

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ana ČEMAŽAR

**VSEBNOST POLIFENOLOV, FLAVONOIDOV IN TANINOV V AJDI
(*Fagopyrum esculentum*), PRIDELANI Z RAZLIČNIM GNOJENJEM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE CONTENT OF POLYPHENOLS, FLAVONOIDS AND TANNINS
IN COMMON BUCKWHEAT (*Fagopyrum esculentum*) PRODUCED
WITH VARIOUS FERTILIZATION METHODS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (postavitev poskusa in statistična obdelava podatkov) ter na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani (laboratorijsko delo).

Študijska komisija Oddelka za biologijo je potrdila temo in naslov diplomskega dela ter za mentorja imenovala prof. dr. Ivana Krefta in za somentorico doc. dr. Matejo Germ.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Alenka GABERŠČIK

Članica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE

Član: prof. dr. Ivan KREFT

Članica: doc. dr. Mateja GERM

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ana ČEMAŽAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 633.12:631(043.2)=163.6
KG navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*), gnojenje, polifenoli, flavonoidi, tanini, cvetovi, listi, semena
AV ČEMAŽAR, Ana
SA KREFT, Ivan (mentor) / GERM, Mateja (somentorica)
KZ 1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN VSEBNOST POLIFENOLOV, FLAVONOIDOV IN TANINOV V AJDI (*Fagopyrum esculentum*), PRIDELANI Z RAZLIČNIM GNOJENJEM
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 34 str., 7 sl., 36 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Antioksidanti so spojine, ki preprečujejo oksidacijo snovi. Namen našega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri dognojevanje prsti, v kateri uspeva navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*), vpliva na vsebnost polifenolov, flavonoidov in taninov v cvetovih, zgornjih ter spodnjih listih in semenih opazovane rastline, pa tudi, kolikšen je delež proučevanih antioksidantov v omenjenih delih rastline. Rastline so bile posejane na polju v Klečah pri Ljubljani 24. 7. 2008. Poskus je potekal v štirih ponovitvah. Ena ponovitev je zajemala po en m² površine tal, kjer je rasla ajda, kjer prsti nismo nič dodali (kontrolna skupina), en m² površine ajde, kjer smo prsti dodali hlevski gnoj, en m² površine ajde v prsti z dodanim mineralnim gnojilom NPK in en m² ajde, ki je rasla v prsti, ki smo ji dodali dvakratno količino mineralnega gnojila NPK. Nato smo septembra 2008 s 15 rastlin pobrali cvetove ter ločeno zgornje in spodnje liste, oktobra 2008 pa ponovno s 15 rastlin še plodove - ločeno z vsakega m². Vzorce smo nato posušili, zmleli, ekstrahirali v etanolu in s spektrofotometrom izmerili absorbanco za posamezno skupino antioksidantov, s pomočjo standardov pa izračunali delež omenjenih antioksidantov v posameznih delih rastlin v odvisnosti od gnojenja. Ugotovili smo, da gnojenje vpliva na znižanje deleža flavonoidov ter taninov v listih, ne pa tudi v cvetovih in plodovih, na delež polifenolov pa ne vpliva. Upad koncentracije raziskovanih antioksidantov v rastlini si sledi v zaporedju: cvetovi > zgornji listi > spodnji listi > plodovi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 633.12:631(043.2)=163.6
CX common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), fertilization, polyphenols, flavonoids, tannins, flowers, leaves, seeds
AU ČEMAŽAR, Ana
AA KREFT, Ivan (supervisor) / GERM, Mateja (co-supervisor)
PP 1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2010
TI THE CONTENT OF POLYPHENOLS, FLAVONOIDS AND TANNINS IN COMMON BUCKWHEAT (*Fagopyrum esculentum*) PRODUCED WITH VARIOUS FERTILIZATION METHODS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 34 p., 7 fig., 36 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Antioxidants are compounds that prevent the oxidation of substances. The aim of our work was to find out, how the fertilization of soil, on which grows common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), influences the content of polyphenols, flavonoids and tannins in flowers, upper and lower leaves, and seeds of observed plants, and what concentration (percentage in dry matter) of studied antioxidants is present in mentioned individual parts of plants. Plants were sown on field in Kleče by Ljubljana on July 24, 2008. The experiment was conducted in four repetitions. Each repetition plot consisted of one m² ground space, on which buckwheat was grown. There were four treatments of the soil, namely (1) the soil without any addition (control group), (2) with addition of stable manure, (3) with addition of NPK fertilizer, and (4) with addition of double dosis of mineral NPK fertilizer. In September 2008 we collected from 15 plants the samples of flowers, and upper and lower leaves separately. In October 2008, we picked up the seeds of 15 plants – separately from each basic plot. The samples were then dried, ground and extracted in ethanol. The absorbance was measured by spectrophotometer for each group of antioxidants, and we used standards to calculate the percentage of the mentioned antioxidants in various parts of plants, as a function of fertilization. Our results show, that the fertilization decreased the concentration of the flavonoids and tannins in leaves, but not in flowers and in seeds. Fertilization had no effect on the concentration of polyphenols. The concentration of studied antioxidants in plant is followed in sequence: flowers > upper leaves > lower leaves > seeds.

KAZALO VSEBINE

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 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NAVADNA AJDA	3
2.2 PROSTI RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI	4
2.2.1 Prosti radikali in njihov izvor	4
2.2.2 Antioksidanti	4
2.2.2.1 Polifenoli	5
2.2.2.2 Flavonoidi	5
2.2.2.3 Tanini	6
2.3 GNOJENJE	8
2.4 EKOLOŠKA PRIDELAVA	9
2.5 KONVENCIONALNA PRIDELAVA	10
2.6 PRIMERJAVA PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTOV V ODVISNOSTI OD NAČINA PRIDELOVANJA	11
2.7 PRIMERJAVA PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTOV V RAZLIČNIH DELIH AJDE	12
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 MATERIAL	13
3.1.1 Rastline	13
3.1.2 Kemikalije	13
3.1.3 Aparature	14
3.2 METODE	14
3.2.1 Poljski poskus	14
3.2.2 Delo v laboratoriju	15
3.2.2.1 Priprava vzorcev in ekstrakcija	15
3.2.2.2 Analiza vzorcev	16
3.2.2.2.1 Določanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteau-jevo metodo	17
3.2.2.2.2 Določanje vsebnosti flavonoidov z uporabo aluminijevega klorida	17
3.2.2.2.3 Določanje vsebnosti taninov z vanilin-HCl metodo	17
3.2.2.3 Spektrofotometrična metoda	18
3.2.2.4 Priprava standardov in reagentov	18
3.3 Statistična obdelava podatkov	19
4 REZULTATI	20
4.1 VSEBNOST ANTIOKSIDANTOV V DELIH RASTLIN GLEDE NA GNOJENJE TAL	20
4.1.1 Vsebnost polifenolov	20
4.1.2 Vsebnost flavonoidov	22

4.1.3	Vsebnost taninov	24
4.1.4	Delež antioksidantov v različnih delih ajde	25
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	26
5.1	RAZPRAVA	26
5.2	SKLEPI	29
6	POVZETEK	30
7	VIRI	31
9	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Postavitev poskusa	15
Preglednica 2: Prikaz pogojev in reagentov za analizo polifenolov, flavonoidov in taninov	16
Preglednica 3: Delež antioksidantov v različnih delih ajde, ki je rasla v različno gnojenih tleh	25

KAZALO SLIK

Slika 1: Navadna ajda (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	3
Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (2-fenilbenzopiran)	6
Slika 3: Strukturna formula rutina	6
Slika 4: Razdelitev gnojil (prirejeno po Leskošek, 1993)	8
Slika 5: Količina polifenolov v suhi snovi ajde, ki je rasla v različno pognojenih tleh; v cvetovih (A), v zgornjih listih (B), v spodnjih listih (C) in v plodovih (D)	21
Slika 6: Količina flavonoidov ajde, ki je rasla v različno pognojenih tleh; v cvetovih (A), v zgornjih listih (B), v spodnjih listih (C) in v plodovih (D)	23
Slika 7: Količina taninov ajde, ki je rasla v različno pognojenih tleh; v cvetovih (A), v zgornjih listih (B), v spodnjih listih (C) in v plodovih (D)	24

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

N	dušik
P	fosfor
K	kalij
A	absorbanca
F-C	Folin-Ciocalteu
HCl	klorovodikova kislina
UV	ultravijolično valovanje
AlCl₃	aluminijev klorid
Na₂CO₃	natrijev karbonat
SD	standardna deviacija
ST	suha teža

1 UVOD

Dandanes se veliko govori o zdravi prehrani in načinu pridelave hrane. Ljudje se vse pogosteje sprašujemo, kako kakovostno hrano pravzaprav uživamo. Napredujoča znanost nam omogoča raziskave na primerjavi kakovosti hrane; poleg tega pa tudi to, da odkrivamo, kateri deli rastlin so po svoji hranilni vrednosti najprimernejši za prehrano človeka.

V začetku 20. stoletja so po uveljavitvi Haaber-Bosch-eve sinteze začeli industrijsko izdelovati in uporabljati prva dušikova mineralna gnojila. Po uvedbi sinteze uree iz amonijaka, leta 1921, in proizvodnji prvega herbicida, leta 1930, se je začela »kemizacija« v kmetijstvu, ki se je pospešila po letu 1950 z uvedbo sodobnejših kmetijskih strojev, z racionalizacijo, povečevanjem kmetij in uvedbo herbicidov. Začetki ekološkega kmetijstva sovpadajo z začetkom vnašanja kemičnih snovi na obdelovalna zemljišča, torej v začetke prejšnjega stoletja, a se je ekološko kmetijstvo začelo širiti šele v petdesetih letih z gibanjem dr. Müllerja v Švici in Avstriji, ki je uveljavljal t. i. organsko-biološko kmetovanje. Knjiga »Nema pomlad« je v šestdesetih letih prinesla večje zavedanje okoljskih problemov in po »zeleni revoluciji«, so se v sedemdesetih letih z ekološkim kmetovanjem ukvarjali zlasti idealisti z malo kmetijskega znanja in na manjših kmetijah (Bavec in sod., 2001).

Konec 20. stoletja se je pod vplivom kmetijske politike Evropske unije začela pot organizirane ekološke pridelave in reje pri nas. Z vstopom v Evropsko unijo 1. maja 2007 smo sprejeli skupno kmetijsko politiko, organizacijsko in strokovno delo na področju ekološke pridelave pa se je okrepilo (Kocjan Ačko, 2008).

Ajda je dvokaličnica, ki sodi v družino dresnovk. V novejšem času se po svetu in pri nas veča zanimanje za ajdo tudi zaradi izredno skladne sestave hranilnih snovi v njenih zrnih. Ajda vsebuje zelo kakovostne beljakovine, v primerjavi z žiti ima ajda več vlaknin, v ajdi je tudi zdravilna snov rutin, ki je eden od rastlinskih antioksidantov iz skupine flavonoidov. In nenazadnje, ajda ima vsaj za zdaj le malo rastlinskih škodljivcev in bolezni, zato jo lažje kot nekatere druge, bolj »razvajene« gojene rastline, pridelujemo brez uporabe sredstev za varstvo posevkov (Kreft, 1995).

