOD

1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Za sodoben življenjski slog je značilen hiter tempo in mnogo stresnih situacij, ki pogosto tako ali drugače vplivajo na naše zdravje. Že padec odpornosti je lahko povod za marsikatero bolezen, ki od nas zahteva, da posežemo po raznih zdravilih. Jagode črnega bezga se večinoma uporabljajo kot vir za pridobivanje prehranskih barvil in sestavin za farmacevtske izdelke, prav tako pa tudi za izdelavo sirupov, sokov in alkoholnih izvlečkov (sadna vina). Sok, ki ga iztisnemo iz jagod črnega bezga, vsebuje različne sladkorje in organske kisline, poleg tega pa je tudi bogat vir sekundarnih metabolitov (Bermudez-Soto in Barberan, 2004). Veberič in sod. (2009) so mnenja, da so bioaktivne sestavine, antociani, kvercetini in hidroksicimetne kisline v bezgovem soku zelo učinkovite pri boju proti oksidativnemu stresu in zmanjšujejo oksidativne poškodbe v človeškem telesu. Czyzowska in Pogorzelski (2002) navajata, da se med pridelavo grozdnega in sadnega vina (v našem primeru gre za bezgovo vino) sestava in vsebina polifenolnih spojin precej spremenita, kar je posledica tako razgradnje sadja kot tudi fermentacije in zorenja. Z alkoholno fermentacijo jagod črnega bezga dobimo intenzivno vijolično-rdeče obarvano bezgovo vino, ki vsebuje zelo veliko barvil antocianov, pa tudi celotna vsebnost fenolnih spojin je podobna rdečim vinom (Rupasinghe in Clegg, 2007). Na podlagi obstoječe literature in raziskav smo želeli ugotoviti, ali je zmerno uživanje rdečih vin povezano z zmanjšanim tveganjem nastanka srčnih bolezni. To nas je spodbudilo k nadaljnjemu odkrivanju področja antioksidativne dejavnosti in vsebnosti polifenolnih spojin v rdečih vinih. Informacij o fenolnem profilu bezgovega vina je zelo malo, zato lahko analiza sestavin bezgovega vina ter fenolnih spojin opozori na njegove zdravju koristne lastnosti. Kaack in sod. (2008) navajajo, da naj bi v vinu črnega bezga našli tudi nekatere koristne sestavine bezgovega soka, kot so npr. kvercetin-3-rutinozid, klorogenska kislina in različni glikozidi cianidina.

1.2 CILJ RAZISKA VE

Namen diplomskega dela je preveriti vsebnost sekundarnih metabolitov (flavonoidov, med njimi zlasti antocianov in fenolnih kislin), vsebnost skupnih fenolov, antioksidativni potencial bezgovega vina in vsebnost vitamina C. Poleg tega smo z diplomskim delom želeli proučiti spremembo vsebnosti fenolnih spojin, zlasti antocianov, med spreminjanjem bezgovega mošta v vino ter njihovo povezavo z barvno sestavo bezgovih proizvodov. Profile fenolnih spojin smo analizirali tako v mladem kot tudi v starem bezgovem vinu (t.j. po treh letih v steklenici). Raziskave nam bodo pomagale predstaviti razlike v sestavi in kakovosti bezgovega mošta, vina in starega vina.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom raziskave predstavljamo hipoteze, ki jih bomo na podlagi preučevanja literature ter analize rezultatov ob koncu raziskave potrdili ali zavrgli ter tako ovrednotili. Na podlagi hipotez, ki nas bodo usmerjale k središču problema, želimo ugotoviti naslednje:

- vsebnost antocianov se z vinifikacijo povečuje,
- mošt, vino in staro vino se razlikujejo v vsebnosti antocianov,
- predvidevamo spremembo barve staranega vina,
- vsebnost antocianov v bezgovem vinu v primerjavi z moštom, vinom in starim vinom je večja,
- posledica reakcije polimerizacije med antociani in tanini je zmerno povečanje intenzitete in tona barve pri vseh vzorcih in
- vsebnost skupnih fenolov in antioksidativnega potenciala se med hrambo vina zmanjšata.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA UPORABE ČRNEGA BEZGA (*Sambucus nigra* L.)

Človek je črni bezeg kot uporabno rastlino odkril že zelo zgodaj, saj so ga očitno pred več tisočletji poznali že evropski koliščarji. V ostankih njihovih naselij so arheologi namreč poleg drugih semen našli tudi bezgova. Raziskovalci v Švici in Italiji so odkrili, da je jagode črnega bezga uporabljal že pračlovek. V antičnem Egiptu so našli tudi recepte za zdravila, ki temeljijo na tem sadežu. Pisni viri dokazujejo, da je z bezgovim cvetjem in jagodami zdravil znameniti starogrški zdravnik Hipokrat (okrog 460-377 pr.n.š.) in bezeg poimenoval kar »domača lekarna«. Bezeg je poznal tudi starogrški oče botanike Teofrast (okrog 370-287 pr. n. š.). V svoji knjižni zbirki *Naturalis Historiae* ga omenja starorimski zgodovinar Plinij Starejši. Bezeg ne manjka niti na najobširnejšem seznamu zdravilnih snovi starega veka, ki ga je sestavil rimski vojaški zdravnik Dioskurid okrog leta 50. pr.n.š. Pozneje je to zdravilno rastlino prevzela srednjeveška medicina. Tudi naši predniki, stari Slovani, so poleg različnega divjega sadja (kot npr. plodovi gloga, dreva in šipka) poznali in uživali tudi bezgove jagode. V slovenski ljudski medicini sodi bezeg med univerzalna zdravila za vse bolezni - tako kot brinove jagode, česen, hren, kamilica, lipa, pelin, trpotec, žajbelj. V mnogih slovenskih krajih je bil bezeg priljubljen kot zdravilo proti vodenici. Liste so namakali v vodi ali žganju in če je bolnik zjutraj in zvečer popil po tri lote te pijače, je pregnal ves otok in si pomagal pri delovanju ledvic. Listje ali lubje v poparku naj bi bilo koristno za kopeli pri otečenih nogah. Bezgova voda naj bi pomagala pri normalnem delovanju jeter pri zlatenici. Ponekod so s tem zeliščem zdravili grižo, spet drugod so jo imeli za lokalno zdravljenje raznih kožnih izpuščajev. Na trdovratne, slabo celjene rane so polagali bodisi bezgove liste bodisi lubje (Neuhold, 1999).

Da bezeg ni čisto navadna zdravilna rastlina, temveč tudi kultna rastlina, dokazujejo različna z njim povezana vedeževanja. V prejšnjih časih so dekleta iz Koroške Podjune na kresni večer rada zatekala h kakšnemu bezgovemu grmu, če so se hotela čim prej omožiti. Tudi v drugih slovenskih pokrajinah so samska dekleta na tak način iskala svojega morebitnega soproga (Neuhold, 1999).

Glede na slovensko ljudsko izročilo naj bi bezeg varoval hišo in živino pred uroki. V njem od pradavnine prebivajo dobra božanstva. Kdor bi ga posekal, bi zato nad hišo in družino priklical nesrečo. Stara ljudska modrost uči, da kadar greš mimo bezga, se mu odkrij. Cvet črnega bezga pomaga tudi pri prehladu. Včasih so črni bezeg imenovali kar »zdravilna skrinjica kmečkih ljudi«. V povezavi z bezgom so povezane številne vraže in verovanja. Naši predniki so verjeli, da v njem živijo dobri hišni duhovi, ki skrbijo za našo varnost in dobro počutje. Razne »coprnike« in vse, ki bi nam želeli škodovati z uroki, opozarja, da jih tukaj spremlja budno oko, tako da so povsem brez moči (Neuhold, 1999).

Bezgove jagode vsebujejo veliko vode, beljakovin, maščob, ogljikovih hidratov balastnih snovi, flavonolne in antocianske glikozide, čreslovine, barvila, grenčine, vosek, sladkorje,

cianogene glikozide, malo eteričnega olja, veliko vitaminov (A, B1, B2, C in E ter novo odkriti vitamin J, ki preprečuje nastanek pljučnice) ter različne sadne kisline (jabolčna kislina, baldrijanova kislina) in rudnine. V zrelih plodovih je približno osem odstotkov sladkorja in vsebujejo petkrat več črnoordečih antocianskih barvil kot robidnice. Med mineralnimi snovmi je zelo veliko železa, in sicer 14 mg/l. Po navedbah Willfort-a (2006) se največje koncentracije antocianov nahajajo v zrelih bezgovih jagodah. Antociani naj bi imeli antioksidativno aktivnost in se jih raziskuje zaradi njihovega protirakavega potenciala. Antociani naj bi v telesnih celicah opravljali zaščitno funkcijo pred morebitno škodo, ki jo povzročajo prosti radikali (Willfort, 2006).

Antioksidanti uničujejo poškodovane oziroma bolne celice, zdravih pa ne poškodujejo in ostanejo popolnoma nedotaknjene. Ti izsledki lahko pomenijo učinkovito alternativo kemoterapiji in radioterapiji, saj v nasprotju s tema dvema načinoma zdravljenja antioksidanti zdravih celic ne poškodujejo. Visoka vsebnost fenolnih spojin iz skupin kvercetinov, hidroksicimetnih kislin in antocianov kaže, da lahko uživanje bezgovega vina pomaga pri preprečevanju marsikaterih obolenj, ki se pojavijo med staranjem, saj so te spojine učinkoviti dejavniki, ki preprečujejo nastanek bolezni (Vrhovšek, 2000).

2.2 RASTNE RAZMERE

2.2.1 Izbor rastišča in lega

Črni bezeg raste v povsod zmernem pasu. Včasih je veljal za precej nezahtevno sadno vrsto, kar pa za intenzivno pridelavo ne drži popolnoma in zaradi takšnega prepričanja je veliko bezgovih nasadov propadlo. Zdaj vemo, da ima, kakor vsaka druga sadna rastlina, tudi črni bezeg posebne zahteve glede lege, podnebja in tal (Krajnc M. in Krajnc K., 2002)

Črni bezeg lahko sadimo tudi na legah, ki za pridelovanje jabolk in hrušk niso primerne zaradi zastajanja hladnega zraka. Ker cveti šele v začetku junija, ni nevarnosti, da bi cvetovi pozebli. Bezeg zelo slabo prenaša vetrovne lege, saj sunki vetra lomijo poganjke in zavirajo rast. Na legah nad 600 m nadmorske višine bezeg marsikatero leto ne dozori, poleg tega pa lahko hladnejše in vlažnejše vreme na takšnih nadmorskih višinah povzroči osipanje cvetov (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.2.2 Tla

Za črni bezeg so značilna sveža, dobro prehranjena, srednje težka, z rudninami, dušikom in fosfati bogata tla. Tam kjer bezeg uspeva, so v tleh prisotne večje količine dostopnega fosfata, kalija ter mineraliziranega dušika. Slabo prenaša težka tla, zaradi močnega izpiranja pa so neprimerna tudi lahka peščena tla. Črni bezeg ima gost koreninski sistem, ki se razrašča plitvo pod površino, zato ne smemo rahljati tal, da ne bi pri tem poškodovali korenin (Toplak Galle, 2002).

2.3 RAZMNOŽEVANJE BEZGA

Bezega se sorazmerno lahko razmnožuje. Divje oblike se razmnožijo s semenom s pomočjo ptic, ki se do začetka novembra hranijo z bezgovimi jagodami in z iztrebki raznašajo semena. Drugi način je razmnoževanje s koreninskimi izrastki. Sorte bezga najpogosteje razmnožujemo z lesnatimi potaknjenci, lahko pa uporabimo tudi zelene potaknjence. Nekatere sorte, ki se težko ukoreninjajo, razmnožujemo s cepljenjem na posebej gojene podlage ali pa z grebeničenjem (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.3.1 Razmnoževanje s setvijo

Do velikega števila sadik lahko pridemo s setvijo semen. Masa tisočih semen znaša le 2,5 g. Kaljivost je zelo dobra, vendar pa zaradi močnih cepitev dednih lastnosti dobimo veliko število neizenačenih rastlin, zato strokovnjaki razmnoževanje s semeni močno odsvetujejo (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.3.2 Razmnoževanje z lesnatimi potaknjenci

Gre za najpogostejšo obliko razmnoževanja. Dobro olesenele poganjke po odpadanju listja in še pred nastopom nizkih temperatur porežemo. Potaknjenci morajo biti dolgi okrog 20 cm z dvema do tremi kolenci. Spodaj jih odrežemo tik pod kolencem, zgoraj pa jim nad kolencem pustimo dva cm dolg čep. Lahko jih takoj posadimo v pripravljena tla ali jih zvežemo v šope in jih vkopljemo v vlažen pesek, kjer ostanejo do pomladi. Sadimo jih v vrste z razdaljo 1 m in razmikom 30 cm v vrsti (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).



