

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nina ČEPERLIN

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTA FENOLNIH
SPOJIN IZ LISTOV VINSKE TRTE IN ROŽMARINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM
GRAPE LEAVES AND ROSEMARY EXTRACT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Heleno Abramovič in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Lea Pogačnik

Član: doc. dr. Helena Abramovič

Član: doc. dr. Blaž Cigić

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.

Nina Čeperlin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
DK UDK 547.56:577.1:547.9: 634.84+582.929.4(043)=163.6
KG fenolne spojine/ antioksidativna učinkovitost/ vinska trta/ *Vitis vinifera* L./ ekstrakti listov vinske trte/ ekstrakti grozdnih kožic/ ekstrakt rožmarina/ *Rosmarinus officinalis* L.
AV ČEPerlIN, Nina
SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica) / CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST FENOLNIH SPOJIN IZ LISTOV VINSKE TRTE IN ROŽMARINA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 71 str., 13 pregl., 16 sl., 85 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V sklopu diplomske naloge smo določili antioksidativno učinkovitost ekstraktov štirih izbranih sort grozdnih kožic in listov vinske trte ter listov rožmarina. V preiskovanih ekstraktih smo s Folin-Ciocalteu metodo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin. Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo dokazali s štirimi različnimi metodami. Določili smo sposobnost lovljenja radikalov DPPH•, sposobnost redukcije kovinskih ionov, antioksidativno učinkovitost v vodni emulziji linolne kisline in sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala. Pri listih vinske trte se je sorta Vranac izkazala kot najbolj antioksidativno učinkovita, sorta Lasin pa je pokazala najslabšo antioksidativno učinkovitost. Preverili smo tudi vpliv obdobja vegetacije, v katerem so bili zbrani listi preiskovanih sort vinske trte, na antioksidativno učinkovitost ekstraktov. Izkazalo se je, da je antioksidativna učinkovitost ekstraktov odvisna od obdobja vegetacije, v katerem so bili zbrani listi vinske trte. Fenolne spojine v ekstraktu rožmarinovih listov so se izkazale kot najboljše pri lovljenju DPPH• radikala in reduciranju kovinskih ionov, medtem ko so pri lovljenju superoksidnega anionskega radikala pokazale najslabšo antioksidativno učinkovitost. Vsi preiskovani ekstrakti so glede na svoje antioksidativne učinkovitosti primerljivi s komercialnima antioksidantoma: askorbinsko kislino in butiliranim hidroksitoluenom. Fenolne spojine v ekstraktih listov vinske trte sort Vranac in Maraština so pokazale boljšo sposobnost redukcije kot askorbinska kislina. V emulziji pa so fenolne spojine v preiskovanih ekstraktih pokazale slabšo antioksidativno učinkovitost kot butiliran hidroksitoluen.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDC 547.56:577.1:547.9: 634.84+582.929.4(043)=163.6
CX phenolic compounds/ antioxidant activity/ *Vitis vinifera* L./ wine leaves extracts/
grape skin extracts/ rosemary extract/ *Rosmarinus officinalis* L.
AU ČEPERLIN, Nina
AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor) / CIGIČ, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2011
TI ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE
LEAVES AND ROSEMARY EXTRACT
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 71 p., 13 tab., 16 fig., 85 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the graduation work we determined the antioxidant activity of extracts of four
selected varieties of grape skins and wine leaves and rosemary. The total phenolic
content of our investigated extracts was determined using Folin-Ciocalteu method.
Antioxidant activity of extracts was determined using four different methods. We
investigated the ability of the extracts to scavenge DDPH• radicals, the ability to
reduce metal ions, antioxidant activity in emulsified linoleic acid and the ability of
the extracts to scavenge superoxide anion radical. In wine leaves, the variety
Vranac proved the most effective antioxidant, variety Lasin showed the weakest
antioxidant activity. We examined the relationship between the vegetation period in
which the wine leaves were collected and the antioxidant activity. We have found
that the antioxidant activity depends on the period of vegetation, in which the *V.*
vinifera leaves were collected. Phenolic compounds in rosemary extract have
proven to be the best at scavenging DPPH• radicals and metal ions reducing power
while in scavenging superoxide anion assay phenolic compounds of rosemary
extract have shown the worst antioxidant activity. All investigated extracts showed
antioxidant activity comparable to commercial antioxidants such as ascorbic acid
and butylated hydroxytoluene. Phenolic compounds in the extracts of grape leaves,
varieties Vranac and Maraština have shown higher reducing power comparing to
ascorbic acid. In emulsion the antioxidant activity of phenolic compounds in the
investigated extracts was poorer than that of butylated hydroxytoluene.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 OKSIDACIJA MAŠČOB	4
2.1.1 Prosti radikali	4
2.1.2 Avtooksidacija	5
2.1.2.1 Produkti avtooksidacije	6
2.1.2.2 Inhibicija avtooksidacije	7
2.2 ANTIOKSIDANTI IN NJIHOV VPLIV	7
2.2.1 Naravni antioksidanti	8
2.3 FENOLNE SPOJINE.....	9
2.3.1 Flavonoidi	9
2.3.2 Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin	11
2.3.3 Mehanizem delovanja primarnih antioksidantov	11
2.4 VINSKA TRTA (<i>Vitis Vinifera</i> L.)	12
2.4.1 Antioksidativne učinkovine vinske trte	14
2.4.2 Polifenolna sestava vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.)	16