Ajda je zanana tudi zaradi visoke vsebnosti antioksidantov. Zule in Kozjan (2008) navajata, da so antioksidanti kemijske spojine, ki zaradi svoje specifične elektronske konfiguracije preprečujejo ali upočasnjujejo oksidacijo življenjsko pomembnih spojin v živih tkivih, ki so izpostavljena prostim radikalom. Prav ti pa s svojo aktivnostjo poškodujejo celice, ker v njih tvorijo nove proste radikale.

V zadnjem času potekajo številne raziskave, v katerih raziskovalci primerjajo kakovost hrane, pridelane na konvencionalni in ekološki način (Winter in Davis, 2006). Z vse večjim poznavanjem pomena in vloge antioksidantov pa raziskujejo tudi vsebnost le-teh v različno pridelani hrani. Opazovali so tudi vsebnost antioksidantov pri ajdi, ki je uspevala na različno pognojenih tleh (Hagels in sod., 1995). Številne raziskave v zvezi z ajdo govorijo

tudi o različni koncentraciji antioksidantov znotraj same rastline (Hagels in sod., 1995; Kalinova in sod., 2006; Kalinova in Vrhotova, 2009).

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Namen diplomskega dela je bila primerjava vsebnosti skupin antioksidantov (polifenolov, flavonoidov in taninov) v cvetovih, zgornjih in spodnjih listih ter plodovih ajde, ki je rasla v tleh, pognojenih z različnima gnojiloma: z mineralnim dušikovim in organskim (hlevskim) gnojilom.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da se bodo pojavile razlike v vsebnosti polifenolov, flavonoidov in taninov med različnimi deli rastlin (cvetovi, spodnji in zgornji listi ter plodovi) in med rastlinami, ki so rasle v nepognojeni prsti, prsti pognojene s hlevskim gnojem ter prsti, pognojene z različno količino mineralnega gnojila (NPK).

2 PREGLED OBJAV

2.1 NAVADNA AJDA

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) je dvokaličnica iz družine dresnovk (*Polygonaceae*). Je precej drugačna od žit. Le-ta spadajo v družino trav in so enokaličnice. Zaradi podobnega načina pridelave in uporabe pa v kmetijstvu in predelavi ajdo pogosto uvrščajo med žita. Bližnji sorodniki ajde so številne dresni, kislica in rabarbara.

Ajda izvira iz jugozahodne Kitajske. V srednjo Evropo se je razširila verjetno preko Rusije in Ukrajine. V Slovenijo je prišla v začetku 15. stoletja (Kreft, 1995). V drugi polovici 20. stoletja je ajda zaradi gospodarsko pomembnejše pšenice začela izginjati z njiv, podobno kot pira, rž in oves, na katerih je temeljila prehrana prebivalcev naših krajev v preteklosti (Kocjan Ačko, 2006).

Ajda je enoletna rastlina, ki se spolno razmnožuje. Listi ajde so srčasto puščičasti. Spodnji listi so pecljati, zgornji pa sedeči (Slika 1). Cvetovi so v sestavljenih socvetjih, posamezni cvetovi so na kratkih pecljih. Semena navadne ajde so triroba. Ploskve ajdovih semen so ravne, rahlo zaokrožene in gladke. Če je seme dobro napolnjeno, so stranice semena izbočene, v nasprotnem primeru pa so ravne ali celo vbočene.

Pri nas, poleg navadne ajde, poznamo še tatarsko ajdo (*Fagopyrum tataricum*) (Kreft, 1995).



Slika 1: Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*)

Ajda je ekstenzivna rastlina in ne daje velikega hektarskega pridelka. Vendar so tudi vlaganja za pridelovanje majhna. Ajda na prejšnje posevke ni občutljiva, a prevelike zaloge dušika v tleh zanjo niso primerne. Je skromna rastlina in zaradi mikorize s simbiotskimi glivami uspešneje črpa mineralne snovi iz tal kot večina drugih poljščin. Skromnost ajde glede potreb po hranilih je eden od razlogov, da je ajda primerna tudi za ekološke pridelovalce (Kreft, 1995).

Vse večja ozaveščenost in skrb za zdravje vodita v pridelovanje visokakovostne prehrane. Prisotnost rutina v prehrabnih izdelkih iz ajde je eden od glavnih razlogov proizvodnje različnih ajdinih izdelkov (Kreft in sod., 2005).

2.2 PROSTI RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI

2.2.1 Prosti radikali in njihov izvor

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim elektronom brez para. So visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami, beljakovinami in membranami. Nastajajo pri cepitvi kovalentne vezi (Korošec, 2000). Po reakciji z molekulami antioksidantov prosti radikali pridobijo manjkajoče elektrone in se pretvorijo v stabilno stanje ter tako ne morejo več povzročati degenerativnih sprememb v celici (Zule in Kozjan, 2008).

Rastlinske, živalske in človeške celice so venomer izpostavljene različnim spremembam, ki povzročajo oksidativni stres. Take spremembe so endogenega ali eksogenega izvora. Endogeni izvor so nekateri procesi v mitohondrijih, endoplazemskem retikulumu, peroksisomih, citoplazmi in celični membrani, eksogenega izvora so ionizirno sevanje, ozon in razni elicitorji (Abram, 2000).

Oksidativni stres se v bioloških sistemih pokaže, če je bil organizem dlje časa izpostavljen oksidantom ali če je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma ali obeh. Oksidativni stres je večkrat posledica nastanka reaktivnih vrst kisika (ROS). Tako lahko nastanejo HO· (hidroksilni), HOO· (hidroperoksilni), O₂⁻· (hiperoksidni), RO· (alkoksilni) ali še drugi radikali. Prosti radikali reagirajo z lipidi, beljakovinami in DNK. Reaktivne vrste kisika naj bi bile zelo povezane s staranjem in z razvojem kroničnih bolezni kot so diabetes, ateroskleroza, karcinom (Abram, 2000).

2.2.2 Antioksidanti

Antioksidanti so spojine, ki preprečujejo oksidacijo snovi. Oksidacijo, ki je verižna reakcija, povzročajo oksidanti in radikali (Abram, 2000). Antioksidanti preprečujejo oksidativni stres z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul. Antioksidanti so encimi, vitamini, betakaroteni, bioflavonoidi, katehini, itn. ter mikrorudnine - selen, cink,

baker, mangan. Nekatere antioksidante proizvaja telo samo, druge pa dobimo s hrano (Korošec, 2000).

2.2.2.1 Polifenoli

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več –OH skupin neposredno vezanih na aromatski obroč. V naravi so običajne spojine z več –OH skupinami, zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime - polifenoli (Abram, 2000). Polifenoli so sekundarni rastlinski metaboliti. Rastline sintetizirajo različne polifenolne spojine (Luthar, 1992).

Biosinteza enostavnih aromatskih spojin poteka iz glukoze preko šikimske kisline. Nadalje se aromatske spojine pretvorijo v mnoge pomembne fenolne snovi, ki jih razdelimo na:

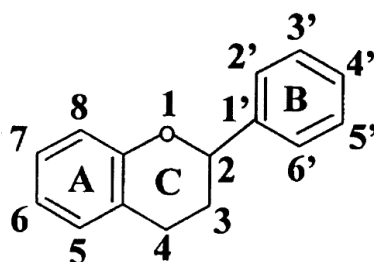
- flavonoide, ki so polifenoli s $C_6-C_3-C_6$ ogrodjem; njihove polimere imenujemo kondenzirani tanini;
- hidrolizirajoče tanine; hidroliza teh komponent vodi do galne in elagne kisline ter sladkorjev (običajno glukoze);
- lignine, ki nastanejo pri oksidativni povezavi dveh fenilpropanovih enot (C_6-C_3);
- stilbene, ki imajo konjugirane dvojne vezi in so izredno reaktivni;
- tripolene, ki imajo nenasičen sedemčlenski obroč ogljikovih atomov (Haslam, 1989).

Polifenoli prispevajo k obstojnosti lesa; na to, da se upre biološkemu razkroju. Njihova vloga je tudi kemijska obramba pred vdorom mikroorganizmov v rastlino in lahko sodelujejo tudi pri regulaciji rasti. Poleg tega polifenoli tudi bistveno vplivajo na naravno obarvanost lesa (Zule in Kozjan, 2008). Od vseh aromatičnih sestavin so v rastlinskih organih flavonoidi in tanini najbolj pogosti. Ne le, da imajo pomembno vlogo v samem delovanju rastline, so tudi komercialno pomembni - v farmaciji, prehrabeni industriji in v hortikulturi (Luthar, 1992).

2.2.2.2 Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine zgrajene iz 15 C-atomov, osnovno spojino flavon sestavljajo strukture, ki jih označimo s $C_6-C_3-C_6$ (Abram, 2000).

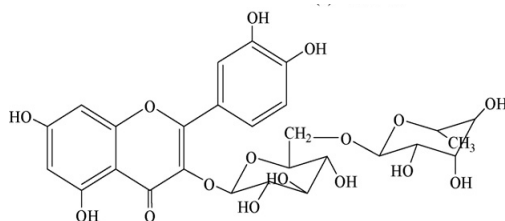
Med seboj se razlikujejo po razporeditvi hidroksilnih (-OH) in metoksilnih (-OCH₃) skupin in po vezanih sladkorjih (Galle, 2007). V naravi so flavonoidi običajno glikozilirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza) ali pa tudi daljše verige na obroč (Abram, 2000). Osnovna strukturna formula je predstavljena na Sliki 2.



Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (2-fenilbenzopiran)

Flavonoidi so pri vseh rastlinah najbolj razširjeni sekundarni metaboliti. Njihove biološke vloge v rastlini so različne: privlačijo insekte za opraševanje, ščitijo pred škodljivimi insekti, virusi in glivicami, zavirajo delovanje različnih encimov in vplivajo na oksidacijske in redukcijske procese v celici. Najprej je bil odkrit njihov vpliv na krvne kapilare (preprečujejo pokanje kapilar in zmanjšujejo njihovo prepustnost). Pomembo je tudi njihovo delovanje proti vnetjem in zbiranju vode v tkivih, saj zavirajo nastanek tkivnih hormonov prostaglandinov in njihov alergični učinek (Galle, 2007). Živali in ljudje jih ne morejo sintetizirati (Cook in Samman, 1996).

Najpogostejši flavonoidi v navadni ajdi so antocianini, C-glikozilflavoni, rutin (Slika 3) in kvercetin. Rutin je UV-B absorbirajoči flavonoid, ki se sintetizira v višjih rastlinah in jih zaščiti pred nevarnimi vplivi sevanja (Kim in sod., 2008).