Slika 1: Primer bezgovega nasada iz lesnatih potaknjencev (Tuhtar, 2010).

2.3.3 Razmnoževanje z grebeničenjem ali osipavanjem

Potaknjenci nekaterih sort se težko ukoreninijo, zato te sorte razmnožujemo z grebeničenjem oziroma osipavanjem. Pri tem matične rastline v zarodišču med letom večkrat osipavamo in jih s tem spodbudimo k tvorbi stranskih poganjkov, ki v zemlji razvijejo korenine. Tako dobimo mlade rastline, ki jih v drevesnici gojimo enako kot rastline iz potaknjencev (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.3.4 Razmnoževanje s cepljenjem

Nekatere sorte, ki se nerade ukoreninijo, razmnožujemo s cepljenjem. Cepimo spomladi, ko se lub vejic lahko loči od lesa. Najuspešnejše je žlebičkanje, kjer spojeno podlago in cepič na spojnem mestu prevezemo z rafijo in premažemo s cepilno smolo ter tako cepljene podlage posadimo v drevesnico in gojimo podobno kot ukoreninjene in neukoreninjene potaknjence (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.4 SAJENJE

2.4.1 Priprava in zahteve glede tal

V tleh mora biti 2 % humusa in pH med 6,0 in 6,5. Vsebnost ostalih elementov zadošča že v količinah, ki so predvidene za jabolane, in sicer fosfor (P_2O_5) 11–25 mg/100g tal in kalij (K_2O) 11–32 mg/100g tal (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

Krajnc M. in Krajnc K. (2002) navajata, da je bezeg primeren za ekološko pridelavo, kar pomeni, da:

- uporabljamo samo dovoljena organska gnojila;
- za zatiranje plevela pod drevesi ne uporabljamo herbicidov in sintetičnih pesticidov proti boleznim in škodljivcem. Pri tem nam je v veliko pomoč tudi bezgova naravna odpornost in prilagodljivost.

Tla podrahljamo do globine 60 cm in obračamo do globine 30 cm. Pri tem upoštevamo, da je bezeg občutljiv na zastajanje vode v tleh, zato moramo obvezno razbiti neprepustne plasti vsaj do globine 60 cm. Pri stalnem zamakanju tal položimo drenažne cevi ali poskrbimo za odvod vode z odprtimi jarki. Pred sajenjem obdelamo brazdo s frezo ali krožno brano (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.4.2 Sadike in sajenje

Sadike sadimo le v dobro pripravljenih tleh. Dobro razvite enoletne sadike, ki merijo v višino vsaj 1,5 m, skrajšamo na približno 1,2 m in tako dobimo deblo višine približno 1 m in krošnjo s 3 do 5 vejami. Pri sajenju poganjke skrajšamo na čepe z dvema očesoma in iz njih se že v letu sajenja razvijejo 3 do 4 rodne šibe. V medvrstni razdalji ga sadimo 5 do 6 m in v vrsti

3,5 do 4 m. Zaradi plitvih korenin 2 do 3 leta nujno potrebuje kol oziroma oporo. Sadimo ga zgodaj spomladi (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).



Slika 2: Primer enoletne sadike, skrajšane na približno 1,2 m.

2.4.3 Nega nasada

Pod drevesi vzdržujemo pas brez plevelov. Zeli med vrstami mulčimo. Odstranjujemo tudi vse koreninske izrastke in izrastke iz debla pod krošnjo (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.4.4 Rez bezga

Pozno jeseni ali pozimi, v stanju mirovanja bezga, izbiramo močne enoletne poganjke (od 7 do 25), pri tem pa pazimo, da so ti dovolj močni in po možnosti poganjajo čim bliže osnove nosilne veje. Na isti način odstranjujemo stari les. Če je premalo enoletnih poganjkov,

pustimo dvoletne, ki jim skrajšamo stranske poganjke na 2 kolenci. Priporočeno je tudi izvajanje poletne rezi 8 do 10 dni po začetku cvetenja, s čimer zagotovimo boljšo osvetlitev kobulov in brstov, odstranimo konkurenčne poganjke in si posledično olajšamo delo pri obiranju. Zaradi možnosti vpliva zunanjih dejavnikov, kot so npr. vremenske spremembe, divjad itd. pustimo 3 do 4 rezervne poganjke. Na rodni vejah odstranimo poganjke, ki ne cvetijo ali cvetijo prepozno. Vrhove rodni vej rahlo prikrajšamo (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.4.5 Negovanje tal in gnojenje

Priporočljivo je gnojenje z vsemi vrstami organskih gnojil. V kolikor je cvetni nastavek zelo velik, dodatno gnojimo z dušikom še po cvetenju, in sicer do 400 kg dušika po ha. (Krajnc M. in Krajnc K., 2002).

2.5 MORFOLOŠKE IN BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI ČRNEGA BEZGA

2.5.1 Botanična klasifikacija

Družino kovačnikovk štejemo med dvokalične zraslovenčnice grmaste rasti ali ovijalke z nasprotno razvrščenimi listi, povezanimi pri dnu prek pecljev. Dvospolni cvetovi so 5-številni s podraslo plodnico, ki se razvije v jagodo ali orešček (Spanring, 1997).

Sistematiki ločijo 13 rodov z nad 300 vrstami v 4 poddružinah, med katerimi Sambucaceae nekateri celo izločijo kot samostojno družino z rodovoma bezgov evrazijskega porekla in *Triosteum* s 6 vrstami iz Himalaje in vzhodne Azije in 4 vrstami iz severne Amerike, od katerih še danes v Ameriki uporabljajo jagode kot nadomestek kave (*T. perfoliatum* L.). Rod bezeg je bogatejši s 40 vrstami, razširjenimi po vsej zemeljski obli, razen ob ekvatorju. Od 11 vrst, ki jih ljudje izkoriščajo, samo 2 vrsti rasteta pri nas, tretja (*S. racemosa*) pa ni uporabna. Za bezeg so značilni pernat listi, plod pa ima trisemensko jagodo, ki se razvije v kobulastih socvetjih (Spanring, 1997).

2.5.2 Listi

Listi črnega bezga merijo 3–9 cm, so jajčasti, jajčasto-suličasti ali jajčasto-elipsasti in so priostreni ter nazobčani, zmerno poraščeni z dlakami na spodnjih venah. Spodnji par lističev ima kratko steblo (4–5 mm), ostali lističi so brez peclja. Listni pecelj meri 3–4 cm in je globoko brazdast na zgornji površini, prilistov ni ali pa jih je zelo malo in so šilasti. Zalistni popki so trikotne oblike, rdečkaste barve, merijo pa 2–3 mm. Listje in mladi poganjki imajo neprijeten vonj. Steblu podobni posebni cvetni nektarji (5–10 mm x 1 mm) se nahajajo ob korenu listov in lističev (Spanring, 1997).

2.5.3 Socvetje

Socvetje je pakobul s ploskim vrhom s premerom 10–20 cm in s petimi osnovnimi cvetnimi jezički. Cveti so 5-delni in aktinomorfni, rob cvetne čaše je izredno majhen, cvetni venec je zarotiran s kratko cevjo in s ploskim robom cvetne čaše, cvetni premer meri 5 mm, cvetni venec je kremasto bele barve in ima prijeten vonj. Prašniki so zunanji in kremaste barve. Vrat je kratek, s 3–5 brazdami na cvetnem pestiču. Plod je koščičast, meri 6–8 mm, kroglaste oblike, črne barve, redko zelenkast, vsebuje pa 3–5 stisnjenih semen. Pelodna zrna so blede rumena, elipsoidna, gosto gomoljasta (Spanring, 1997).

2.6 BEZGOVE JAGODE IN NJIHOVA SESTAVA

Bezgovci plodovi oz. jagode imajo po tri semena rjave barve, ki so jajčaste oblike. Jagode so najprej zelene, nato rjavo-rdeče, ko dozori, pa so črne in svetleče. V prehrambeni industriji in zdravstvu se poleg črnega uporablja tudi beli bezeg.

Bezgove jagode gojijo v komercialne namene na Danskem, in sicer kot barvila v sokovih in v domačih garniturah za vino. Kaack (1989) je opisal izbor štirih novih genotipov *S. nigra*, ki temeljijo na podlagi mase jagod na gram, vsebnosti antocianinov, števila pokončnih poganjkov ter vonja.

V stisnjem bezgovem soku iz jagod je 2 g/l dušika, ki predstavlja dragoceno osnovo za tvorbo zelo kakovostnih aminokislin in beljakovin, ki so nujno potrebne za življenje. 69 % dušika v jagodah predstavljajo aminokisljine (Neuhold, 1999). Mineralnih snovi na liter bezgovega soka je 8 g, velik delež pri teh mineralnih snoveh predstavljata predvsem kalij in fosfor. Med mineralnimi snovmi je tudi zelo veliko železa, in sicer kar 14 mg/l. Svež bezgov sok je izjemno bogat z vitamini, še posebej z vitaminom C in vitamini B skupine, vse druge sokove pa prekaša po deležu čreslovin, saj jih ima približno 4 g/l (Neuhold, 1999).

2.6.1 Barvila

Sidor in Gramza-Michalowska (2015) navajata, da je barva bezgovih jagod produkt antocianov, ki spadajo v skupino flavonoidov. Tako intenzivno barvo tvori v glavnem cianidin-3-glukozid. Poleg tega črni bezeg vsebuje še cianidin-3-sambubiozid in cianidin-3-sambubiozid-5-glukozid.

Iz bezgovih jagod se pripravijo barvila temnejših odtenkov. Uporabljajo se kot naravna barvila v hrani in pijači, primerna pa so tudi pri neposrednem označevanju živil, kot je npr. žigosanje mesa in sira (Krajnc M. in Krajnc K., 2002). Na ravni Evropske skupnosti je na uradni spletni strani Prava evropske skupnosti (EUR-Lex) v dokumentu 31994L0036 uporaba barvil za živila določena v Direktivi 94/36/ES Evropskega parlamenta in Sveta (z dnem 30. junija 1994) ter v Uredbi Evropskega parlamenta in Sveta št. 1333/2008 (z dnem 16. decembra 2008) o aditivih za živila.

Bridle in Timberlake (1997) navajata, da je pri bezgovih jagodah barvni učinek v primerjavi z drugimi živili nekajkrat trajnejši in tudi odpornejši na svetlobo ter na spremembe temperature in kislosti.

Wang in sod. (1997) navajajo, da je vloga antocianov v rastlinah privabljanje oprasovalcev in raznašalcev semen, odpornost rastlin pred napadi insektov in zaščita pred poškodbami UV žarkov, ter pri tem ugotavljajo, da ima antocian takšen zaščitni učinek tudi na celice živali.

Bridle in Timberlake (1997) sta zapisala, da se antociani uporabljajo tudi kot naravna barvila za živila ter obsegajo največjo skupino v vodi topnih barvil v rastlinskem svetu. Prav tako sta ugotovila, da je barvitost rož in sadja od rdeče do modre v glavnem posledica vsebnosti različnih antocianov.