2.5	ROŽMARIN (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	17
2.5.1	Antioksidativne učinkovine rožmarina	18
2.6	STRANSKI PROIZVODI IN ODPADKI	19
2.6.1	Stranski proizvodi pri predelavi grozdja in pridelavi vina	20
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	MATERIALI	22
3.1.1	Listi in kožice vinske trte	22
3.1.2	Ekstrakt iz rožmarinovit listov	22
3.1.3	Reagenti	22
3.1.4	Aparature in pribor	23
3.2	METODE	24
3.2.1	Določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo	24
3.2.1.1	Priprava umeritvene krivulje z galno kislino za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo	24
3.2.2	Določitev sposobnosti lovljenja radikala DPPH•	27
3.2.3	Analiza sposobnosti redukcije	27
3.2.4	Beljenje β-karotena	28
3.2.5	Analiza sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala	29
3.3	STATISTIČNA ANALIZA	30
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	31
4.1	DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN S FOLIN-CIOCALTEU METODO	31
4.2	DOLOČITEV SPOSOBNOSTI LOVLJENJA RADIKALA DPPH•	33
4.3	ANALIZA SPOSOBNOSTI REDUKCIJE	42
4.4	BELJENJE β – KAROTENA	46
4.5	ANALIZA SPOSOBNOSTI LOVLJENJA SUPEROKSIDNEGA ANIONA	54

5	SKLEPI	61
6	POVZETEK	62
7	VIRI	64

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mesto delovanja in učinki prostih radikalov v celici (Korošec, 2000).....	5
Preglednica 2: Vrednosti masne koncentracije galne kisline ($\gamma_{g,k}$) v epici in povprečne vrednosti absorbance (A_{765}) za umeritveno krivuljo	25
Preglednica 3: Vrednosti A_{765} in masna koncentracija fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte, grozdnih kožic in ekstraktu rožmarinovitih listov.	32
Preglednica 4: Koncentracije fenolnih spojin za ekstrakte listov vinske trte (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije.	36
Preglednica 5: Koncentracije fenolnih spojin za ekstrakte grozdnih kožic in ekstrakt listov rožmarina (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije	38
Preglednica 6: Nakloni premic (k) in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne koncentracije DPPH• radikala (ED_{50}) v ekstraktih vinskih listov, grozdnih kožic in rožmarinovitih listov.....	40
Preglednica 7: Koncentracije fenolnih spojin za ekstrakte listov vinske trte zbranih v mesecu septembru, ekstrakt rožmarinovitih listov in askorbinske kisline v reakcijski zmesi (γ) ter vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{740}).....	43
Preglednica 8: Sposobnost redukcije ekstraktov listov vinske trte, rožmarinovitih listov in askorbinske kisline, ter primerjava (v deležu) z askorbinsko kislino (AK).	44
Preglednica 9: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{470}) v emulziji in koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) v odvisnosti od časa inkubacije (t) za ekstrakte iz listov vinske trte pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml.....	47
Preglednica 10: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{470}) v emulziji in koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) v odvisnosti od časa inkubacije (t) za ekstrakte grozdnih kožic in BHT pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml	49
Preglednica 11: Koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) po 120 minutah inkubacije in primerjava (v deležu) s komercialnim antioksidantom BHT.	51
Preglednica 12: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{570}) in sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) pri različnih koncentracijah fenolnih spojin (γ) ekstraktov iz listov vinske trte, štirih različnih sort.	55