Slika 3: Strukturna formula rutina

2.2.2.3 Tanini

Tanini so polifenoli, ki imajo bodisi flavonoidno C₆-C₃-C₆ jedro s priloženo flavan-3-ol (katehin in epikatehin) in flavan-3,4-diol (leukoantocianidin) skupino ali pa so estri fenolnih karboksilnih kislin (galična kislina, elagična kislina) in heksoznih molekul, običajno glukoze.

Tanini se lahko nahajajo v vseh delih rastlin, a le redko v monomerni obliki. Tvorijo komplekse s specifičnimi proteini in sladkorji, zaradi česar je izolacija otežena (Luthar in Kreft, 1999).

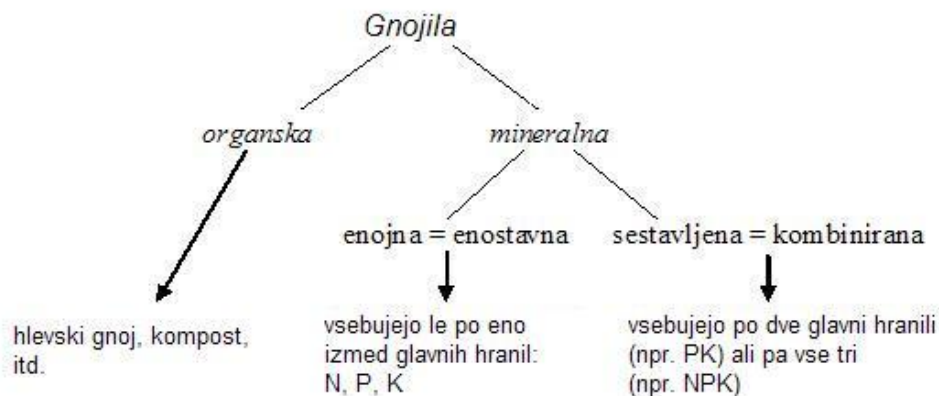
Tanine glede na kemijsko strukturo in strukturne značilnosti delimo na:

- hidrolizirajoče, ki temeljijo na estrih fenolne karboksilne kisline s centralnim karbohidratnim obročem,
- kondenzirane, ki so strukturno sorodni flavonoidom. Sestavljajo raznoliko skupino in so v naravi široko razširjeni. C₁₅ skelet je sestavljen iz dveh ločenih enot,
- kompleksne tanine, ki vsebujejo hidrolizirajočo taninsko molekulo med C-C vezmi (Luthar, 1992).

Tanini imajo specifične lastnosti, zaradi katerih jih uporabljajo v medicini, usnjarski, lesni ter vinarski industriji, pri varjenju piva, itd. Specifične lastnosti taninov so: antibakterijska, antitumorska, antivirusna in antimutagena vloga. So sestavine naravnih strojil, antioksidanti, naravni konzervansi, čistilna in razkuževalna sredstva, lesni konzervansi - biocidi. Njihovi neželeni učinki pa so: inhibirajo encime (α -amilazo), v večjih količinah imajo negativen vpliv na prebavljivost aminokislin in imajo zelo trpek okus (Luthar, 1992). V ajdi inhibirajo encime in zmanjšujejo prebavljivost beljakovin, pomembni so za kakovost ajdovih prehranskih izdelkov (Škrabanja in sod., 2000).

2.3 GNOJENJE

Gnojila so vsa sredstva, ki jih uporabljamo za gnojenje (Slika 4). Glavna tri rastlinska hranila, ki največkrat manjkajo zemlji in rastlinam, so dušik (N), fosfor (P) in kalij (K). Količine navedenih treh glavnih hranil v gnojilih izražamo v obliki P_2O_5 pri fosforju in pri kaliju K_2O , le za dušik uporabljamo elementarno obliko, N (Leskošek, 1993).



Slika 4: Razdelitev gnojil (prirejeno po Leskošek, 1993)

Značilnost organskih gnojil je, da so sestavljena iz organskih spojin, rastlinskih in živalskih odpadkov, ostankov in izločkov. V teh ostankih je praviloma (npr. v hlevskem gnoju) le malo ali nič rastlinskim koreninam neposredno dostopnih hranil. Organske snovi morajo najprej razpasti, da jih lahko rastline uporabijo za privzem mineralnih snovi (Leskošek, 1993).

Leskošek (1993) pravi, da kot zelo grobo povprečje lahko za običajni goveji gnoj s kmečkih gnojišč upoštevamo naslednje podatke o njihovi sestavi:

10 t hlevskega gnoja vsebuje povprečno:

- 50 kg dušika (N),
- 25 kg fosforja (P_2O_5),
- 60 kg kalija (K_2O),
- 60 kg apna (CaO).

V prvem letu uporabe, v letu po gnojenju, se gnojilna moč gnoja ne izčrpa v celoti. Dušika se porabi okoli 30 %. Toda fosfor in kalij iz hlevskega gnoja imata približno enako gnojilno delovanje kot P in K iz mineralnih gnojil. Torej je 25 kg P_2O_5 ali 60 kg K_2O iz 10 t hlevskega gnoja prav toliko vredno kot 25 kg P_2O_5 ali 60 kg K_2O iz mineralnih gnojil (Leskošek, 1993).

Med zorenjem hlevskega gnoja nujno nastanejo določene izgube, predvsem dušika, ki v obliki amonijaka izhlapi, in ogljika (iz organske snovi), ki izhlapeva v obliki CO₂. Toda med zorenjem se kakovost hlevskega gnoja izboljša in rastlinam dostopna hranila v njem deloma preidejo v obliko, ki je za rastline primernejša (Leskošek, 1993).

Mineralna gnojila so vse spojine in snovi ne glede na agregatno stanje, ki vsebujejo rastlinska hranila in se dodajajo tlom ali rastlinam zaradi izboljšanja rasti rastlin, povečanja pridelka, izboljšanja kakovosti pridelka ali izboljšanja rodovitnosti tal in so pridobljena v industrijskem postopku (Zakon o mineralnih gnojilih, 2002).

Mineralna gnojila vsebujejo rastlinska hranila v obliki neorganskih spojin (npr. kalijev klorid, amonijev nitrat ipd.), torej soli, ki predstavljajo tako rekoč že pripravljene hranilne snovi za rastline. Lahko vsebujejo tudi določene sestavine, iz katerih med delovanjem gnojila v tleh nastanejo in ostanejo nekatere baze ali kisline. Tako imajo taka gnojila fiziološko bazično ali fiziološko kislo delovanje. Dolgotrajna uporaba enih ali drugih gnojil lahko spremeni reakcijo tal (Leskošek, 1993).

2.4 EKOLOŠKA PRIDELAVA

Ekološka pridelava je celotni sistem upravljanja kmetijskega gospodarstva in pridelave hrane, ki združuje najboljšo okoljsko prakso, visoko raven biotske raznovrstnosti, ohranjanje naravnih virov, uporabo visokih standardov dobrega počutja živali in način pridelave v skladu z dajanjem prednosti nekaterih potrošnikov proizvodom, pridelanim z uporabo naravnih snovi in postopkov. Postopek ekološke pridelave igra tako dvojno družbeno vlogo: po eni strani oskrbuje specifičen trg in s tem zadošča povpraševanju potrošnikov po ekoloških proizvodih, po drugi strani pa zagotavlja javne dobrine in s tem prispeva k varovanju okolja, dobremu počutju živali in razvoju podeželja (Uredba EU o ekološkem kmetijstvu, 2007).

Ekološko kmetovanje obenem zagotavlja pridelavo visoko kakovostne in varne hrane, z bogato prehransko vrednostjo in visoko vsebnostjo vitaminov, mineralov in antioksidantov. Uporaba lahko topnih mineralnih gnojil, kemično sintetiziranih fitofarmaceutskih sredstev (pesticidov), gensko spremenjenih organizmov in proizvodov, pridobljenih iz teh organizmov ter različnih regulatorjev rasti, je pri tem načinu kmetovanja prepovedana. Zato v tej hrani praktično ni pričakovati ostankov teh snovi v pridelkih ali živilih in posledično - pri potrošnikih (Kaj je ekološko kmetijstvo?).

Pravila pridelave rastlin so prepisana iz Uredbe sveta (ES) št. 834/2007 o ekološki pridelavi, člen 12 določa tudi:

- v ekološki pridelavi rastlin se uporabljajo postopki obdelovanja zemlje in gojenja rastlin, ki ohranjajo ali povečujejo vsebnost organskih snovi v tleh, povečujejo stabilnost in biotsko raznovrstnost tal ter preprečujejo zbitost in erozijo tal;
- rodovitnost in biološka aktivnost tal se ohranjata in povečujeta z večletnim kolobarjenjem, vključno s stročnicami in drugimi podorinami, uporabo hlevskega gnoja ali drugih organskih materialov, obeh po možnosti kompostiranih, iz ekološke pridelave;
- uporaba biodinamičnih pripravkov je dovoljena;
- poleg tega je dovoljeno uporabljati le tista gnojila in dodatke za izboljšavo tal, ki se smejo uporabljati v ekološki pridelavi v skladu s členom 16;
- mineralnih dušikovih gnojil ni dovoljeno uporabljati;
- vse uporabljene tehnike pridelave rastlin preprečujejo ali zmanjšujejo onesnaženje okolja;
- preprečevanje škode zaradi škodljivcev, bolezni in plevela temelji predvsem na varovanju naravnih sovražnikov, izbiri vrst in sort, kolobarjenju, tehnikah gojenja in toplotni obdelavi (Uredba EU o ekološkem kmetijstvu, 2007).

2.5 KONVENCIONALNA PRIDELAVA

Konvencionalno pridelovanje je danes splošno najbolj razširjen in uveljavljen način pridelovanja hrane. Tak način je tako kapitalsko kot kemično zelo intenziven, ima visoko specializirane delovne moči in je očitno precej dobičkonosen, saj se s tem načinom pridelovanja v svetu pridelava 90 % vse hrane (Zagorc in sod., 2001). Pri tem načinu kmetovanja pridelovalci fitofarmacevtska sredstva običajno uporabljajo preventivno, gojenje z organskimi in anorganskimi gnojili običajno poteka brez predhodnih analiz tal in ekološka ozaveščenost kmetov je majhna. Prednosti konvencionalnega kmetijstva so visoka produktivnost, lep videz izdelkov, prihranek časa, lažje opravljanje dela ter nižje cene. Slabe plati konvencionalnega kmetijstva pa so osiromašenje narave, degeneracija tal – izguba humusa, ekološka nestabilnost, onesnaževanje okolja (pesticidi in nitrati v pitni vodi), poraba surovin in fosilne energije, obtoževanje kmetov za onesnaževanje okolja in poslabšanje strukture tal (Zajc, 2001).

Značilnost konvencionalnega pristopa je, da praktično ne pozna omejitev. Dovoljena je uporaba kemičnih sredstev za varstvo rastlin pred pleveli, boleznimi in škodljivci. Uporabo posameznih pripravkov odobri Ministrstvo za zdravje, poznamo pa že veliko zgledov, ko je bilo treba uporabo katerega od teh pripravkov prepovedati, ker je bil ugotovljen njihov negativni vpliv na človeka ali okolje (Osvald in Kogoj-Osvald, 2005).