2.7 SAMBUNIGRIN - KDAJ IN ZAKAJ JE BEZEG STRUPEN?

Neuhold (1999) navaja, da se cianogeni glikozid sambunigrin nahaja v surovih, predvsem pa v nezrelih jagodah in lahko povzroča zastrupitev, ki se kaže kot slabost z bruhanjem. Uničimo ga s segrevanjem (pasterizacijo) ali z obdelavo z encimom β -glukozidazo, da razpade v mandljevo in cianovodikovo kislino ter glukozo. Vendar je treba poudariti, da popolnoma zrele jagode nimajo sambunigrina, ravno tako pri uporabi cvetja za izdelavo pijač in različnih sladic niso potrebni ukrepi za zmanjšanje količine sambunigrina. Neuhold (1999) nadalje tudi omenja, da ima fermentiran bezgov sok približno 2 mg cianovodikove kisline na liter. Takšna vsebnost pa velja za popolnoma nenevarno.

Uživanje bezga ni priporočljivo med nosečnostjo in dojenjem, in sicer zaradi možnosti dehidracije. Iz istega razloga bezgovih produktov ni priporočljivo uživati tudi med težkimi fizičnimi deli (Neuhold, 1999).



Slika 3: Primer bezgovih jagod (Tuhtar, 2010)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

Vzorci jagod črnega bezga smo avgusta 2006 nabrali v okolici Šentjurja s petih različnih grmov, ki rastejo v vzhodni pokrajini Slovenije (nadmorska višina 244 m; geografska širina 46,15 °N, geografska dolžina 15,15 °E). Šesti vzorec je predstavljal skupek vseh petih vzorcev za to območje in klimatske razmere.

3.2 METODE DELA

Za našo raziskavo smo opravili naslednje metode:

- 1) modificiranje starega recepta,
- 2) razpecljevanje jagod,
- 3) ločevanje jagod,
- 4) vrenje in raztapljanje saharoze,
- 5) segrevanje in ohlajevanje mase,
- 6) shranjevanje mase in maceracija,
- 7) fermentacija,
- 8) vrenje,
- 9) ustekleničenje in shranjevanje vina in
- 10) ponovna analiza

Bezgovno vino je bilo pridelano po starem receptu-ustnem izročilu, ki smo ga ustrezno modificirali; 1,5 kg jagod iz vsakega grmovja smo razpecljali in jih primerno ločili v plastičnih posodah. V primerno velik emajliran lonec smo natočili 3,5 l vode, stresli vanjo 1 kg saharoze in maso zavreli, da se saharoza raztopi. Nato smo tej mešanici dodali 1,5 kg jagod in maso ponovno segreli na 86 °C. Mešanice se ne sme prevreti. Potem, ko smo mešanico ohladili na 32 °C, smo ji dodali 1,25 g suhega pivskega kvasa (Uvaferm BDX; Lallemand, Langlois, Avstrija) in mešanico prenesli v 10 l stekleno posodo, ki smo jo zamašili z vrelna veho. Le-ta ima namen omogočiti uhajanje CO₂, na drugi strani pa preprečuje vdor bakterij očetne kisline. Ta postopek smo ponovili za vsak vzorec posebej. Vzorci so bili v stekleni posodi 10 dni. Po končani maceraciji smo vzeli prve vzorce bezgovega mošta. Nato smo nadaljevali z dvomesečnim postopkom fermentacije, in sicer pri maksimalni temperaturi prostora 20±2 °C. Vrenje, ki je v začetku burno, nato pa vedno bolj umirjeno, je mogoče lepo spremljati, če opazujemo vrelna veho, po kateri uhaja CO₂. Hitreje kot poteka proces vrenja, bolj je zanesljivo, da bo bezgovno vino dobre kakovosti. Najbolje poteka vrenje v prostoru s stalno temperaturo okrog 20 °C. V hladnejši kleti je prepočasno in se utegne celo ustaviti. Namesto bezgovega vina bi v tem primeru dobili bezgov kis.

Tudi previsoke temperature niso dobre za pravilno vrenje, ker obstaja nevarnost, da bo prav tako namesto vina nastal kis. Ob koncu je treba opozoriti, da pri pripravljanju bezgovega

vina, in prav tako pri pripravljanju drugih sadnih vin, sadje in sok ne smeta priti v dotik s kovinskimi posodami ali predmeti (zajemalkami, lijaki itd.) Stik s kovino lahko poleg barve vpliva tudi na okus in kakovost.

Na koncu smo bezgovo vino ustekleničili, jagode zavrgli in ga shranili v temi pri 20 °C do nadaljnje analize, kjer smo prav tako analizirali staro bezgovo vino po triletnem hranjenju v steklenicah. Pri vsaki obdelavi smo izmerili pet dvojnikov. Pridobili smo informacije, ki so nam služile za obravnavanja pH vrednosti in skupnih kislin. Prav tako smo izmerili vsebnost etanola in barvne parametre v bezgovem moštu, vinu in starem vinu, identificirali deset fenolnih spojin in določili antioksidativni potencial v vseh vzorcih.



Slika 4: Ročno razpecljevanje bezgovih jagod (Tuhtar, 2010)



Slika 5: Dodajanje 1,5 kg jagod (Tuhtar, 2010)



Slika 6: Dodajanje 1 kg saharoze (Tuhtar, 2010)



Slika 7: Dodajanje 1,25 g suhega pivskega kvasa (Tuhtar, 2010)



Slika 8: Nalivanje vzorcev v 10 l posodo z vrelni veho (Tuhtar, 2010)

3.2.1 Kemikalije

Za identifikacijo in kvantifikacijo kemijskih sestavin bezgovega soka in vina smo uporabili naslednje standarde: jabolčno kislino, citronsko kislino, fumarno kislino, šikimsko kislino, cianidin-3-glukozid in kvercetin-3-glukozid podjetja Fluka Chemie (Buchs, Švica), klorogensko kislino, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) in kvercetin-3-rutinozid podjetja Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Nemčija). Za mobilne faze smo uporabili naslednje kemikalije: acetonitril (HPLC čistost) in mravljinčno kislino podjetja Fluka Chemie. Vodo, ki smo jo uporabljali pri pripravi vzorcev, raztopin in za analizo, smo dvakrat destilirali in jo prečistili s sistemom za čiščenje vode Milli-Q podjetja Millipore (Bedford, MA).

3.2.2 pH

pH bezgovega mošta in vina smo izmerili s pH metrom (S20 SevenEasy; Mettler Toledo, Columbus, Ohio).

3.2.3 Vsebnost etanola

Koncentracijo etanola in bezgovega vina smo izmerili s parno destilacijo (Polydest; Gravitech, Rodgau, Nemčija).

3.2.4 Vsebnost organskih kislin

Posamezne organske kisline smo analizirali po metodi, ki sta jo opisala Šturm in Seger (2007), pri čemer smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC; Thermo Scientific, Finnigan Spectra System, Waltham, Massachusetts). Celokupno vsebnost organskih kislin v g/l smo dobili tako, da smo sešteli posamezne organske kisline v bezgovem moštu in vinu. Za vsako analizo smo injicirali 20 μ l vzorca. Organske kisline smo analizirali s kolono Rezex za organske kisline (300 mm x 7,8 mm; Phenomenex, Torrance, Kalifornija) in UV detektorjem z nastavitvijo na 210 nm s pretokom 0,6 ml min⁻¹, pri tem pa smo vzdrževali temperaturo kolone na 65 °C. Za mobilno fazo smo uporabili 4 mM žveplove kisline (H₂SO₄). Koncentracije organskih kislin smo izračunali z uporabo ustreznih zunanjih standardov.

3.2.5 Meritve barve

Za določitev barvne intenzitete (CI) in barvnega kota (h) bezgovega mošta in vina smo uporabili pufersko raztopino destilirane vode, katere pH smo z žveplovo kislino uravnali na 4,0. S pufersko raztopino smo mošt in vino razredčili v razmerju 1:10. V kivetih smo s spektrofotometrom Lambda Bio 20 UV/VIS (Perkin-Elmer, Waltham, MA) določili barvne parametre. CI in h smo izračunali iz meritev absorpcije, ki smo jih dobili pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm (Kaack in sod., 2008).

3.2.6 Identifikacija fenolnih spojin HPLC-MS

HPLC analizo smo izvedli s pomočjo sistema Surveyor HPLC v kombinaciji z DAD detektorjem. Za identifikacijo antocianov in drugih fenolnih spojin v bezgovem moštu in vinu smo uporabili masni spektrometer (LCQ Deca XP MAX, Thermo Scientific) z elektropray ionizacijo (ESI). Spektre ionov smo snemali v območju med m/z 115 in 1000. Injekcijski volumen je bil 10 μl in hitrost pretoka mobilne faze 1 ml min^{-1} . Spektralne podatke smo zajeli s pomočjo programske opreme Excalibur (Thermo Scientific). Identifikacijo vrhov smo potrdili s primerjavo retencijskega časa ustreznih standardov. Količine vseh spojin smo navedli v mg/l .

3.2.7 Merjenje vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolnih spojin (TPC) v bezgovem moštu in vinu smo izmerili s Folin-Ciocalteu reagentom (Šturm in Seger, 2007). 100 μl razredčenega vzorca (1:2 v/v metanola) smo dodali 6 ml dvakrat destilirane vode in 500 μl Folin—Ciocalteu reagenta. Ko je preteklo od 8 s do 8 min pri sobni temperaturi, smo tej raztopini dodali še 1,5 ml natrijevega karbonata (20 % w/v) in 1,9 ml dvakrat destilirane vode. Te ekstrakte smo zmešali in jih pustili stati 30 min na 40 °C preden smo s spektrofotometrom Lambda Bio 20 UV/VIS (Perkin-Elmer) izmerili absorpcijo pri valovni dolžini 765 nm. Za slepi vzorec smo uporabili mešanico vode in reagentov. Vsebnost skupnih fenolnih spojin je bila izražena z ekvivalenti galne kisline (GAE) v mg/l . Absorpcijo smo merili v treh ponovitvah.

3.2.8 Določitev antioksidativnega potenciala z metodo s prostim radikalom DPPH

Antioksidativno aktivnost v bezgovem moštu in vinu smo izmerili po metodi DPPH (2,2-difenil-2-pikrilhidrazil) z manjšimi prilagoditvami (Brand-Williams in sod., 1995). Najprej smo 50 μl razredčenega vzorca (1:4 v/v metanola) razporedili v mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami in dodali 200 μl 0,1 mM metanolne raztopine DPPH ter vzorce pustili delovati v temi in na sobni temperaturi. Potem smo s spektrofotometrom (Perkin-Elmer) na vsakih 5 min izmerili zmanjšanje absorpcije radikala DPPH pri 520 nm, dokler se ni absorpcija stabilizirala (30 min). Za slepi vzorec smo uporabili metanol. Vse vzorce smo pripravili v treh primerkih. Za določitev antioksidativnega potenciala (AP) vzorcev pri različnih koncentracijah smo uporabljali umeritveno krivuljo troloksa. Antioksidativno dejavnost prostega radikala DPPH v bezgovem moštu in vinu smo izrazili kot ekvivalente troloksa v mM/l .