Preglednica 13: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{570}) in sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) pri različnih koncentracijah fenolnih spojin ekstraktov grozdnih kožic in ekstrakta rožmarinovitih listov (γ)	57
--	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000).....	10
Slika 2: Vinska trta (<i>Vitis Vinifera</i> L.) (Grieve, 2006).....	12
Slika 3: Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) (Winston, 2003).....	17
Slika 4: Umeritvena krivulja z galno kislino.....	25
Slika 5: Delež DPPH•, ki je preostal v reakcijski zmesi v odvisnosti od časa inkubacije za ekstrakt iz listov vinske trte sorte Vranac, ki so bili zbrani v mesecu maju.....	35
Slika 6: Delež DPPH•, ki je preostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakte iz listov vinske trte sorte Vranac. Ekstrakti listov vinske trte sorte Vranac so bili zbrani v mesecu maju (VRA-5), avgustu (VRA-8) in septembru (VRA-9).....	39
Slika 7: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi, ki je potrebna za 50 % znižanje začetne vsebnosti DPPH• radikala za ekstrakte iz listov vinske trte, štirih različnih sort, ki so bili zbrani v mesecu maju, avgustu in septembru.....	41
Slika 8: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi, ki je potrebna za 50 % znižanje začetne vsebnosti DPPH• radikala za ekstrakte iz listov vinske trte, zbranih septembra, grozdnih kožic in rožmarinovitih listov.....	42
Slika 9: Odvisnost absorbance A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakte listov vinske trte sort Lasin (LAS-9) in Merlot (MER-9), ekstrakt listov rožmarina in askorbinske kisline.....	44
Slika 10: Sposobnost redukcije askorbinske kisline in ekstraktov rožmarinovitih listov ter listov vinske trte, zbranih v mesecu septembru.....	45
Slika 11: Koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) v emulziji linolne kisline v vodi v odvisnosti od časa inkubacije za ekstrakte listov vinske trte in grozdnih kožic (oznaka KO) sorte Vranac ter BHT pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml.....	50
Slika 12: Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) po 120 min inkubacije za ekstrakte listov vinske trte v emulziji linolne kisline v vodi pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml.....	52
Slika 13: Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) po 120 min inkubacije za ekstrakte listov vinske trte, zbranih v mesecu septembru in grozdnih kožic ter za BHT v emulziji linolne kisline v vodi pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml.....	53

Slika 14: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakt lista vinske trte in grozdne kože, sorte Vranac ter za ekstrakt rožmarinovih listov.....	58
Slika 15: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za ekstrakte listov vinske trte, štirih različnih sort, pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3,5 mg/l.....	59
Slika 16: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za ekstrakte listov vinske trte, pobranih v mesecu septembru in ekstrakte grozdnih kožic ter za ekstrakt rožmarinovih listov pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3,5 mg/l.....	60

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A• – radikal antioksidanta

AH – antioksidant

AK – askorbinska kislina

BHA – butiliran hidroksianizol

BHT – butiliran hidroksitoluen

C_{AO} – koeficient antioksidativne učinkovitosti

DPPH• – 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil

ED₅₀ – koncentracija fenolnih spojin, ki je odgovorna za 50 % zmanjšanje začetne količine DPPH

FC – reagent Folin-Ciocalteu

GRAS – generally recognized as safe

HO• – hidroksilni radikal

HOO• – hidroperoksilni radikal

LAS-5 – ekstrakt iz listov vinske trte sorte Lasin, ki so bili zbrani v mesecu maju

LAS-8- ekstrakt iz listov vinske trte sorte Lasin, ki so bili zbrani v mesecu avgustu

LAS-9- ekstrakt iz listov vinske trte sorte Lasin, ki so bili zbrani v mesecu septembru

LAS-KO – ekstrakt grozdnih kožic vinske trte sorte Lasin

LDL – lipoprotein majhne gostote

m – masa

MAR-5 – ekstrakt iz listov vinske trte sorte Maraština, ki so bili zbrani v mesecu maju

MAR- 8 - ekstrakt iz listov vinske trte sorte Maraština, ki so bili zbrani v mesecu avgustu

MAR-9 - ekstrak iz listov vinske trte sorte Maraština, ki so bili zbrani v mesecu septembru

MAR-KO – ekstrakt grozdnih kožic vinske trte sorte Maraština

MER-5 – ekstrakt iz listov vinske trte sorte Merlot, ki so bili zbrani v mesecu maju

MER-8 – ekstrakt iz listov vinske trte sorte Merlot, ki so bili zbrani v mesecu avgustu

MER-9 – ekstrakt iz listov vinske trte sorte Merlot, ki so bili zbrani v mesecu septembru