2.6 PRIMERJAVA PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTOV V ODVISNOSTI OD NAČINA PRIDELOVANJA

V zadnjih letih so raziskovalci izvedli nekaj kontroliranih raziskav, kjer so primerjali ekološko in konvencionalno pridelano hrano, s tem da so upoštevali prehransko sestavo. Nekateri raziskave kažejo na to, da metode ekološke pridelave vodijo v povečano količino nutrientov, zlasti organskih kislin ter polifenolnih snovi in marsikatera od njih, kot so antioksidanti, velja za potencialno koristno za človeško zdravje. Nekateri druge raziskave pa niso dokazale razlik v nutrientih med ekološko in konvencionalno metodo pridelave (Winter in Davis, 2006).

Oblikovali so dve najverjetnejši hipotezi, ki razlagata možnost povečanja količine organskih kislin in polifenolov v ekološko pridelani hrani. Prva govori o vplivu različnih načinov gnojenja na rastlinski metabolizem. Pri konvencionalnem kmetovanju so sintetična gnojila pogosto narejena tako, da je dušik lažje dosegljiv rastlinam kot pri organskih gnojilih. Tako anorganska gnojila pospešijo rast in razvoj rastline, kar se kaže v upadu proizvodnje rastlinskih sekundarnih metabolitov, kot so organske kisline, polifenoli in amino kisline.

Druga hipoteza upošteva odgovor rastline na stresno okolje, kot npr. prisotnost plevelov, rastlinskih patogenov, objedanje žuželk. Potrjeno je bilo, da lahko pri ekološki pridelavi, kjer je za kontrolo rastlinskih škodljivcev omejena uporaba insekticidov, herbicidov in fungicidov, pride do večjih stresov v rastlinah in tako do vpliva, da rastline namenijo več virov za sintezo njim lastnih kemičnih obrambnih mehanizmov. Povečanje produkcije antioksidantov, kot so rastlinski polifenoli, bi pripisali obrambi rastline, čeprav bi enaki mehanizmi lahko povzročili povečanje drugih rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki bi bili lahko strupeni, namesto njihovega, posledično za človeka, hranilnega pomena (Asami in sod., 2003).

Toor in sodelavci (2006) so raziskovali vpliv treh različnih gnojil (mineralno gnojilo: dušik in amonijak v razmerju 4:1 ali 1:4, piščančji gnoj in travno-deteljna mešanica) na vsebnost antioksidantov v paradižniku. Ugotovili so, da je vrednost polifenolov v paradižniku, ki je uspeval na piščančjem gnoju in travno-deteljni mešanici za 17,6 % in 29 % višja, kot v paradižniku, gojenem z dodajanjem mineralnega dušikovega gnojila. Antioksidativna aktivnost z amonijem tretiranih rastlin je bila 14 % nižja v primerjavi z ostalimi tretirani.

Veberič je s sodelavci (2005) primerjal organsko in konvencionalno pridelana jabolka. Merili so količino fenolov v kašnati vsebini in lupini jabolk. Delež fenolov je v kaši organsko pridelanih jabolk večji, v lupini pa ni razlike v deležu fenolov med organsko in konvencionalno pridelanimi jabolki.

Pri opazovanju različno pridelane solate, ohrovtu in kitajskega kapusa Young in sodelavci (2005) niso našli statistično značilnih razlik v organsko pridelani solati in ohrovtu, pri kitajskem kapusu pa so izmerili večji delež fenolov v organskem kultivarju kitajskega kapusa.

Večja količina gnojenja ajde z dušikovim gnojilom (poskus s 60 in 90 kg/h) povzroča zmanjšanje količine rutina (Hagels in sod., 1995).

2.7 PRIMERJAVA PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTOV V RAZLIČNIH DELIH AJDE

Flavonoidi predstavljajo prevladujočo skupino fenolnih snovi v ajdi. Največja količina teh antioksidantov se nahaja v cvetovih, pecljih in steblih v času cvetenja in nastajanja prvih semen. Kot vseh ostalih flavonoidov, je tudi rutina več v zgornjih in mlajših listih, kot pa v spodnjih, starejših. Najnižji listi vsebujejo le 1,5 % flavonoidov, najvišji pa tudi več kot 10 %. V zaporednih analizah popolne listne frakcije so ugotovili, da je največja količina rutina v listih prisotna okrog 45. dan po setvi, kasneje s staranjem listov pride do upada rutina. Poleg rutina so prisotni tudi drugi flavonoidi v precej nižjih količinah: kvercitrina v cvetovih je bilo do 0,35 %, v ostalih delih rastline pa od 0,005 % do 0,03 %, hiperozida približno 0,005 % do 0,04 %, kvercitrina pa manj kot 0,007 % (Hagels in sod., 1995).

Kalinova in Vrchotova (2009) sta primerjali delež flavonoidov v posameznih delih ajde v času cvetenja. Delež flavonoida izokvercitrina pada v smeri: cvetovi > stebela > listi > korenine. Nivo flavonoida katehina pa je prav tako največji v cvetovih, manj ga je v koreninah in najmanj v listih.

Glede na vsebnost antioksidantov so najprimernejši deli rastline listi in cvetovi v stanju, ko rastlina cveti. Največ je rutina (ki je tudi najpomembnejši antioksidant v ajdi) in epikatehina (Kalinova in sod., 2006). Semena navadne ajde vsebujejo od 12,6 do 35,9 mg rutina/100 g suhe mase (Kim in sod., 2008).

Vsebnost rutina v cvetovih po cvetenju v fazi nastajanja ploda upade. Med oblikovanjem in razvojem ploda, se spremeni kvaliteta in kvantiteta fenolnih komponent. Plodovi ajde vsebujejo od 0,5 % do 4,5 % taninov, kar je odvisno od genotipa, poliploidnosti, starosti plodu in ekoloških dejavnikov. Rastline enakega genotipa, ki so rasle v različnih okoljih, imajo pogosto različno vsebnost taninov (Luthar, 1992).

3 MATERIAL IN METODE

V diplomski nalogi smo ugotavljali celotno količino polifenolov, flavonoidov in taninov v cvetovih, zgornjih in spodnjih listih ter plodovih navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) s spektrofotometrično metodo pri kontrolni skupini rastlin, skupini, ki je rasla v prsti, pognojeni s hlevskim gnojem in skupini, ki je uspevala v tleh, pogojenih z mineralnim gnojilom NPK. Vse skupine smo gojili pri enakih vremenskih razmerah. Cvetove in liste smo pobrali septembra, plodove pa oktobra 2008.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Rastline

Pri poskusu smo uporabili rastlino navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*), kultivar Siva. Plodove navadne ajde smo posejali, za nadaljnji poskus pa uporabili cvetove, zgornje in spodnje liste ter plodove rastlin iz posejanih plodov.

3.1.2 Kemikalije

- NPK gnojilo (7-20-30), Petrokemija, tvornica gnojiva, Hrvaška
- aluminijev klorid heksahidrat, čistoča $\geq 99\%$ (AT), Fluka, Švica
- brezvodni natrijev karbonat, Fluka, Švica
- etanol 96 %, Fluka
- Folin-Ciocalteau-jev fenolni reagent, Fluka, Švica
- klorovodikova kislina, min. 32 %, Riedel-de Haen
- kvercetin dihidrat, Fluka
- levo-epikatehin, Janssem Chimica, Belgija
- metanol, CH₃OH, čistoča $> 99,8\%$, p.a., Riedel-de Haen
- pirogalol, 99 %, A.C.S. reagent, Sigma-Aldrich, Japonska
- rutin, Roth
- vanilin, Fluka, Francija

3.1.3 Aparature

- analizna tehtnica, Kern, Nemčija
- centrifuga, Tehnica, Centric 150
- stresalnik, Tehnica, Vibromix 314EVT, Šentjernej
- mikrotitrské ploščice 96F, TPP[®], Švica
- spektrofotometer TECAN (Genios)
- UZ kadička, ISKRA PIO d.o.o. Šentjernej

3.2 METODE

3.2.1 Poljski poskus

Ajda je rasla na polju v Klečah pri Ljubljani. Prst, v kateri je uspevala, je pečena, neposredno pred tem pa je na tej površini rasla pšenica. Nazadnje je bila prst gnojena s hlevskim gnojem pred posevkom pšenice, oktobra 2007.

Odločili smo se, da bo delo potekalo v štirih ponovitvah. Na polju smo 24. julija 2008 posejali ajdo in po osmih dneh naključno določili kvadrat v velikosti 4 x 4 m, ki smo ga razdelili na 16 manjših kvadratov z velikostjo 1 m² (Preglednica 1). Vsakega od 16 kvadratov smo omejili z vrvico, ki smo jo postavili približno 30 cm nad zemljo. Tako je vsaka ponovitev zajemala po en m² površine tal brez dodanega gnojila (kontrolna skupina), en m² površine tal, kjer smo dodali hlevski gnoj, en m² površine tal z dodanim mineralnim gnojilom NPK in en m² tal z dvakratno količino mineralnega gnojila NPK. Ko sta se na rastlinah pojavila prva prava lista, smo prsti v kvadrantih dodali hlevski gnoj ter mineralno gnojilo. Pred tem smo po statistični metodi naključnih kvadratov določili naključno porazdelitev kvadrantov. Razporeditev prikazuje Preglednica 1.

Na 1 m² tal smo dodali 1 kg starega hlevskega gnoja, 30 dag mineralnega gnojila NPK, oziroma 60 dag mineralnega gnojila NPK.

Preglednica 1: Postavitev poskusa

1x mineralno gnojilo	2x mineralno gnojilo	kontrola	hlevski gnoj
kontrola	hlevski gnoj	2x mineralno gnojilo	1x mineralno gnojilo
kontrola	1x mineralno gnojilo	hlevski gnoj	2x mineralno gnojilo
hlevski gnoj	2x mineralno gnojilo	kontrola	1x mineralno gnojilo

Vse rastline so rastle v enakih vremenskih in temperaturnih razmerah.

Septembra smo s petnajstih, naključno izbranih rastlin v vsakem kvadrantu ločeno pobrali cvetove, spodnje in zgornje liste. Spodnje in zgornje liste smo razlikovali po pecljatosti, saj so spodnji listi pecljati, zgornji pa sedeči. Cvetove in liste posameznih kvadrantov smo ločeno shranili v papirnate vrečke.

V sredini oktobra smo zopet s petnajstih, naključno izbranih rastlin v posameznem kvadrantu, pobrali dozorele plodove in tudi te ločeno shranili v papirnate vrečke.

3.2.2 Delo v laboratoriju

3.2.2.1 Priprava vzorcev in ekstrakcija

Vzorci smo v papirnatih vrečkah posušili na zraku.