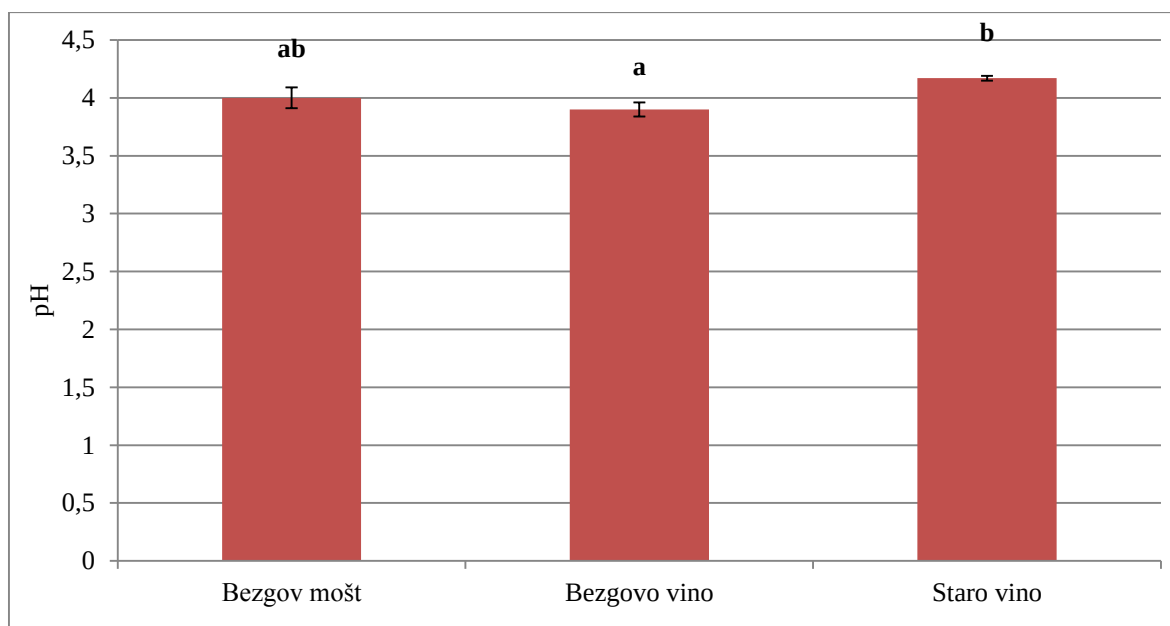
3.2.9 Statistična analiza

Rezultate smo statistično analizirali s programom Statgraphics Plus za Windowse 5.0 (Herndon, Virginia). Z enosmerno analizo variance (ANOVA) in z LSD testom smo izračunali razlike med obravnavanji za vse merjene lastnosti in analizirane snovi. P -vrednosti, ki so bile manjše kot 0,05, smo privzeli kot statistično značilne.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

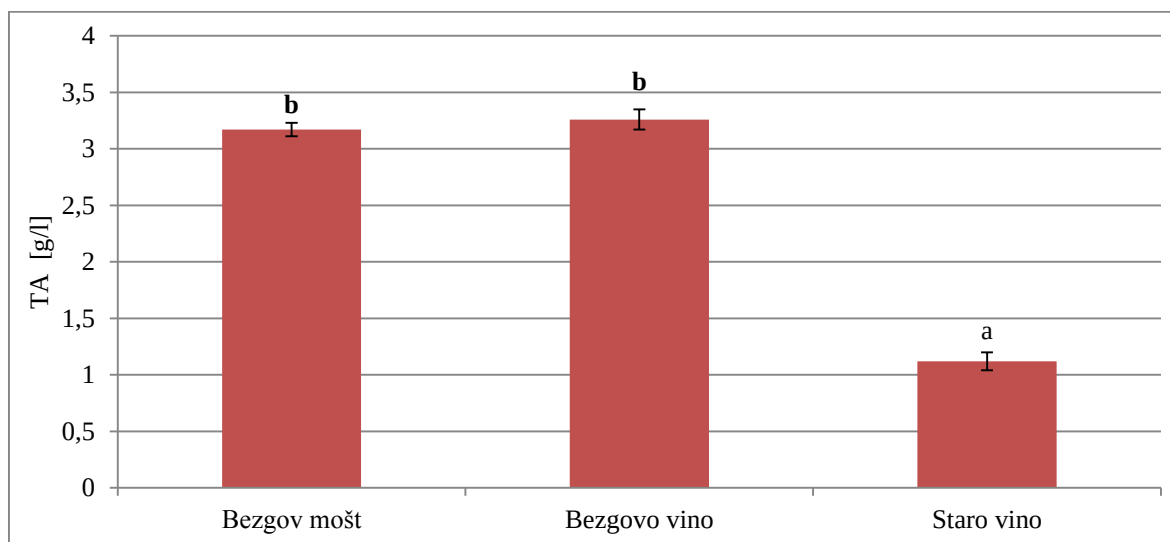
4.1 pH IN VSEBNOST SKUPNIH KISLIN

pH bezgovega mošta je bila bistveno večja od vrednosti, izmerjene pri bezgovem vinu (slika 9). pH rdečih vin je v razponu med 3,0 in 3,7 (Chung in sod., 2008), zaradi česar je bezgovo vino manj kislo, vendar pa so nekateri avtorji izmerili večja pH za grozdna in druga sadna vina – podobno kot poročajo o zorenju in hrambi rdečega vina in vina iz kivija (Guadalupe in Ayestaran, 2008). Iz slike 9 razberemo, da se je pH bezgovega vina bistveno povečal tudi tekom treh let zorenja v steklenicah.



Slika 9: Povprečni pH s standardno napako bezgovega mošta, bezgovega vina in staranega vina. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

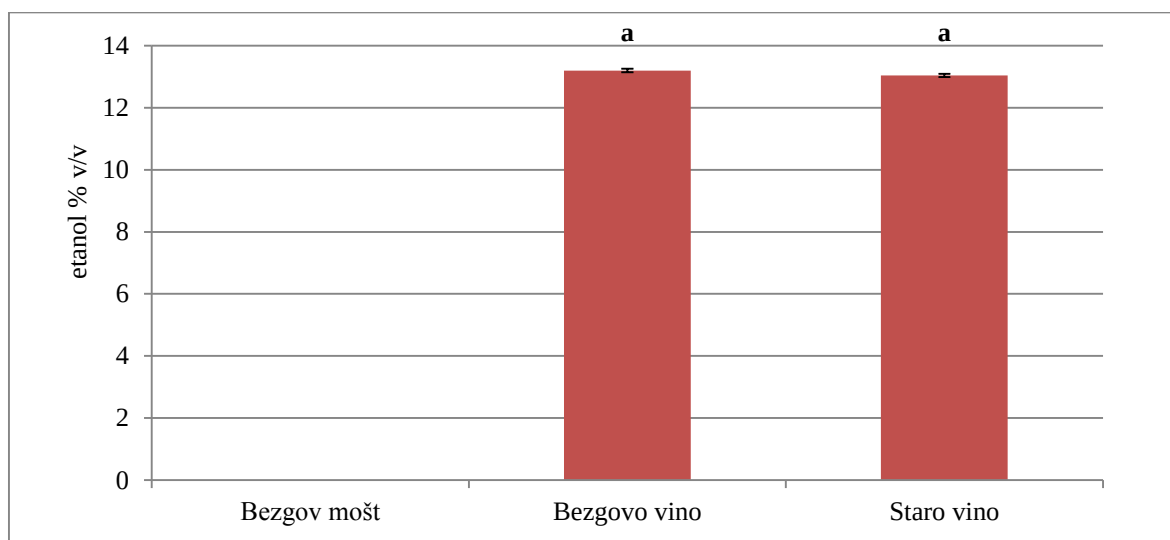
Guadalupe in Ayestaran (2008) ter Chung in sod. (2008) so povečanje pH med zorenjem rdečega vina povezali z estrenjem organskih kislin in zmanjšanjem skupnih analiziranih kislin, kar je bilo vidno tudi pri bezgovem vinu (slika 10). Analiza organskih kislin je pokazala, da sta jabolčna in citronska kislina prevladujoči organski kislini v moštu in vinu, kar se ujema s poročili Veberič in sod. (2009).



Slika 10: Povprečna vsebnost vseh analiziranih kislin (g/L) s standardno napako v bezgovem moštu, bezgovem vinu in staranem vinu. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

4.2 VSEBNOST ETANOLA

Koncentracija etanola v mladem bezgovem vinu je bila 13,2 % v/v; če ga primerjamo z drugimi sadnimi vini, kot je vino iz kivija, ima bezgovo vino večjo vsebnost etanola (slika 11) (Jang in sod., 2007).



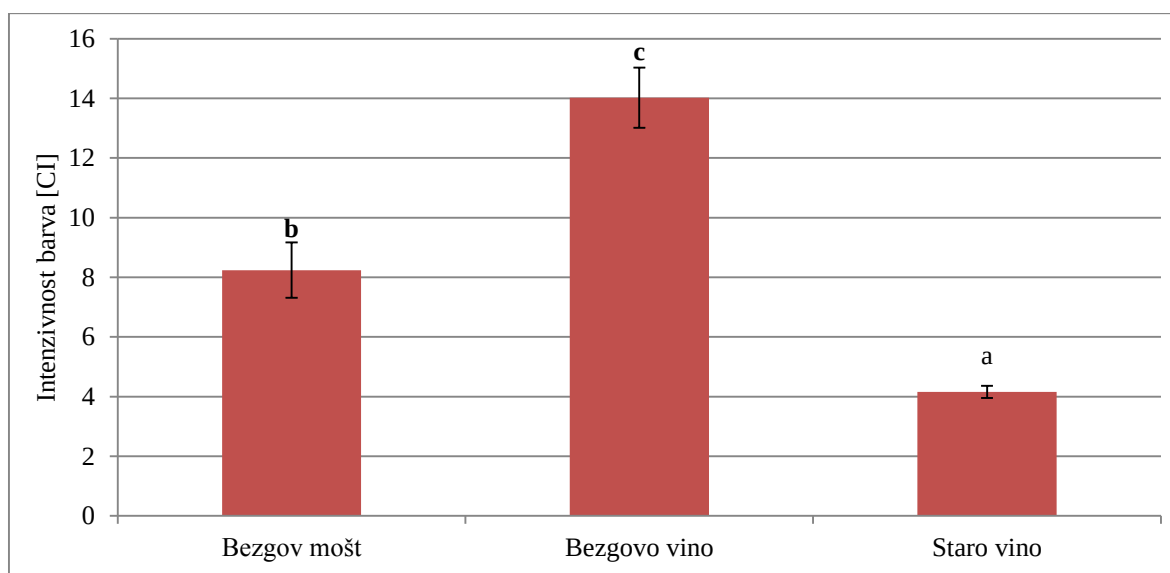
Slika 11: Vsebnost etanola % v/v v bezgovem moštu, bezgovem vinu in starem vinu. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

Koncentracija etanola se s staranjem vina ni značilno spremenila. Pred vrenjem, po pričakovanju, bezgov mošt ni vseboval etanola.

4.3 BARVNI PARAMETRI MOŠTA IN VINA

V enologiji je intenziteta barve (CI) definirana kot vsota absorpcij vina pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm. Barvni kot oz. barvna niansa (h) je definirana kot razmerje med absorpcijama pri 420 in 520 nm. Visoka vrednost barvnega odtenka torej pomeni, da je sadno vino oksidirano, saj prevladujejo oranžni odtenki nad rdečimi (Boselli in sod., 2008).

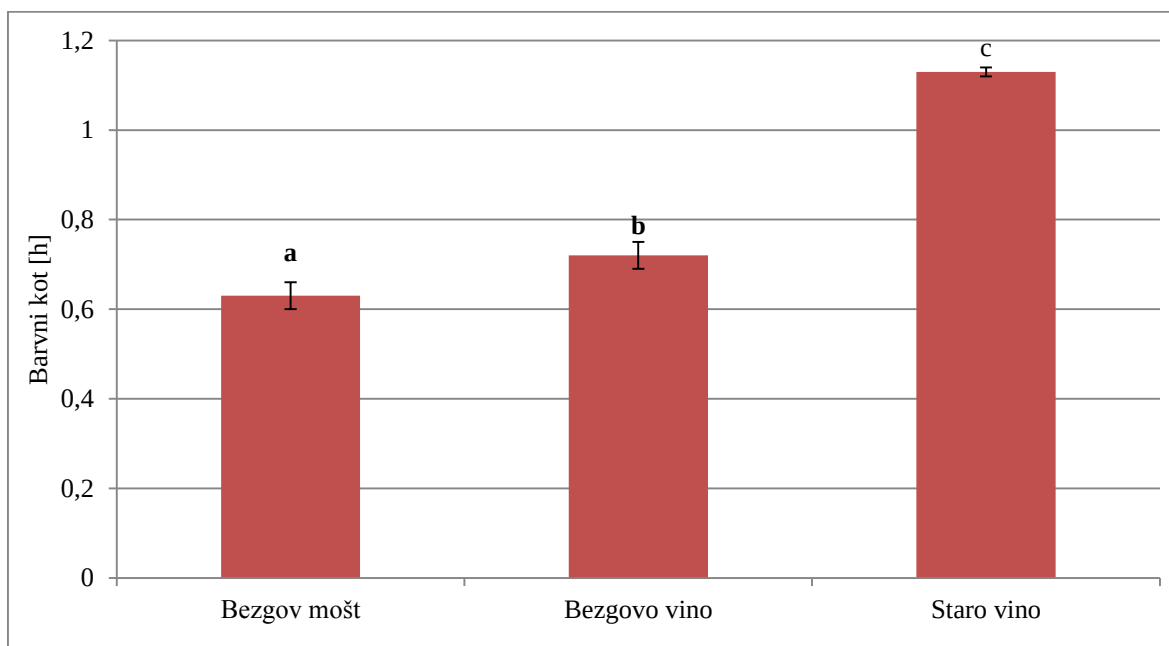
Pri merjenju barvne intenzitete in barvnega kota bezgovega mošta in vina smo ugotovili povečanje obeh parametrov od mošta do vina (sliki 12 in 13). Barvna intenziteta se je po treh letih zorenja v steklenicah bistveno zmanjšala; medtem ko se je barvni kot povečal, kar pomeni, da je postala barva bolj oranžna (Ivanova in sod., 2009). Chung in sod. (2008) so spremembe barve med zorenjem rdečega vina povezali z različnimi reakcijami, med drugim z oksidacijo, kondenzacijo in polimerizacijo fenolnih spojin, še zlasti antocianov.