MER-KO – ekstrakt grozdnih kožic vinske sorte Merlot

PG – propil galat

R• – radikal

RH – maščobna kislina

RO• – alkoksilni radikal

ROO• – peroksilni radikal

ROOH– peroksid

SV – slepi vzorec

V – volumen

VRA-5 – ekstrakt iz listov vinske trte sorte Vranac, ki so bili zbrani v mesecu maju

VRA-8 – ekstrakt iz listov vinske trte sorte Vranac, ki so bili zbrani v mesecu avgustu

VRA-9 - ekstrakt iz listov vinske trte sorte Vranac, ki so bili zbrani v mesecu septembru

VRA-KO – ekstrakt grozdnih kožic vinske trte sorte Vranac

VIVOX 70 – ekstrakt iz rožmarinovih listov

γ – masna koncentracija

1 UVOD

Različni prehranski, farmacevtski in kozmetični izdelki vsebujejo maščobe ter so pred in med uporabo izpostavljeni svetlobi, toploti in kisiku. Pod vplivom teh dejavnikov nenasičene maščobne kisline oksidirajo, kar bistveno zmanjša kvaliteto teh izdelkov. Poleg tega predstavljajo nenasičene maščobne kisline pomemben del človeške prehrane, saj so nekatere med njimi esencialne, kar pomeni, da jih človeško telo ne more tvoriti, jih pa nujno potrebuje za normalen razvoj.

V ta namen se dodajajo v izdelke sintetični ali naravni antioksidanti, ki skrbijo za upočasnitev procesa avtooksidacije. Antioksidanti varujejo živilo pred oksidativnim kvarom, ki pomeni zmanjšanje hranilne vrednosti in senzorične kakovosti. Poleg tega ščitijo človeški organizem pred vplivom prostih radikalov in drugimi potencialno škodljivimi oksidirajočimi dejavniki. Zaradi za zdravje neugodnih učinkov nekaterih sintetičnih antioksidantov obstaja veliko zanimanje za pridobivanje in uporabo naravnih antioksidantov iz rastlinskih virov. Naravni antioksidanti predstavljajo vse pomembnejšo alternativo sintetično pridobljenim antioksidantom.

Najpomembnejši naravni antioksidanti so fenolne spojine. Fenolne spojine so sekundarni rastlinski metaboliti. Tako poimenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več –OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč. Fenolni antioksidanti zaustavljajo oksidacijo lipidov, ker imajo sposobnost lovljenja prostih radikalov, doniranja vodikovih atomov ali elektronov, vezave kovinskih ionov in sposobnost inhibicije nekaterih encimov, ki katalizirajo procese oksidacije in hidrolize. V naravi imajo fenolne spojine vlogo zaščite rastline pred napadi virusov, bakterij, gliv in drugimi stresnimi dejavniki. Pomembne so pri rasti in reprodukciji rastlin ter prispevajo k barvi in okusu sadja in zelenjave. Vsebnost antioksidativnih snovi v rastlinah je odvisna od genetskih in ekoloških dejavnikov. V človeški prehrani so fenolne spojine pomembne prav zaradi antioksidativnega delovanja.

Zaradi ozaveščenosti ljudi in poznavanja vpliva prostih radikalov, se odpirajo možnosti uporabe naravnih antioksidantov tudi pri preprečevanju bolezni in njihovem zdravljenju. Za mnoge polifenolne spojine rastlinskega izvora so bila dokazana protivnetna, antikancerogena in antimutagena svojstva, ki preprečujejo karcinogenezo v različnih stadijih razvoja rakavih bolezni. Na tržišču se že pojavlja veliko število nutracevtikov za različne zdravstvene težave, ki vsebujejo spojine kot so npr. antocianini, flavanoni in resveratrol.

Vinska trta (*Vitis vinifera*) se je pojavila na zemlji še pred človekom. Listi vinske trte so priznано ljudsko zdravilo zoper različne težave. V ljudskem zdravilstvu se uporablja tudi mazilo iz listov proti lažjim pojavom ohromelosti v nogah, recimo po lažjem infarktu. Grozdje vsebuje izredno dragocene sestavine, ki imajo pozitiven učinek na zdravje. Flavonoidi listov vinske trte in grozdja predstavljajo glavne naravne antioksidante. Antioksidativno delujoče flavonoidne učinkovine grozdja in listov vinske trte so: katehin, epikatehin, kvercetin in antociani. Poleg teh imajo antioksidativno in antimutageno delovanje tudi neflavonoidni fenoli: kavna in ferulna kislina ter resveratrol.