Za laboratorijsko delo smo uporabili postopke, ki se uporabljajo za določanje vsebnosti fenolov in fagopirina (Granda, 2009; Kreft in sod., 2002). Postopke smo delno modificirali. Najprej smo poiskali ustrezne pogoje ekstrakcije, nadaljnje delo pa je potekalo po že izvajanih postopkih.

Za določanje prisotnosti omenjenih antioksidantov v cvetovih in listih smo potrebovali 50 mg, pri plodovih pa 600 mg zmletega vzorca. Vzorce smo strli v terilnici, natehtali ustrezno količino za posamezen vzorec, natehti pa dodali 10 ml 60 % etanola. Vzorce smo v etanolu čez noč, pri sobni temperaturi, ekstrahirali na stresalniku. Naslednji dan smo vzorce 10 min centrifugirali pri 4000 obratih/ min. Supernatant smo uporabili za analizo.

3.2.2.2 Analiza vzorcev

Po ekstrakciji in centrifugiranju smo določen volumen supernatanta (volumen je podan v Preglednici 2) odpipetirali na mikrotitrsko ploščico, kjer smo vzorec razredčili ter dodali ustrezne reagente. Po določenem času smo s spektrofotometrom pri valovni dolžini za določen antioksidant izmerili absorbanco (A) (čas in valovna dolžina so zapisani v Preglednici 2) vzorca z dodanim reagentom ter absorbanco slepega vzorca. Enak postopek smo uporabili tudi za standarde.

Preglednica 2: Prikaz pogojev in reagentov za analizo polifenolov, flavonoidov in taninov

	POLIFENOLI	FLAVONOIDI	TANINI
STANDARDNE RAZTOPINE	pirogalol	rutin	epikatehin
VOLUMEN VZORČNE RAZTOPINE	20 µl	60 µl za cvetove in liste, 180 µl za plodove	50 µl
VZORČNA RAZTOPINA (REAGENTI)	150 µl destilirana voda 10 µl F-C reagent 20 µl Na ₂ CO ₃ (dodamo po 3 min)	20 µl AlCl ₃	100 µl vanilin 50 µl 32 % HCl
SLEPA RAZTOPINA (REAGENTI)	160 µl destilirana voda 20 µl Na ₂ CO ₃ (dodamo po 3 min)	120 µl metanol za cvetove in liste, 20 µl metanola za plodove	100µl 96 % etanol 50 µl 32 % HCl
MERJENJE A PO:	60 min	30 min	15 min
MERJENJE A PRI VALOVNI DOLŽINI:	750 nm	425 nm	500 nm

3.2.2.2.1 Določanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteau-jevo metodo

Folin-Ciocalteau-jeva metoda se uporablja za določanje celokupne vsebnosti rastlinskih fenolov. Metoda ni specifična in odkriva vse fenolne skupine, ki se nahajajo v ekstraktu (Naczk in Shahidi, 2004).

Določitev skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi je relativno enostavna, saj vzorec ne zahteva posebne priprave. V alkalni raztopini se fenolne spojine oksidirajo s Folin-Ciocalteau-jevim (F-C) (fosfomolibdenska-fosfovolframova kislina) reagentom v modro spojino z absorpcijskim maksimumom pri 746 nm. Absorbanco pri tej valovni dolžini merimo spektrofotometrično in je premosorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu (Prior in sod., 2005).

3.2.2.2.2 Določanje vsebnosti flavonoidov z uporabo aluminijevega klorida

Postopek kvantifikacije flavonoidov temelji na reakciji med flavonoidi in aluminijevim kloridom, pri čemer se tvori kompleks, ki obarva raztopino rumeno in ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 420 nm. Flavonoidi vsebujejo več strukturnih lastnosti, ki omogočajo tvorbo kompleksov s kovinami. Med flavonoidi in aluminijevimi ioni se tvorijo kompleksi v različnih stehiometričnih razmerjih (aluminij : flavonoidi = 2:1, 1:1 in 1:2). Kompleks 2:1 se tvori le, če je v mediju prisotna velika koncentracija Al(III) (Granda, 2009).

3.2.2.2.3 Določanje vsebnosti taninov z vanilin-HCl metodo

Vsebnost taninov smo določili z vanilin-HCl testom, ki temelji na barvni reakciji. Ekstrakcijo izvedemo z metanolom. Po dodatku vanilina, se razvije rožnata barva, katere intenziteta je odvisna od količine proantocianidinov v vzorcu (Knapp, 2003).

Razlika opisane metode in poteka naše analize je v tem, da je pri našem poskusu ekstrakcija potekala v etanolu.

Ta metoda se pogosto uporablja za določanje proantocianidinov (kondenziranih taninov) v rastlinah, posebno v zrnju. Analiza z vanilinom je uporabna metoda zaradi svoje enostavnosti, občutljivosti in specifičnosti (Naczk in Shahidi, 2004).

3.2.2.3 Spektrofotometrična metoda

S spektrofotometrom merimo prepustnost ali transmisijo (T) raztopine za svetlobo določene valovne dolžine. Transmisija je razmerje med intenziteto prepuščene svetlobe in intenziteto vpadne svetlobe in je sorazmerna koncentraciji topljenca in debelini plasti raztopine:

$$T = 10^{-klc}$$

pri čemer je k značilna konstanta snovi, l debelina plasti in c koncentracija raztopine. Če naneseemo v diagram na abscisno os vrednosti za koncentracijo, na ordinatno os pa izmerjeno transmisijo, dobimo eksponentialno krivuljo. Da se temu izognemo, izraz logaritmiramo in dobimo $\log T = -k \cdot l \cdot c$ oziroma $-\log T = k \cdot l \cdot c$. Negativni logaritem transmisije, ki je sedaj linearno odvisen od koncentracije, imenujemo ekstinkcija oziroma absorpcija. Spektrofotometer, ki smo ga uporabili za analizo vzorcev, nam je že dal podatke izražene v obliki absorpcije (Dolenc, 1996).

3.2.2.4 Priprava standardov in reagentov

Priprava standardov:

Kot standarde smo uporabili epikatehin, kvercetin, pirogalol in rutin. Pripravili smo jih tako, da smo 1 mg posameznega standarda raztopili v 10 ml 60 % etanola. Raztopine standardov smo shranjevali v hladilniku. Vzoredno z vzorci smo analizirali tudi standardne raztopine.

Preglednica 2 prikazuje, pri katerih analizah smo uporabili določen standard.

Priprava reagentov:

Za analizo vsebnosti **polifenolov** smo uporabili **20 % Na₂CO₃**, ki smo ga pripravili tako, da smo v 10 ml destilirane vode raztopili 2 g brezvodnega Na₂CO₃.

Za analizo vsebnosti **flavonoidov** smo uporabili **5 % AlCl₃**, ki smo ga pripravili z raztapljanjem 500 mg AlCl₃ z 10 ml metanola.

Za analizo vsebnosti **taninov** v vzorcu smo uporabili **4 % vanilin**, ki smo ga pripravili tako, da smo 400 mg vanilina raztopili v 10 ml 96 % etanola.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Iz rezultatov, ki smo jih dobili z meritvami vzorcev, smo izračunali povprečne vrednosti parametrov in standardno deviacijo.

Rezultate, dobljene pri tretiranju različnih vzorcev, smo med seboj primerjali s programom Statgraphic Plus 4.0. S tem programom smo najprej testirali variance s Cochranovim, Bartlettovim in Hartleyevim testom, da smo ugotovili, ali so variance primerjanih vzorcev enake ali različne (pri 0,05 % tveganju). Značilne razlike med vzorci smo iskali z multifaktorskim ANOVA testom.

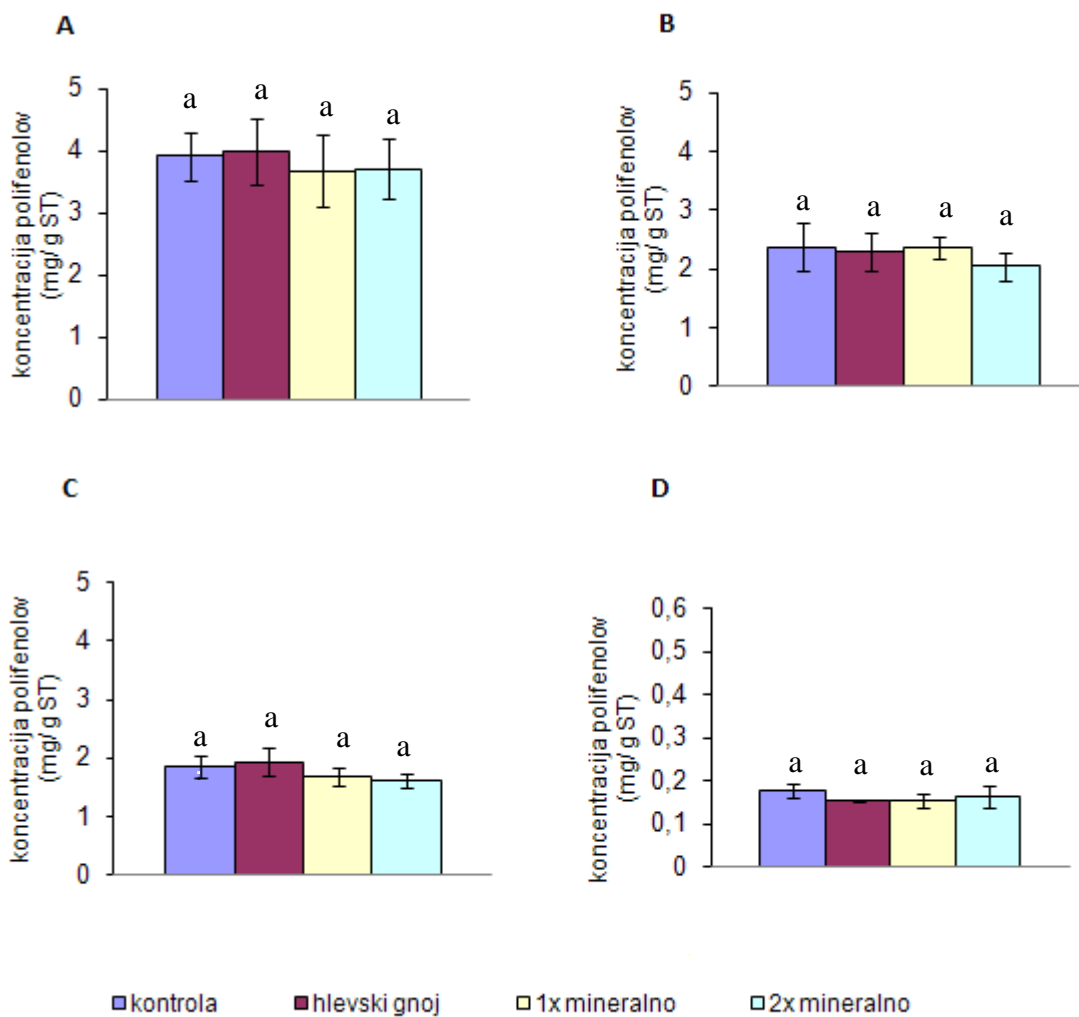
Rezultate smo grafično prikazali in vzorcem, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo, pripisali različne črke ($a = p > 0,05$ in $b = p < 0,05$).