Slika 12: Intenzivnost barve v bezgovem moštu, bezgovem vinu in starem vinu. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

Rommel in sod. (1990) navajajo, da so barvne sestavine rdečega malinovega vina po hrambi podobno nestabilne. To lahko delno razložimo z oksidacijo antocianov in manjšo barvno intenzivnostjo pri večjih pH-vrednostih starega bezgovega vina.

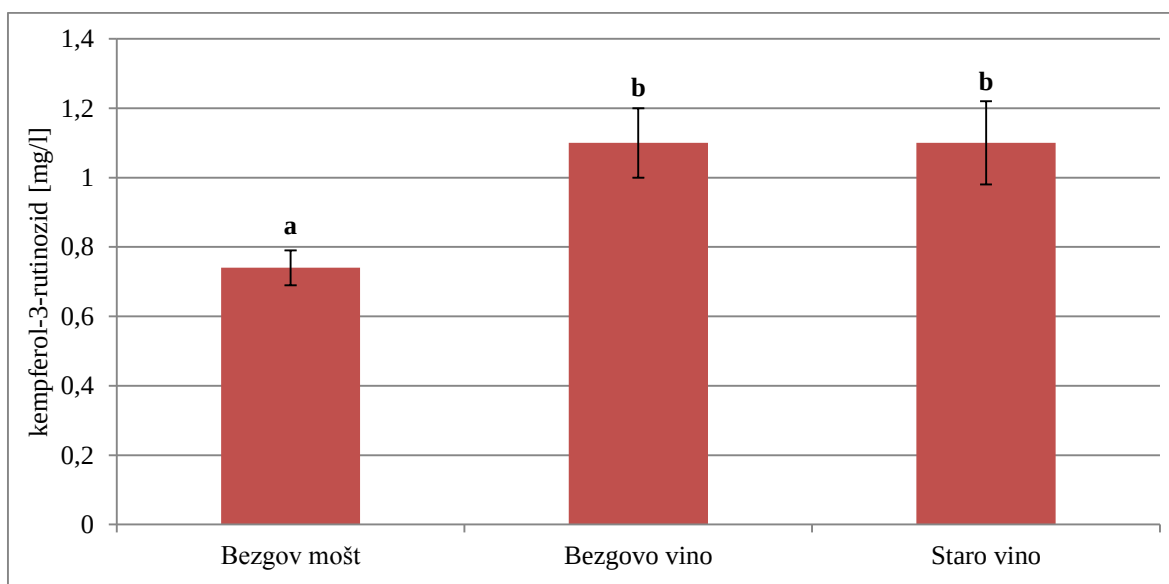
Nekateri avtorji so barvo rdečega vina povezovali z vsebnostjo antocianskih barvil in drugih pigmentov (Boselli in sod., 2008). Podobno je bil tudi pri bezgovem vinu barvni kot negativno povezan z vsebnostjo skupnih antocianov ($R^2 = 0,94$, $p = 0,000$). Antociani so namreč pigmenti, ki so pretežno odgovorni za rdečo barvo vin (Guadalupe in Ayestaran., 2008; Rommel in sod., 1990).



Slika 13: Barvni kot v bezgovem moštu, bezgovem vinu in starem vinu. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

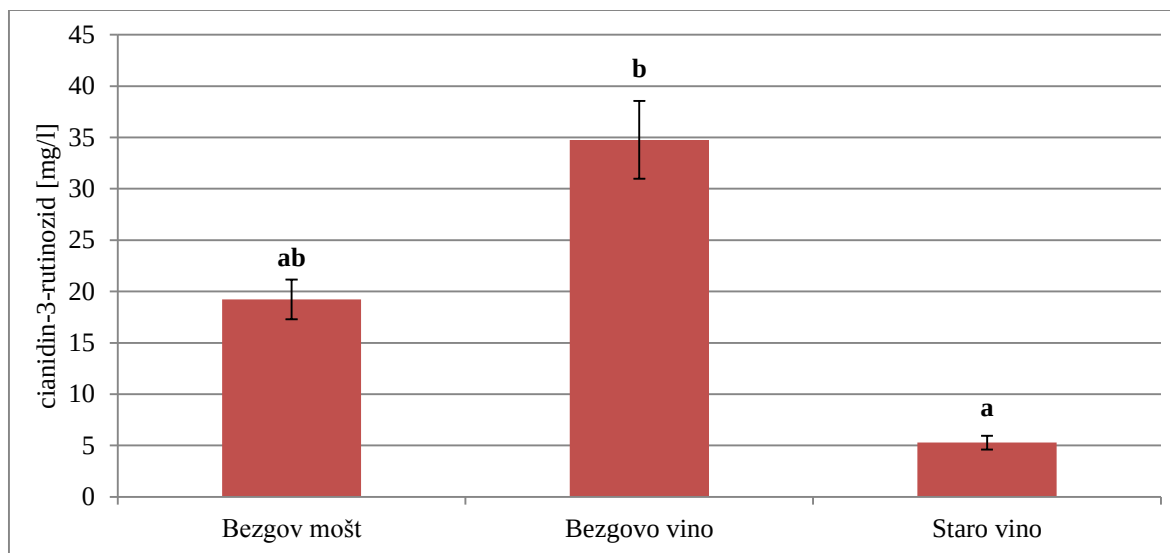
4.4 POSAMEZNE FENOLNE SPOJINE

V bezgovem moštu in vinu smo identificirali deset fenolnih spojin: klorogensko kislino in neoklorogensko kislino, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kempferol-3-rutinozid (slika 14) in pet antocianov, katerih osnova je aglikon cianidin.

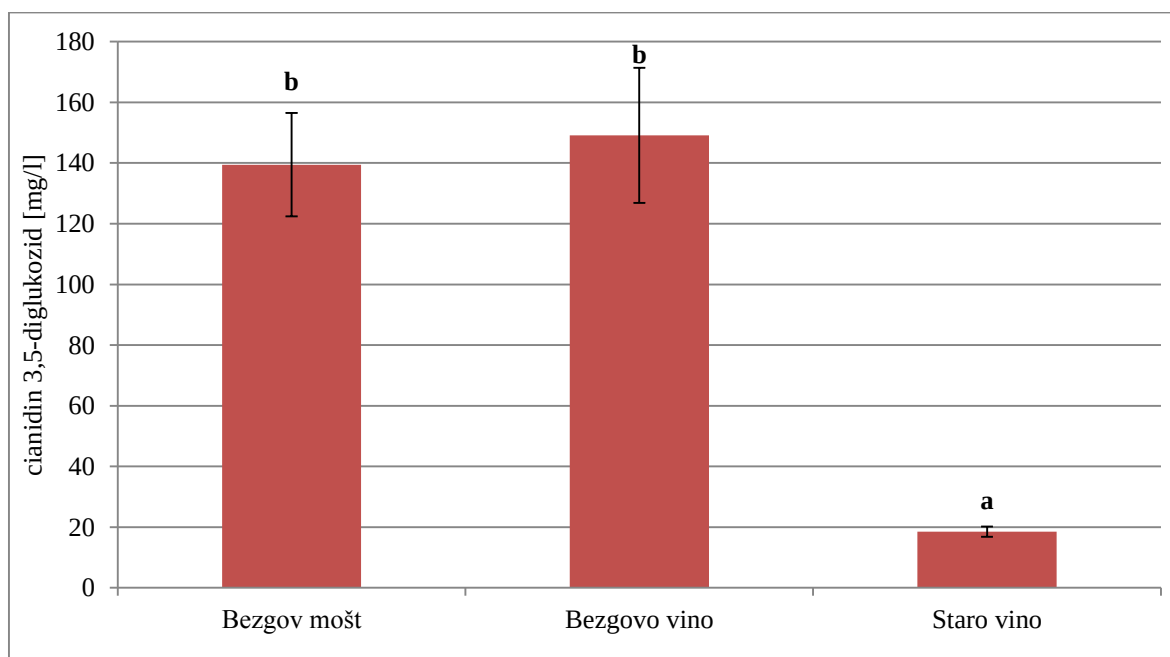


Slika 14: Vsebnost kempferol-3-rutinozida v različnih vinih. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

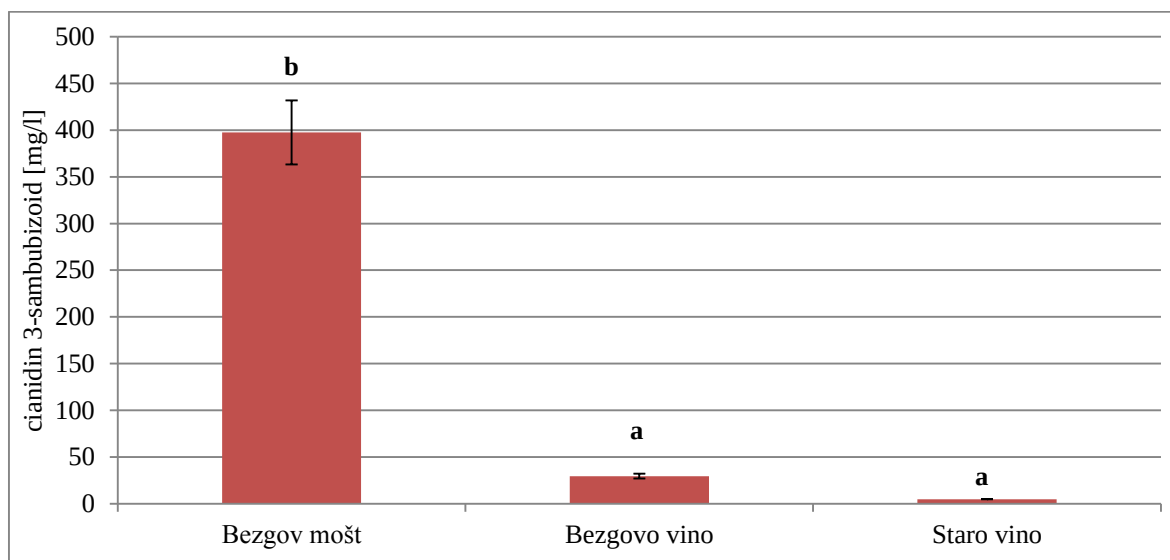
Prevladujoči polifenoli, ki smo jih uspeli analizirati v bezgovem moštu in vinu, so bili antociani, podobno kot tudi v drugih rdečih vinih (slika 15) (Minussi in sod., 2003).



Slika 15: Primerjava vsebnosti cianidin-3-rutinozida med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

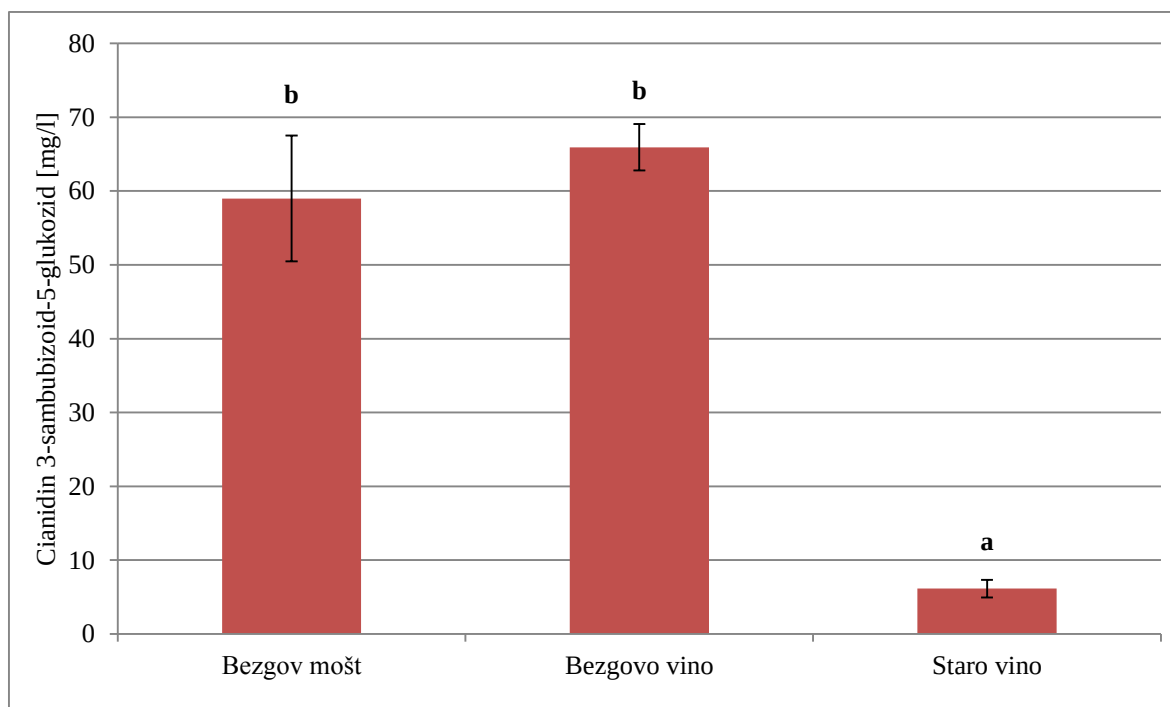


Slika 16: Primerjava vsebnosti cianidin 3,5-diglukoizida med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

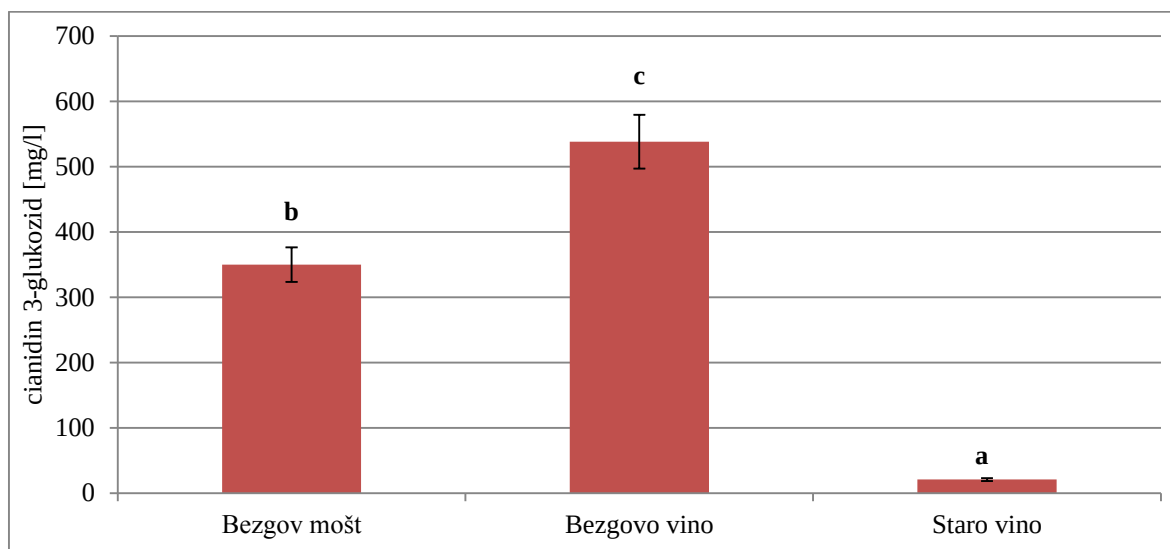


Slika 17: Primerjava vsebnosti cianidin 3-sambubizoida med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

V primerjavi z nekaterimi rdečimi vini, ki vsebujejo od 431 do 506 mg/l skupnih antocianov (Ivanova in sod., 2009), smo v bezgovem vinu izmerili dvakratno vsebnost antocianov. Prevladujoči antocian v bezgovem moštu je bil cianidin-3-sambubiozid (slika 17), medtem ko smo v bezgovem vinu izmerili največjo vsebnost cianidin-3-glukozida (slika 19).



Slika 18: Primerjava vsebnosti cianidin 3-sambubizoid-5-glukozida med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

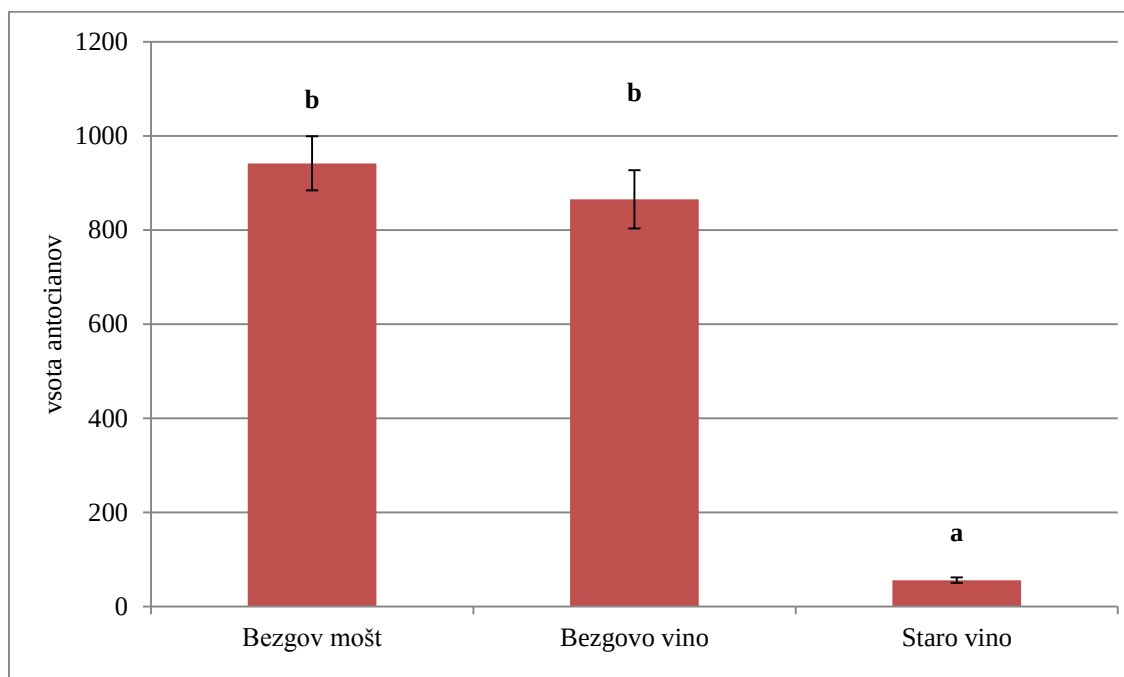


Slika 19: Primerjava vsebnosti cianidin 3-glukozida med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

Oba sta glede na literaturo tudi najbolj zastopana antociana v bezgovih jagodah in sokovih; njun delež je odvisen od sorte (Kaack in sod., 2008; Veberič in sod., 2009). Bezgovo vino ima bistveno različno sestavo fenolnih snovi in antocianov v primerjavi z bezgovim moštom. Podobno so poročali že za vino črnega ribeza in češnjevo vino (Czyzowska in sod., 2002), kjer so pri nekaterih polifenolih in antocianih zabeležili kondenzacijo in polimerizacijo.

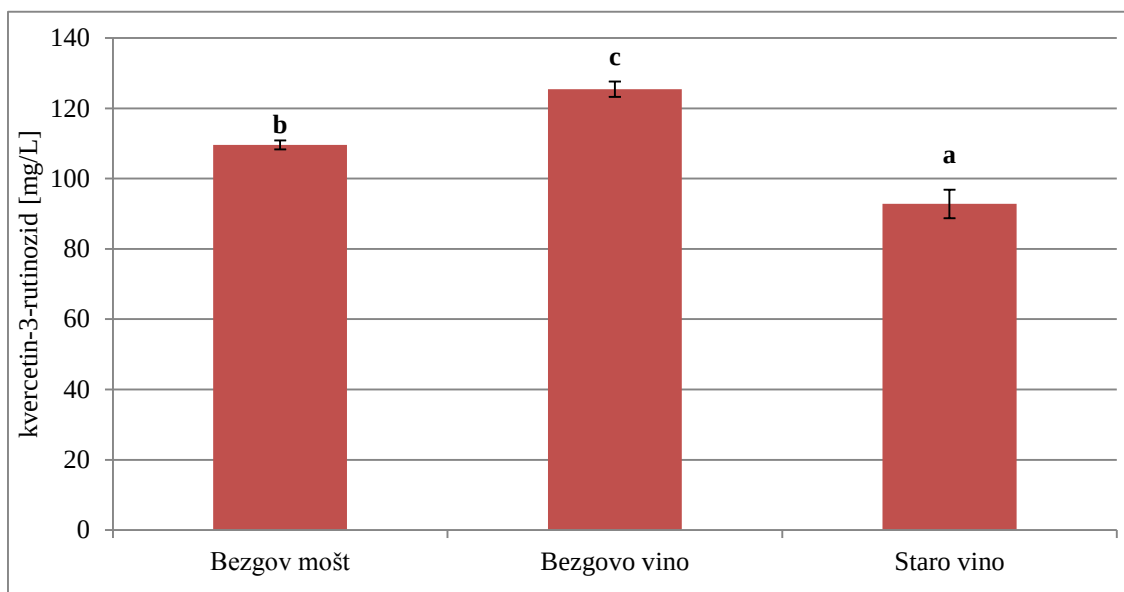
Tako kot v naši raziskavi, so tudi drugje ugotovili, da je cianidin-3-rutinozid – glavni antocian v črnem ribezu –, šele drugi glavni pigment v vinu črnega ribeza. Skupna vsebnost antocianov se je med vinifikacijo rahlo zmanjšala, podobno kot poročajo tudi za vino črnega ribeza in češnjevo vino (Czyzowska in sod. 2002). Barva bezgovega vina se je med hrambo in zorenjem spremenila iz svetlo rdečih do oranžno-rjavih odtenkov, kar lahko pripišemo tako nastanku novih, stabilnejših polimernih pigmentov (Ivanova in sod., 2009) kot tudi reakcijam razgradnje (Guadalupe in Ayestaran, 2008). Vsebnost skupnih antocianov po treh letih hrambe se je zmanjšala na le 6 % vsebnosti, ki smo jo izmerili v mladem bezgovem vinu. Iz literaturnih podatkov o zorenju rdečega vina je razvidno, da se je po 16 mesecih hrambe vsebnost skupnih antocianov zmanjšala petkratno (Ivanova in sod., 2009). Ker se je vsebnost skupnih fenolov v starem bezgovem vinu zmanjšala le za 20 %, je med zorenjem bezgovega vina prišlo do kemičnih sprememb v sestavi in količini antocianov in drugih fenolov podobno kot poročajo za rdeča vina (Ivanova in sod., 2009).

Iz slike 20 je razvidno, da se je vsebnost skupnih antocianov med vinifikacijo rahlo zmanjšala. Prav tako se je vsebnost skupnih antocianov po treh letih hrambe zmanjšala na le 6 % vsebnosti, ki smo jo izmerili v mladem bezgovem vinu.