4 REZULTATI

4.1 VSEBNOST ANTIOKSIDANTOV V DELIH RASTLIN GLEDE NA GNOJENJE TAL

4.1.1 Vsebnost polifenolov

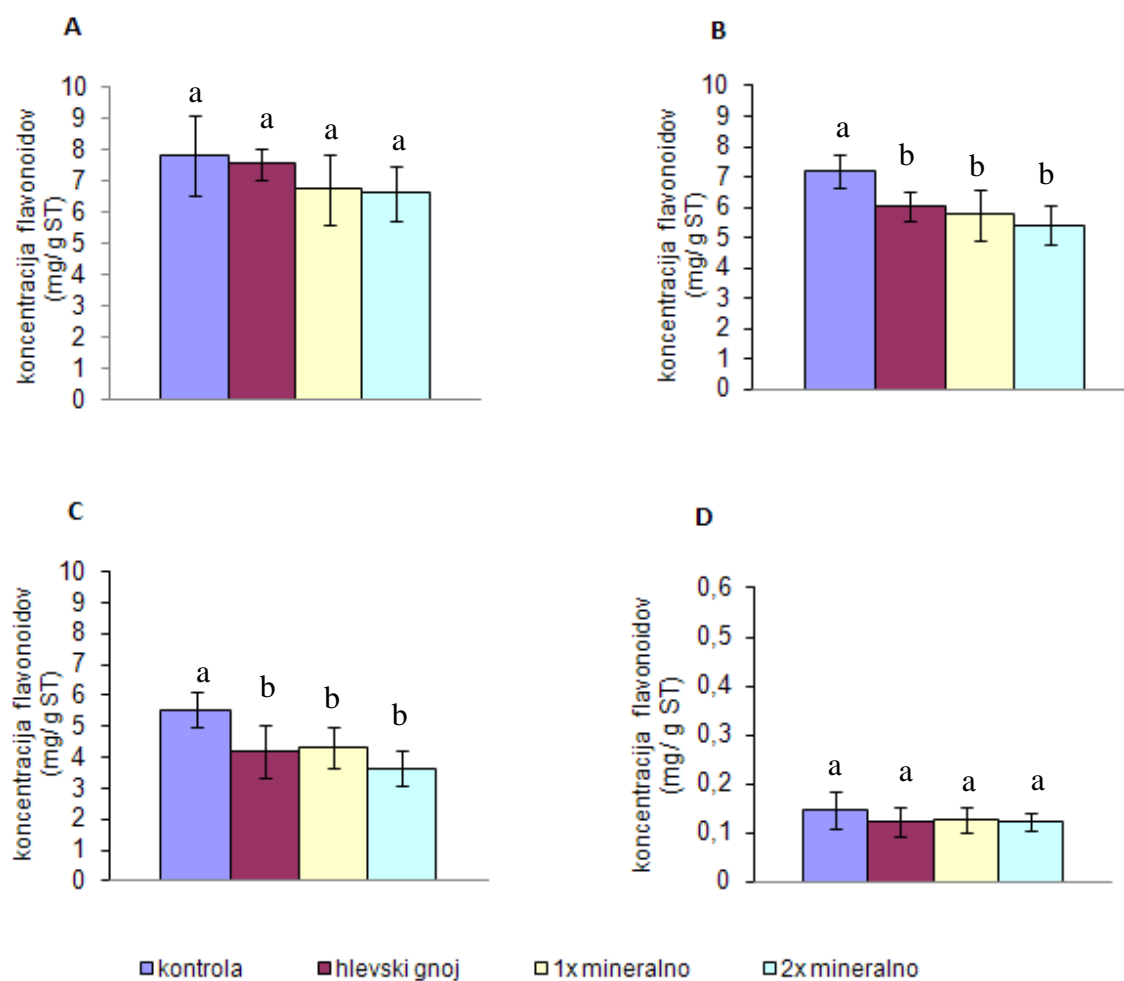
Iz Slike 5 vidimo, da je količina polifenolov v cvetovih največja (Slika 5A), nato pa upade v zgornjih in spodnjih listih (Slika 5B in 5C). V plodovih (Slika 5D) je količina polifenolov minimalna. Same razlike v količini polifenolov med rastlinami, ki so rasle v različno gnojenih tleh med posameznimi regijami rastlin, niso statistično značilne. Količina polifenolov pri vseh načinih gnojenja med posameznimi regijami enakomerno upada od cvetov in listov pa do plodov. Stolpci so označeni z enako črko, saj se vrednosti stolpcev med seboj statistično značilno ne razlikujejo ($p > 0,05$).



Slika 5: Količina polifenolov v suhi snovi ajde, ki je rasla v različno pognojnih tleh; v cvetovih (A), v zgornjih listih (B), v spodnjih listih (C) in v plodovih (D). Prikazane so povprečne vrednosti \pm SD (n=8). Razlike med vzorci smo testirali z ANOVA (a= $p > 0,05$)

4.1.2 Vsebnost flavonoidov

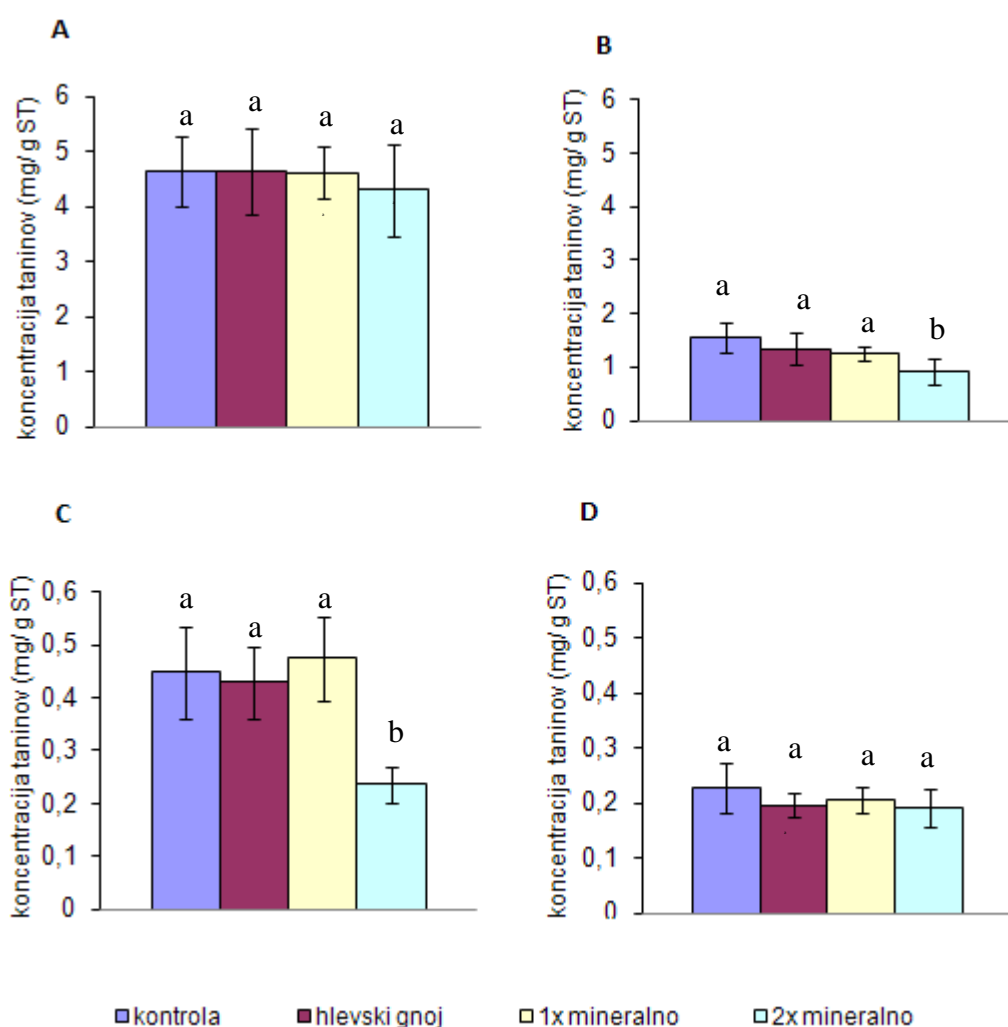
Iz Slike 6 vidimo, da je tudi količina flavonoidov v suhi snovi merjenih regij ajde največja v cvetovih (Slika 6A). V cvetovih in plodovih razlika v količini flavonoidov med rastlinami, gojenimi v različnih tleh ni statistično značilna (stolpci so označeni z enako črko a). V zgornjih in v spodnjih listih (Slika 6B in 6C) pa opazimo razliko v količini flavonoidov med rastlinami, ki so rasle v različnih tleh. S tem ko smo dodali rastlinam hlevski gnoj in različno količino mineralnega gnojila, je količina flavonoidov v zgornjih in spodnjih listih statistično značilno upadla (stolpci so označeni s črko a in b). Količina flavonoidov pri vseh tipih gnojenja postopno upada od cvetov do zgornjih in spodnjih listov ter strmo upade v plodovih, kjer je količina flavonoidov minimalna. Strmina upadanja vsebnosti flavonoidov je pri vseh tipih gnojenja podobna, razlike so le v količini flavonoidov glede na gnojenje. Razlika v vsebnosti flavonoidov pri vseh tipih gnojenja med cvetovi ter zgornjimi listi je manjša, kot med zgornjimi in spodnjimi listi.



Slika 6: Količina flavonoidov ajde, ki je rasla v različno pognojenih tleh; v cvetovih (A), v zgornjih listih (B), v spodnjih listih (C) in v plodovih (D). Prikazane so povprečne vrednosti \pm SD ($n=8$). Razlike med vzorci smo testirali z ANOVA ($a= p > 0,05$; $b= p < 0,05$).

4.1.3 Vsebnost taninov

Slika 7 nam prikazuje, da je količina taninov v cvetovih največja (slika 7A). V zgornjih listih vsebnost taninov upade na manj kot 2 % (Slika 7B), v spodnjih listih in plodovih pa je minimalna (Slika 7C in 7D). Pri vseh tipih gnojenja je razlika v količini taninov med cvetovi in ostalimi deli ajde, največja. Razlika v vsebnosti taninov med rastlinami, ki so rasle v različno pognojenih tleh v suhi snovi cvetov in plodov ni statistično značilno različna (stolpci so označeni z enako črko) (Slika 7A in 7D). Vsebnost taninov v suhi snovi zgornjih in spodnjih listov pa se statistično značilno razlikuje med rastlinami, ki so rasle v tleh gnojenih z dvakratno količino mineralnega gnojila in rastlinami, ki so rasle v ostalih treh tipih tal (stolpci so označeni s črko a in b) (Slika 7B in 7C).