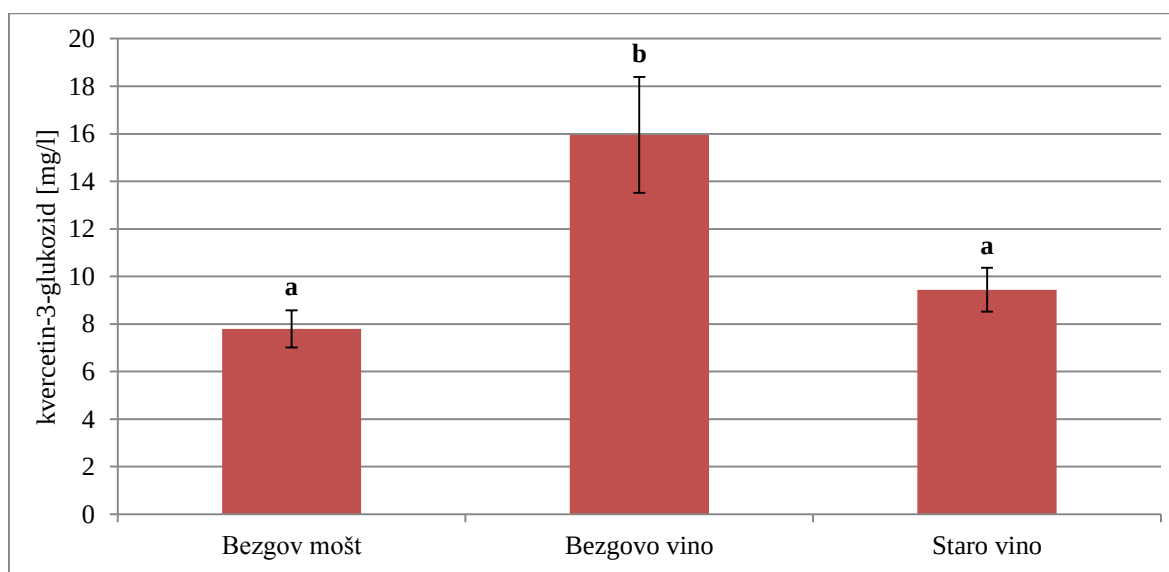


Slika 20: Skupni antociani v bezgovem moštu, vinu in starem bezgovem vinu. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

Med glikozidi kvercetini smo izmerili največjo vsebnost kvercetin-3-rutinozida (slika 21), ki mu je sledil kvercetin-3-glukozid (slika 22), kar lahko primerjamo tako z analizami sestave bezgovih jagod kot tudi z bezgovim sokom (Kaack in sod., 2008). Statistično gledano smo največjo vsebnost obeh spojin izmerili v bezgovem vinu, ki pa se je po treh letih hrambe zmanjšala.

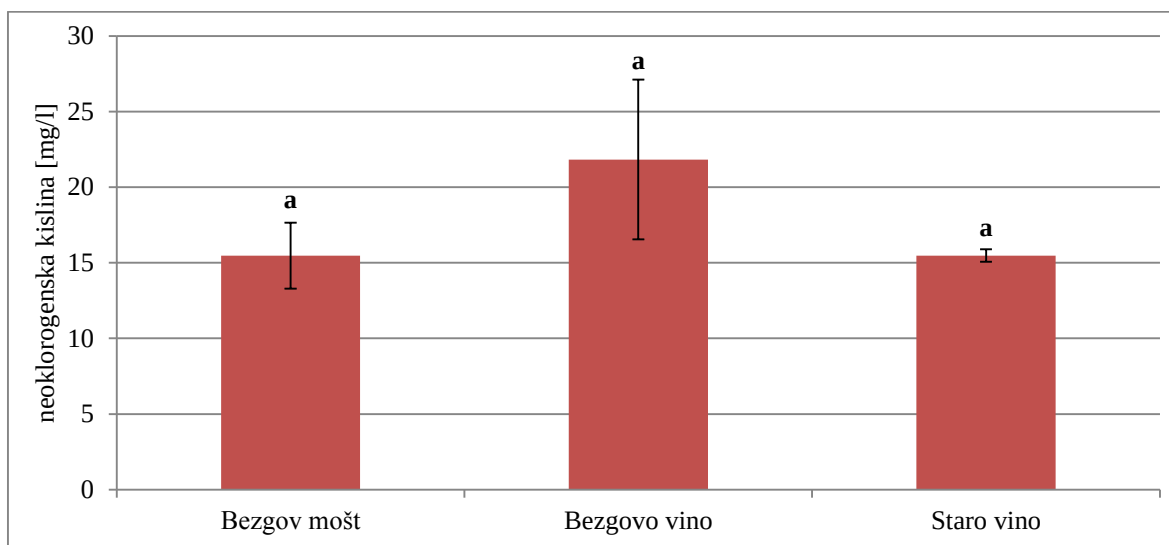


Slika 21: Primerjava vsebnosti kvercetin-3-rutinozida med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

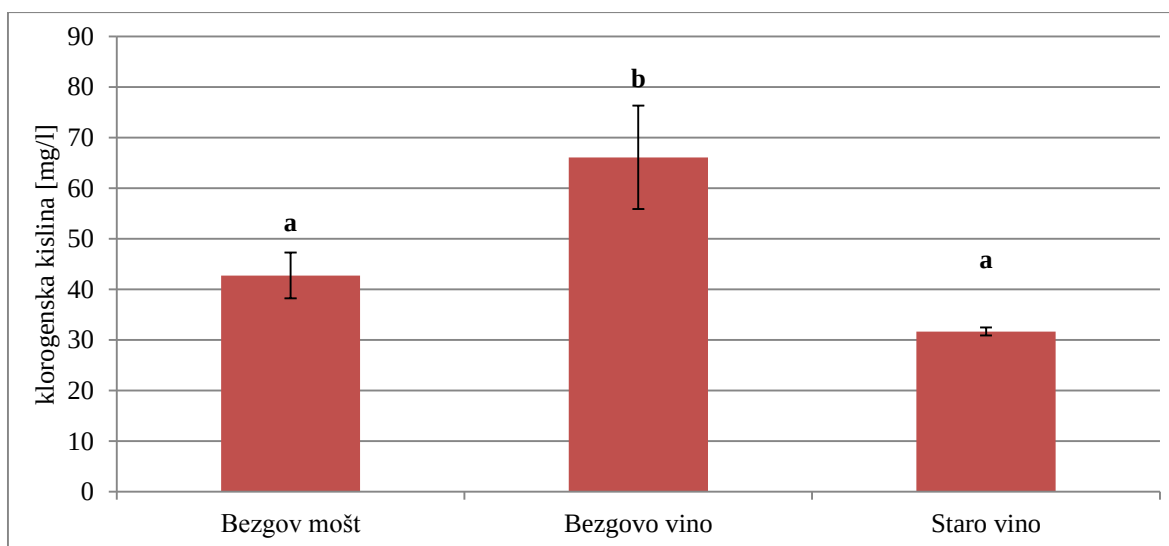


Slika 22: Primerjava vsebnosti kvercetin-3-glukozida med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

V bezgovem moštu in vinu smo, podobno kot v analizi sestave bezgovega soka (Kaack in sod., 2008), odkrili neoklorogensko (slika 23) in klorogensko kislino; zadnje je bilo v primerjavi z bezgovim moštom in starim vinom občutno več kot v bezgovem vinu (slika 24). Te ugotovitve ustrezajo poročilom o dolgotrajnem zorenju rdečih vin v steklenicah, kjer so za to skupino fenolnih spojin zabeležili znatno zmanjšanje (Guadalupe in Ayestaran, 2008).



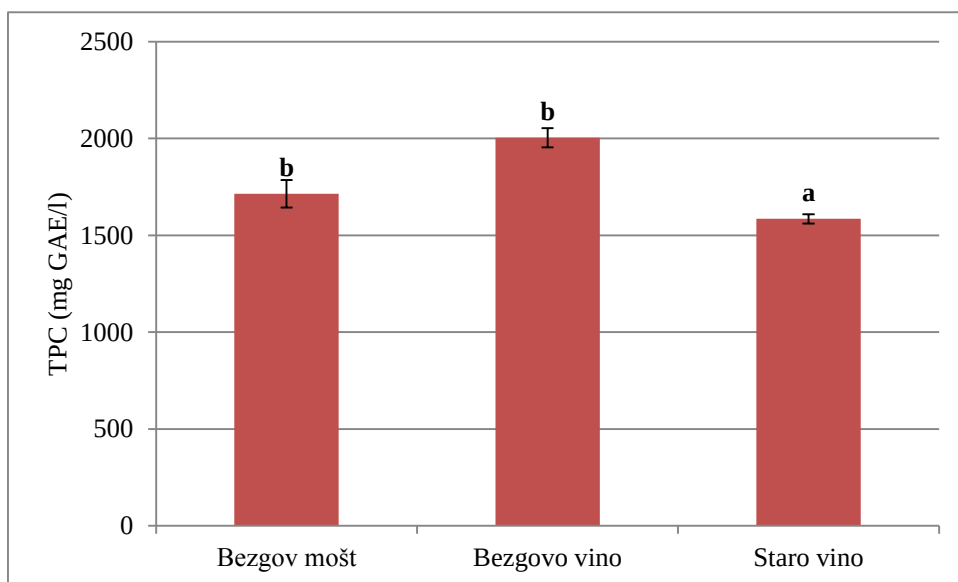
Slika 23: Primerjava vsebnosti neoklorogenske kisline med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji



Slika 24: Primerjava vsebnosti klorogenske kisline med različnimi obravnavanji. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

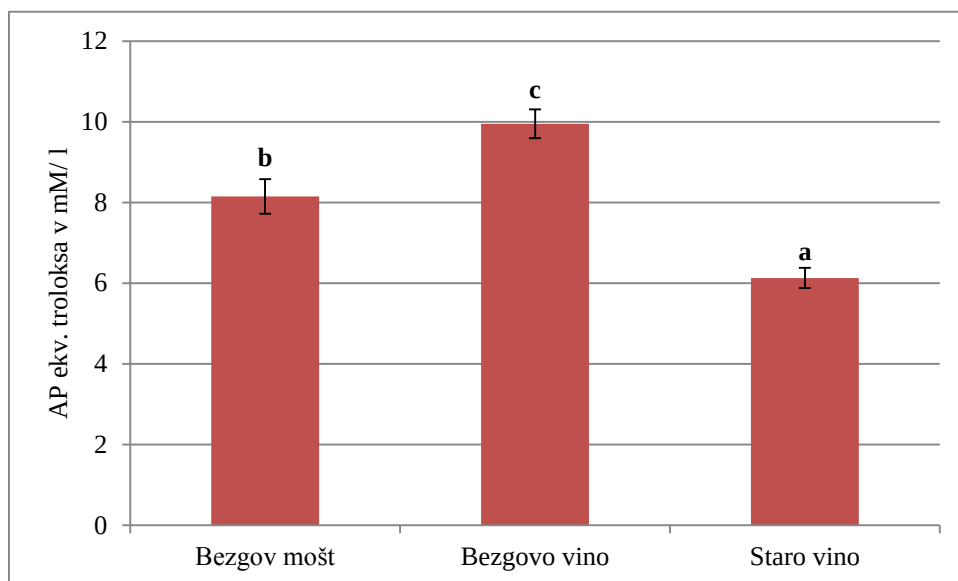
4.5 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN IN ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL

Med spreminjanjem mošta v vino, pa tudi med zorenjem vina, zaradi kemičnih reakcij monomernih in dimernih fenolnih spojin nastane veliko polimernih spojin, kar povzroči razlike tako pri skupnih fenolih kot tudi antioksidativnem potencialu (Sun in sod., 2009). Oba parametra sta bila bistveno višja v bezgovem vinu, kot pa bezgovem moštu in sta se ponovno znižala po obdobju zorenja (slika 25). Skupni fenoli bezgovega vina so znašali 2004,13 mg GAE/l, v primerjavi s skupnimi fenoli, ki so jih izmerili v različnih rdečih vinih, ki v povprečju vsebujejo 2000 mg GAE/l (Minussi in sod., 2003). Vse to ustreza predhodno objavljenim podatkom o fenolnih spojinah sadnih vin, kjer so za bezgovo vino evidentirali vsebnost skupnih fenolov okrog 1753 mg GAE/l (Rupasinghe in Clegg., 2007). Če pogledamo skupne fenole, vsebuje bezgovo vino izredno veliko fenolnih spojin in presega vina narejena iz borovnic, ribeza in malin (Jung in sod., 2009), pa tudi nekatera rdeča in rose vina (Sanchez-Moreno in sod., 1999).