Slika 7: Količina taninov ajde, ki je rasla v različno pognojenih tleh; v cvetovih (A), v zgornjih listih (B), v spodnjih listih (C) in v plodovih (D). Prikazane so povprečne vrednosti \pm SD (n=8). Razlike med vzorci smo testirali z ANOVA (a= $p > 0,05$; b= $p < 0,05$).

4.1.4 Delež antioksidantov v različnih delih ajde

Preglednica 3 prikazuje deleže študiranih antioksidantov v cvetovih, zgornjih ter spodnjih listih in plodovih glede na delež antioksidantov v cvetovih, ki smo jim pripisali 100 %. Iz rezultatov se vidi upad deleža antioksidantov znotraj rastline. Razlika v deležu flavonoidov je med cvetovi in zgornjimi listi najmanjša, sledi upad polifenolov, upad deleža taninov od cvetov do zgornjih listov pa je največji. Enak je tudi vrstni red upada v deležu proučevanih antioksidantov med cvetovi in spodnjimi listi. Nasprotno pa je flavonoidov v plodovih v primerjavi s koncentracijo v cvetovih, najmanj.

Preglednica 3: Delež antioksidantov v različnih delih ajde, ki je rasla v različno gnojenih tleh, v primerjavi s koncentracijo v cvetovih

		v cvetovih	v zgornjih listih	v spodnjih listih	v plodovih
polifenoli	kontrola	100 %	60,4 %	47,5 %	4,5 %
	hlevski gnoj	100 %	57,3 %	48,5 %	3,9 %
	1x mineralno gnojilo	100 %	64,3 %	45,8 %	4,4 %
	2x mineralno gnojilo	100 %	54,9 %	43,9 %	4,5 %
flavonoidi	kontrola	100 %	92,1 %	71,1 %	1,9 %
	hlevski gnoj	100 %	79,8 %	55,7 %	1,6 %
	1x mineralno gnojilo	100 %	85,5 %	63,9 %	1,9 %
	2x mineralno gnojilo	100 %	82,2 %	55,2 %	1,9 %
tanini	kontrola	100 %	33,1 %	9,6 %	4,9 %
	hlevski gnoj	100 %	28,9 %	9,2 %	4,2 %
	1x mineralno gnojilo	100 %	27,2 %	10,2 %	4,4 %
	2x mineralno gnojilo	100 %	21,4 %	5,5 %	4,4 %

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Največja vsebnost polifenolov, flavonoidov in taninov v suhi snovi vseh opazovanih delov ajde je pri rastlinah, ki so bile gojene na kontrolnih tleh (Slike 5, 6 in 7).

S tem ko smo tlem dodali hlevski gnoj, se delež nobenega izmed proučevanih antioksidantov v cvetovih in plodovih ni statistično značilno zmanjšal. V cvetovih in spodnjih listih (Slika 5) lahko opazimo težnjo večje vsebnosti polifenolov v rastlinah, gnojenih s hlevskim gnojem, a ta težnja ni značilna. Delež flavonoidov v zgornjih in spodnjih listih pa je pri rastlinah, ki so uspevale v tleh, pognojenih s hlevskim gnojem, statistično značilno nižji (Slika 7). Iz tega domnevamo, da gnojenje s hlevskim gnojem ne vpliva na delež polifenolov in taninov v opazovanih delih ajde, vpliva pa na delež flavonoidov v listih.

V primerjavi vsebnosti antioksidantov med rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih tleh in rastlinami v tleh, pognojenih z enkratno količino mineralnega gnojila (30 dag/m^2), je razvidna težnja upada količine antioksidantov, s tem ko tlem dodamo mineralno gnojilo (Slike 5, 6 in 7), a ta težnja je zopet značilna le pri upadu vsebnosti flavonoidov v zgornjih in spodnjih listih. V spodnjih listih je vsebnost taninov v ajdi, ki je uspevala v tleh z enkratno količino mineralnega gnojila, največja, a razlika v primerjavi z vsebnostjo taninov v rastlinah, gojenih v kontrolnih tleh in tleh, pognojenih s hlevskim gnojem ni značilna (Slika 7C).

Najbolj so opazne razlike v vsebnosti antioksidantov med rastlinami, ki so rasle v tleh z dvakratno količino mineralnega gnojila (60 dag/m^2) in rastlinami, ki so uspevale na ostalih treh tleh (Slike 5, 6 in 7). Tudi v tem primeru pri cvetovih ne opazimo značilne razlike v vsebnosti proučevanih antioksidantov med rastlinami, gojenimi na različnih tleh (Slike 5A, 6A in 7A). V zgornjih listih je statistično značilna razlika v vsebnosti flavonoidov in taninov med kontrolnimi rastlinami in temi, ki so uspevale na tleh z dvakratno količino mineralnega gnojila (Slike 6B in 7B). V zgornjih listih vsebnost taninov v suhi snovi (Slika 7B) med kontrolno skupino in skupino z dvakratno količino mineralnega gnojila upade za 40,6 %, upad deleža flavonoidov v zgornjih listih (Slika 6B) pa je 24,5 %. Pri spodnjih listih upad vsebnosti polifenolov med kontrolno skupino in skupino z dvakratno količino mineralnega gnojila ni značilen (Slika 5C), delež flavonoidov upade za 34,4 %, delež taninov pa za 46,7 % (Slike 6C in 7C). Tudi pri plodovih opazimo težnjo upadanja z dodajanjem gnojila, a le-ta ni značilen (Slike 5D, 6D in 7D).

Rezultati kažejo, da kakršno koli dognojevanje vpliva na upad vsebnosti flavonoidov tako v zgornjih kot v spodnjih listih ajde. S tem smo potrdili raziskave Hagelsa in sodelavcev (1995), ki so ugotovili, da večja količina gnojenja ajde z dušikovim gnojilom povzroča zmanjšanje količine flavonoida rutina. Luthar (1992) pravi, da imajo rastline enakega genotipa, ki pa so rasle v različnih okoljih, pogosto različno vsebnost taninov. Naše raziskave kažejo na to, da večja količina mineralnega gnojila vpliva na nižji delež taninov v listih. Ugotovimo pa tudi, da gnojenje ne vpliva na delež polifenolov v nobenem od opazovanih delov ajde, ter na delež flavonoidov in taninov v cvetovih in semenih. Torej so te raziskave pomembne predvsem za proizvajalce, ki se ukvarjajo s pridelavo ajde. Znano

je, da je ajda skromna rastlina glede potreb po hranilih (Kreft, 1995). Te raziskave nam to potrjujejo. Iz rezultatov vidimo, da za povečanje kvalitete in kvantitete človeku pomembnih hranilnih snovi (v našem primeru antioksidantov) dognovanje ni potrebno ali pa celo zniža vsebnost antioksidantov v suhi snovi rastlinskih delov ajde. Zaradi nezahtevnega gojenja je ajda primerna v ekološkem kmetijstvu, prav tako uspeva tudi na pogojenih tleh. Ker pa vemo, da ima gnojenje lahko negativni vpliv na prst (lahko pride do spremembe reakcije tal) (Leskošek, 1993) in da povzroča zmanjšanje količine flavonoida rutina (Hagels in sod., 1995), bi se morali tudi konvencionalni kmetje gnojenju izogibati, v kolikor cenijo kvalitetno pridelano hrano. Asami in sodelavci (2003) predstavljajo hipotezo, da naj bi dodajanje anorganskih gnojil rastlinam pospešilo rast in razvoj rastline, prišlo pa naj bi do upada sekundarnih metabolitov. Morda bi lahko slednjo hipotezo povezali tudi z našimi rezultati (Sliki 6 in 7), kjer vidimo upad vsebnosti flavonoidov in taninov v listih z dodajanjem večje količine mineralnega gnojila.

Rezultati prikazujejo upad vsebnosti posameznih proučevanih antioksidantov (Slike 5, 6 in 7) v različnih regijah rastline. Iz rezultatov vidimo, da je upad vsebnosti polifenolov od cvetov do plodov (Slika 5) v primerjavi z upadom vsebnosti flavonoidov in taninov (Sliki 6 in 7) razmeroma postopen in enakomeren. Polifenoli so zelo velika in raznolika skupina antioksidantov. V vsakem delu rastline se nahajajo različni polifenoli in morda je ta enakomeren upad posledica seštevka vseh polifenolov, saj pri opazovanju ostalih antioksidantov, ki sodijo med polifenole, vidimo drugačen upad. Vsebnost flavonoidov (Slika 6 ter Preglednica 3), katerih ena od nalog je tudi zaščita pred UV-B sevanjem, je tudi v zgornjih in spodnjih listih visoka, medtem ko je v plodovih vsebnost le-teh minimalna. Vsebnost taninov pa strmo upade od cvetov do zgornjih in spodnjih listov ter plodov (Slika 7).

Naši rezultati potrjujejo ugotovitve že narejenih raziskav (Kalinova in Vrchotova, 2009; Hagels in sod., 1995). Dokazali smo, da delež proučevanih antioksidantov znotraj rastline pada: cvetovi > zgornji listi > spodnji listi > plodovi (Slike 5, 6 in 7 in Preglednica 3). Tak vrstni red je prisoten pri vseh rastlinah – ne glede na tip gnojenja.

Največ proučevanih antioksidantov vsebujejo cvetovi, zato smo glede na njihovo količino njim pripisali delež 100 %, delež antioksidantov v ostalih delih rastlin pa smo izračunali glede na deleže v cvetovih. Primerjavo v deležih antioksidantov med različnimi deli znotraj rastlin pa tudi glede na gnojenje predstavlja Preglednica 3. Rezultati kažejo, da delež antioksidantov pada od cvetov preko zgornjih do spodnjih listov. To bi lahko pojasnili z razlago, da so zgornji deli rastline bolj izpostavljeni tako abiotičnim dejavnikom - UV-B žarkom ter različnim drugim vremenskim in temperaturnim vplivom kot tudi biotičnim dejavnikom, zato vsebujejo cvetovi in zgornji listi večji delež proučevanih antioksidantov, predvsem flavonoidov. Vloga nekaterih flavonoidov je tudi obarvanje cvetov in listov. S tem privabljajo opraševalce. Poleg tega pa je pomembna vloga flavonoidov zaščita pred bakterijami in virusi. Sklepamo, da je zato v zgornjih delih ajde flavonoidov največ. Tudi tanini z dajanjem trpkega okusa in drugimi lastnostmi (Luthar, 1992) zmanjšujejo obejdanje cvetov in listov. V plodovih je delež proučevanih antioksidantov manj kot 1 %. Luthar (1992) pravi, da se med oblikovanjem in razvojem ploda spremeni kvaliteta in kvantiteta fenolnih komponent. Semenu zaščito predstavlja semenska lupina, zato predvidevamo, da potreba po antioksidantih v samih plodovih ni

tako velika, ostala tkiva pa niso tako zaščitena, zato v njih nastaja več antioksidativnih snovi. Spodnji listi vsebujejo manjši delež proučevanih antioksidantov kot cvetovi in zgornji listi, saj so manj izpostavljeni okoljskim razmeram. Morda bi dobili drugačne rezultate, če bi bil posevek rastlin redkejši in bi bili spodnji listi okolju bolj izpostavljeni.