Slika 25: Vsebnost skupnih fenolnih snovi (TPC) v mg GAE/L pri različnih obravnavanjih. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

Glede na objavljene podatke o različnih sadnih in grozdni vinih določa vsebnost fenolnih spojin, izražena kot skupni fenoli, njihove antioksidativne lastnosti. Antioksidativni potencial bezgovega mošta je dosegel vrednost 8,18 mM troloksa/l in se je v bezgovem vinu povečala na 9,95 mM troloksa/l. Zmanjšanje na 6,13 mM troloksa/l smo zabeležili po treh letih hrambe (slika 26). Mulero in sod. (2009) so poročali o antioksidativnem potencialu rdečih vin v razponu med 5,03 in 7,73 mM troloksa/l.



Slika 26: Antioksidativni potencial (AP) pri različnih obravnavanjih izražen v ekvivalentih troloksa v mM/l. Različne črke prikazujejo značilne razlike med obravnavanji

Bezgovo vino je zanimiva alkoholna pijača ne samo zaradi svoje močne rdeče obarvanosti, ampak predvsem zaradi visoke vsebnosti skupnih fenolnih spojin. Posebno antociani so najpogostejše najdene fenolne spojine v bezgovem vinu in so v tesni povezavi z barvnim odtenkom. Zato bi lahko bezgovo vino uporabljali tudi kot možen dodatek drugim alkoholnim pijačam, ki niso dovolj obarvane.

Med zorenjem bezgovega vina se je vsebnost mnogih fenolnih spojin zmanjšala in hkrati je prišlo do jasno vidne barvne spremembe na oranžno-rdeč odtenek. Bezgovo vino vsebuje zelo veliko fenolnih spojin in presega druga sadna vina, pa tudi nekatera rdeča in rose vina. Ker smo ugotovili, da so fenolne spojine in antioksidativni potencial bezgovega vina neposredno povezana, ne priporočamo, da se bezgovo vino hrani dlje časa. Z analizo sestave bezgovega vina smo odkrili, da ima le-ta podoben fenolni profil in antioksidativni potencial kot rdeča vina, in ker so koristne učinke grozdnega vina že temeljito proučili, lahko sklepamo, da ima bezgovo vino podobne zdravju koristne učinke.

5 SKLEPI

Z raziskavo smo izmerili vsebnost etanola, posameznih fenolov, organskih kislin, pH in barvne parametre v bezgovem moštu, bezgovem vinu in starem bezgovem vinu.

Na osnovi dobljenih rezultatov v letu smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- V bezgovem moštu etanol ni prisoten, največ ga najdemo v bezgovem vinu in staranem bezgovem vinu.
- Najvišji pH je v starem vinu, najmanjši pH pa v bezgovem vinu.
- Največ skupnih kislin vsebuje bezgovo vino, najmanj skupnih kislin staro vino.
- Največjo intenziteto barve ima bezgovo vino, najmanjšo pa staro vino.
- Barvni odtenek v prid oranžno-rdeče barve smo izmerili pri starem vinu, najbolj rdeče tone pa pri bezgovem moštu, iz česar sklepamo, da je vino s staranjem podvrženo oksidaciji.
- V primerjavi z nekaterimi rdečimi vini smo v bezgovem vinu izmerili dvakratno količino skupnih antocianov. Opaziti je bilo, da je med vinifikacijo vsebnost skupnih antocianov rahlo padla, pri starem bezgovem vinu pa se je vsebnost skupnih antocianov po treh letih občutno zmanjšala na le 6 % vsebnosti, ki smo jo izmerili v mladem bezgovem vinu.
- Ugotovili smo, da bezgovo vino vsebuje izredno veliko fenolnih spojin in presega druga sadna vina, pa tudi nekatera rdeča in rose vina, ter da je vsebnost skupnih fenolnih spojin večja v bezgovem vinu kot v bezgovem moštu.

6 POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo merili vsebnost sekundarnih metabolitov (antocianov, flavonoidov in fenolnih kislin), pa tudi celotno vsebnost fenolnih spojin in antioksidativni potencial bezgovega vina. Preučili smo spremembo vsebnosti fenolnih spojin, še zlasti antocianov, med spreminjanjem bezgovega mošta v vino, ter njihovo povezavo z barvno sestavo bezgovih proizvodov. Vzorci bezgovih jagod so bili nabrani avgusta v okolici Šentjurja s petih različnih grmov. Šesti vzorec pa je predstavljal skupek vseh petih vzorcev. Profile fenolnih spojin smo ocenjevali tako v mladem bezgovem vinu kot tudi v starem, t.j. po treh letih v steklenici. Določili smo tudi soodvisnost med celotno vsebnostjo fenolnih spojin (TPC) in antioksidativnim potencialom (AP) v bezgovem vinu.

Odkrili smo, da je antioksidativni potencial bezgovega vina podoben kot pri rdečem vinu, ter da je med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativnim potencialom bezgovega vina tesna povezava. Od fenolnih spojin je v bezgovem vinu količinsko največ antocianov, ki so v tesni korelaciji z barvnim odtenkom, njihov obseg pa se je med zorenjem oz. staranjem bistveno zmanjšal.

pH bezgovega mošta je bil bistveno večji od tistega izmerjenega v bezgovem vinu, pri rdečih vinih pa naj bi bil med 3,0 in 3,7, zaradi česar je bezgovo vino manj kislo. Analiza sestavin organskih kislin je pokazala, da so jabolčne in citronske kisline prevladujoče organske kisline v moštu in vinu. Barvna intenziteta sadnega vina se je po treh letih zorenja v steklenicah bistveno zmanjšala, medtem ko se je intenziteta barvnega odtenka povečala, pri čemer se je kazal razvoj proti oranžni barvi. Da so barvne sestavine po hrambi nestabilne, lahko delno razložimo z oksidacijo antocianov pri višjem pH starega bezgovega vina.

V bezgovem moštu in vinu smo identificirali deset fenolnih spojin. Prevladujoči polifenoli v bezgovem moštu in vinu so bili antociani, podobno kot kažejo podatki, pridobljeni za rdeča vina. Med pridelavo bezgovega vina je prišlo do bistvenih sprememb fenolnih spojin, pa tudi sestava pigmentov antocianov se je spremenila. V naši raziskavi smo ugotovili, da je cianidin-3-rutinozid šele drugi glavni pigment v vinu črnega ribeza. Vsebnost skupnih pigmentov antocianov po treh letih hrambe se je občutno zmanjšala na le 6 % vsebnosti, ki smo jo izmerili v mladem bezgovem vinu. Iz predhodnih podatkov o zorenju rdečega vina je razvidno, da se je po 16 mesecih hrambe vsebnost skupnih pigmentov antocianov zmanjšala petkratno. Ker se je vsebnost TPC v starem bezgovem vinu zmanjšala le za 20 %, so se med zorenjem bezgovega vina pojavile kemične reakcije med antociani in drugimi fenolnimi spojinami, tako kot pri rdečem vinu. Klorogenske kisline je bilo v primerjavi z bezgovim moštom in starim vinom občutno več v bezgovem vinu.

7 VIRI

- Bermudez-Soto M. J., Tomas-Barberan F. A. 2004. Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *European Food Research and Technology*, 219, 2: 133–141
- Boselli E., Giomo A., Minardi M., Frega N. G. 2008. Characterization of phenolics in Lacrima di Morro d'Alba wine and role on its sensory attributes. *European Food Research and Technology*, 227: 709–720
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*, 28:25–30
- Bridle P., Timberlake C. F. 1997. Anthocyanins as natural food colour-selected aspects. *Food Chemistry*, 58, 1–2: 103–109
- Chung H.-Y., Son J.-H., Park E.-Y., Kim E.-J., Lim S.-T. 2008. Effect of vibration and storage on some physicochemical properties of a commercial red wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 8: 655–659
- Czyszowska A., Pogorzelski E. 2002. Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from blackcurrants and cherries. Part I. Total polyphenol and phenolic acids. *European Food Research and Technology*, 214, 2: 148–154
- Direktiva 2009/35/Es Evropskega parlamenta in sveta z dne 23. aprila 2009 o barvilih, ki se lahko dodajajo zdravilom. *Uradni list Evropske unije*, L 109: 10-13
- Guadalupe Z., Ayestaran, B. 2008. Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. Cv. "Tempranillo" during vinification and aging. *European Food Research and Technology*, 228, 1: 29–38
- Ivanova V., Stefova M., Vojnovski B. 2009. Assay of the phenolic profile of merlot wines from Macedonia: effect of maceration time, storage, SO₂ and temperature of storage. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 28, 2: 141–149
- Jang S.-Y., Woo S.-M., Kim O.-M., Choi I.-W., Jeong Y.-J. 2007. Optimum alcohol fermenting conditions for kiwi (*Actinidia chinensis*) wine. *Food Science and Biotechnology*, 16, 4: 526-530
- Jung J., Son M.-Y., Jung S., Nam P., Sung J.-S., Lee S. J., Lee K.-G. 2009. Antioxidant properties of Korean black raspberry wines and their apoptotic effects on cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 6: 970–977
- Kaack K., 1989. New varieties of elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Tidsskrift for Planteavl*, 93, 1: 59–65

- Kaack K., Frette X. C., Christensen L. P., Landbo A.-K., Meyer A. S. 2008. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice. *European Food Research and Technology*, 226, 4: 843–855
- Krajnc M., Krajnc K. 2002. Žlahtni bezeg. Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 72 str.
- Minussi R. C., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotilio D., Pastore G. M., Duran N. 2003. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82, 3: 409–416
- Mulero J., Pardo F., Zafrilla P. 2009. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *European Food Research and Technology*, 229: 807–812
- Neuhold M. 1999. Bezeg za mladost, zdravje in lepoto. Celovec, Mohorjeva: 130 str.
- Rommel A., Heatherbell D. A., Wrolstad R. E. 1990. Red Raspberry Juice and Wine: Effect of Processing and Storage on Anthocyanin Pigment Composition, Color and Appearance. *Journal of Food Science*, 55, 4: 1011–1017
- Rupasinghe H. P. V., Clegg S. 2007. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Science*, 20, 2: 133–137
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura-Calixto F. 1999. Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1301–1304
- Sidor A., Gramza-Michalowska A. 2015. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food - areview. *Journal of Functional Foods*, 18: 941–958
- Spanring J. 1997. "Monografska obdelava bezga". (osebni vir, maj 2009)
- Sun B., Spranger I., Yang J., Leandro C., Guo L., Canario S., Zhao Y., Wu C. 2009. Red wine phenolic complexes and their in vitro antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 18: 8623–8627
- Šturm S., Seger C. 2007. HPLC-SPE-NMR A novel hyphenation technique. *LC GC Europe*, 20, 11: 587
- Toplak Galle K. 2002. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 104 str.

- Veberič R., Jakopic J., Stampar F., Schmitzer V. 2009. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114, 2: 511–515
- Vrhovšek U. 2000. Bioaktivne polifenolne spojine grozdja in vina. V: Strokovni posvet: Vino – hrana, zdravje 2000, Ljubljana, 5. april 2000. Celje, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 42–56
- Wang H., Cao G., Prior L. R. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2: 304–309
- Willfort R. 2006. Zdravilne rastline in njih uporaba. Maribor, Založba obzorja Maribor: 576 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju dr. Robertu VEBERIČU za vse nasvete in za tehnično pomoč pri izvedbi diplomskega dela.

Najlepša hvala recenzentu prof. dr. Denisu RUSJANU za vse strokovne nasvete.