V Preglednici 3 opazimo, da je delež taninov v plodovih (v primerjavi z deležem v cvetovih) med vsemi proučevanimi antioksidanti največji, medtem ko je upad deleža flavonoidov v plodovih največji (v listih pa najmanjši v primerjavi z deležem v cvetovih). Sklepamo, da imajo zaradi semenske lupine flavonoidi manjšo vlogo pri zaščiti pa tudi obarvanost z živimi barvami v plodovih ni več potrebna, tanini pa s svojim antibakterijskim in antiviralnim delovanjem, dajanjem trpkega okusa (s tem pa vplivanjem na okusnost in zauživanje hrane), zmanjševanjem prebavljivosti ter drugimi učinki (Luthar, 1992) vplivajo na obstojnost semena.

Prav ti rezultati so pomembni tudi za predelovalce ajde (v farmaciji – npr. ajdovi čaji in prehrabeni industriji), saj morajo za pravilne mešanice pripravkov poznati razmerja antioksidantov v posameznih delih rastline.

5.2 SKLEPI

Gnojenje s hlevskim gnojem ne vpliva na vsebnost polifenolov, flavonoidov in taninov v cvetovih in plodovih ajde ali pa vpliva na rastlino tako, da le-ta zmanjša koncentracijo flavonoidov v listih. Delež polifenolov in taninov pa se tudi v listih pri gnojenju s hlevskim gnojem ne spreminja.

Večja, tlem dodana količina mineralnega gnojila vpliva na manjši delež flavonoidov in taninov tako v zgornjih kot v spodnjih listih ajde. Iz tega sklepamo, da se na gnojenje najbolj odzivajo listi.

Največji delež proučevanih antioksidantov je v cvetovih, nato pa njihov delež upada od zgornjih do spodnjih listov in plodov, kjer je delež antioksidantov najmanjši. Cvetovi in listi so bolj izpostavljeni tako abiotskim kot biotskim dejavnikom, zato vsebujejo več antioksidantov. Deli rastline, ki so vplivom okolja manj izpostavljeni, oziroma bolj zaščiteni pred vplivi okolja; v naši raziskavi so to plodovi, kjer je zaščita za seme semenska lupina, vsebujejo manjši delež proučevanih antioksidantov.

Ti rezultati so pomembni za vse, ki se ukvarjajo s pridelavo ajde. Ajda je skromna rastlina glede potreb po hranilih. Zato dognojevanje za samo kvaliteto in kvantiteto hranilnih snovi, kot so antioksidanti, ni potrebno ali pa celo znižuje deleže teh snovi v rastlini. Ajda je kulturna rastlina, ki je primerna za pridelavo tako v ekološkem kot konvencionalnem kmetijstvu, konvencionalni pridelovalci pa bi se morali pri tem zavedati, da z dognojevanjem ne vplivajo na kvaliteto ajdinih pridelkov, kar pa je za sodobnega človeka, ki ceni kakovostno hrano zelo pomembno.

Rezultati so pomembni tudi za predelovalce ajde, predvsem za proizvajalce ajdovih čajev, saj morajo le-ti za pravilne mešanice poznati razmerja antioksidantov v različnih delih ajde, kar pa se da iz naših rezultatov lepo razbrati.

6 POVZETEK

Antioksidanti so spojine, ki preprečujejo oksidativni stres. Nekaterih antioksidantov živali in ljudje ne moremo izgrajevati, zato jih moramo pridobiti z rastlinsko hrano.

Ajda je rastlina, ki je zaradi visoke vsebnosti antioksidantov (predvsem flavonoida rutina) vse bolj priljubljena, nekaj desetletij pozabljena, poljščina. Poleg tega ima zelo dobro hranilno vrednost in vsebuje veliko pomembnih mineralov. Pri njej so bile v zadnjem času narejene številne raziskave.

Naš poskus je potekal tako, da smo izmerili delež polifenolov, flavonoidov in taninov v ajdi, ki je uspevala na štirih različno pognojenih in nepognojenih parcelicah. Tla smo razlikovali glede na vsebnost gnojila v njih. Prvi, kontrolni, skupini tal nismo dodali gnojila, drugi skupini smo dodali hlevski gnoj, tretji enkratno količino mineralnega gnojila in četrti dvakratno količino mineralnega gnojila. Gnojila smo prsti dodali po tem, ko so rastlinice dobile prva prava lista. Želeli smo ugotoviti ali gnojenje vpliva na deleže antioksidantov v cvetovih, zgornjih ter spodnjih listih in plodovih. Zanimalo nas je tudi razmerje v deležih proučevanih antioksidantov med posameznimi deli rastline.

Rezultati so pokazali, da gnojenje ne vpliva na delež raziskovanih antioksidantov v cvetovih in plodovih, vpliva pa na nižji delež flavonoidov in taninov v zgornjih in spodnjih listih. Delež polifenolov se v listih pri rastlinah gojenih na različnih tleh statistično značilno ne razlikuje. Poleg tega smo ugotovili, da je največji delež vseh proučevanih antioksidantov v cvetovih. Delež le-teh upada od cvetov do zgornjih listov, spodnjih listov in do plodov, kjer jih je najmanj.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B. in Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-31
- Asami D. K., Hong Y-J., Barrett D. M., Mitchell A. E. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1237-1241
- Bavec M. in sodelavci. 2001. Ekološko kmetijstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 16-17 str.
- Cook N., Samman S. 1996. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76
- Dolenc K. 1996. Raziskava polifenolov in rutina v ajdi (*Fagopyrum esculentum* Moench). Diplomaska naloga. Ljubljana, BF; Oddelek za agronomijo, 47 str.
- Galle Toplak K. 2000. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 18, 21-22, 38-39 str.
- Granda U. 2009. Razpad polifenolov v zmesi ajdove moke in vode. Diplomaska naloga. Ljubljana, FKKT; Univerzitetni študijski program Biokemija
- Hagels H., Wagenbreth D., Schilcher S. 1995. Phenolic compounds of buckwheat herb and influence of plant and agricultural factors (*Fagopyrum esculentum* Moench and *Fagopyrum tataricum* Gärtner). *Current Advances in Buckwheat Research*: 801-809
- Haslam E. 1989. Plant polyphenols. Cambridge, Cambridge University Press: 230 str.
- Kaj je ekološko kmetijstvo?. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.
http://www.mkgp.gov.si/si/o_ministrstvu/direktorati/direktorat_za_kmetijstvo/starasektor_za_sonaravno_kmetijstvo/oddelek_za_kmetijstvo_in_okolje/kmetijsko_okoljska_placila/ekolosko_kmetovanje/ekolosko_kmetijstvo_dejstva_in_podatki/1_kaj_je_ekolosko_kmetijstvo/ (20.10.2009)
- Kalinova J., Vrhotova N. 2009. Level of catechin, myricetin, quercetin and isoquercitrin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), changes of their levels during vegetation and their effect on the growth of selected weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2719-2725
- Kalinova J., Triska J., Vrhotova N. 2006. Distribution of vitamin e, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 54, 5330–5335

Kim S.J., Zaidul I. S. M., Suzuki T., Mukasa Y., Hashimoto N., Takigawa S., Noda T., Matsuura-Endo C., Yamauchi H. 2008. Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts. Food Chemistry, 110, 814-820

Knapp M. 2003. Raziskava razporeditve polifenolnih snovi v semenih ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Magistrsko delo. Ljubljana, BF

Kocjan Ačko D. 2006. Proso in ajda. Ekološko kmetovanje v svetu in pri nas. Sestavki v reviji Naša žena v letih 2004- 2008. Ljubljana, D. Kocjan Ačko

Kocjan Ačko D. 2008. Ekološko kmetijstvo v Sloveniji. Ekološko kmetovanje v svetu in pri nas. Sestavki v reviji Naša žena v letih 2004- 2008. Ljubljana, D. Kocjan Ačko

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B. in Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K. 2005. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. Food Chemistry, 98 (2006), 508-512

Kreft I. 1995. Ajda. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 6-48 str.

Kreft S., Štrukelj B., Gaberščik A., Kreft I. 2002. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: Comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. Journal of experimental botany, 53, 1801-1804

Leskošek M. 1993. Gnojenje : za velik in kakovosten pridelek, zaboljšanje rodovitnosti tal, za varovanje narave. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 10-21, 43-50, 118 str.

Luthar Z. 1992. Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). Fagopyrum, 12: 36-42

Luthar Z., Kreft I. 1999. Influence of temperature on tannin content in different ripening phases of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. Fagopyrum, 16, 61-65

Naczki M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054, 95-111

Osvald J., Kogoj-Osvald M. 2005. Vrtnarstvo: splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 590 str.

Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4290-4302

Škrabanja V., Laerke H. N., Kreft I. 2000. Protein-polyphenol interactions and *in vivo* digestibility of buckwheat groat proteins. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 440, 129-131

Toor R. K., Savage G. P., Heeb A. 2006. Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 20-27.

Uredba EU o ekološkem kmetijstvu. Uradni list Evropske unije. 2007. Svet Evropske unije (28. junij 2007). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:189:0001:0023:SL:PDF> (2.10.2009)

Veberič R., Trobec M., Herbinger K., Hofer M., Grill D., Štampar F. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 85, 1687-1694

Winter C. K., Davis S. F. 2006. Organic foods. *Journal of food science*, 71, 9: 117-124

Young J. E., Zhao X., Carey E. E., Welti R., Yang S. S., Wang W. 2005. Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 1136-1142

Zagorc B., Orešnik I., Krznar J., Kutin Slatnar B. 2001. Popis vrtnarstva, Slovenija 2000. Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije

Zajc V. Položaj pridelovalcev zelenjave ob vključitvi Slovenije v Evropsko Unijo. Diplomaska naloga. Ljubljana, EF

Zakon o mineralni gnojilih (ZMinG). 2002. Zbirke državnega zbora RS (12. Junij 2002). http://www2.gov.si/zak/Zak_vel.nsf/0/c12563a400338836c1256bd6003769f6?OpenDocument (2.10.2009)

Zule J., Kozjan G. 2008. Polifenoli v različnih vrstah macesna (*Larix* spp.). Zbornik gozdarstva in lesarstva, 86, 51-58

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Ivanu Kreftu za številne strokovne nasvete, potrpežljivost in pomoč pri diplomskem delu.

Za strokovno usmerjanje, pomoč in prijaznost se zahvaljujem tudi somentorici, doc. dr. Mateji Germ.

Hvala prof. dr. Samu Kreftu za pomoč pri delu v laboratoriju.

Še posebej pa gre zahvala moji družini, kateri tudi posvečam to diplomsko delo.

Hvala sošolcem in vsem, ki ste bili z mano v letih študija.