V grozdju flavonoidi predstavljajo večji del topnih fenolnih snovi. Na vsebnost flavonoidov v listih vinske trte in grozdni kožici vplivajo sorta oziroma genotip, klimatski pogoji, stopnja zrelosti grozdja, lega in obremenitev vinograda, deloma pa tudi rastišče (vsebnost hranljivih snovi v zemlji). V vinski trti so fenolne snovi, predvsem antociani, nakopičeni v listih med zorenjem rastline. Kopičenje antocianov v grozdnih kožicah se začne med zorenjem jagod in je odvisno od klimatskih pogojev, predvsem svetlobe in temperature. V času zorenja grozdja se povečuje vsebnost antocianov in taninov. Zrelo grozdje, predvsem rdečih sort, ima grozdne kožice bogate z lahko izlučljivimi antociani in tanini.

Med predelavo grozdja in pridelavo vina nastaja velika količina odpadkov oz. stranskih produktov (listi, grozdne kožice...). Ker predstavljajo listi vinske trte in grozdje pomemben vir polifenolnih antioksidantov, bi bilo smiselno te ostanke izkoristiti in ponovno uporabiti. Tako bi zmanjšali količino nastalih odpadkov, ki predstavlja okoljevarstveni problem in učinkovito porabili stranski proizvod.

Posebno bogata z naravnimi antioksidanti so zelišča in dišavnice, kot je rožmarin. Rožmarin je že stoletja znan kot začimba, njegovo eterično olje pa dodajajo v različne kozmetične preparate. Tako liste kot eterično olje uporabljajo v tradicionalni medicini, saj pospešuje delovanje in izločanje žolča, poživlja krvni obtok, pomaga ob nizkem krvnem pritisku in zavira razmnoževanje nekaterih vrst bakterij. Razredčeno rožmarinovo eterično olje uporabljajo za masažo proti revmatičnim bolečinam. Rožmarin deluje antioksidativno predvsem zahvaljujoč dvema fenolnima diterpenoma, to sta karnozolna kislina in karnozol.

1.1 NAMEN NALOGE

V okviru diplomske naloge smo želeli določiti antioksidativno učinkovitost ekstraktov fenolnih spojin iz listov štirih sort vinske trte, ki so bili zbrani v treh različnih razvojnih fazah rastline oziroma v treh različnih mesecih t.i. v mesecu maju, avgustu in septembru. Podali smo primerjavo z izbranimi rastlinskimi ekstrakti, kot je rožmarin in kožice grozdnih jagod ter z nekaterimi komercialno dostopnimi antioksidanti.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da bodo ekstrakti vsebovali fenolne spojine.

Pričakujemo razliko v vsebnosti fenolnih spojin in v antioksidativni učinkovitosti med različnimi vinskimi sortami.

Predpostavljamo, da bo antioksidativna učinkovitost in vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu odvisna od obdobja vegetacije.

Predpostavljamo, da bo antioksidativna učinkovitost odvisna od izbrane metode.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDACIJA MAŠČOB

Lipidi predstavljajo pomemben del človeške prehrane, predvsem zaradi njihove visoke energetske vrednosti in vsebnosti esencialnih nenasičenih maščobnih kislin. Lipidi dajejo hrani, zaradi raztopljenih aromatskih komponent tudi prijeten okus. Težava nastopi takrat, ko nenasičene maščobne kisline pod vplivom zunanjih dejavnikov, kot so toplota, svetloba, sevanje in kovinski ioni, reagirajo z atmosferskim kisikom. Ta proces oksidacije nenasičenih maščobnih kislin imenujemo avtooksidacija (Belitz in sod., 2004).

2.1.1 Prosti radikali

Prosti radikali so atomi, ioni, molekule, ki imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron, kar je v večini primerov tudi vzrok za njihovo visoko kemijsko reaktivnost (Koning, 2006). Nastajajo pri cepitvi kovalentne vezi. So rezultat normalne celične presnove (dihanja) in posledica dejavnikov okolja: UV in žarkov gama, toplote, kajenja, onesnaženega okolja itd. Tudi nekatere snovi in zdravila povzročajo nastajanje prostih radikalov. Kisikovi prosti radikali so udeleženi pri številnih normalnih in patoloških procesih v telesu. Pri tem poškodujejo celične strukture, vključno z genskim materialom. Na ta način sodelujejo pri nastanku številnih boleznih, aterosklerozi, zmanjšani imunski odzivnosti, Alzheimerjevi in Parkinsonovi, Chronovi bolezni, pri sladkorni bolezni...itn (Korošec, 2000).

Najpomembnejši prosti radikali so (Korošec, 2000):

- Hidroksilni radikal ($\text{HO}\cdot$)
- Superoksidni anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$)
- Peroksilni radikal ($\text{ROO}\cdot$)
- Radikal dušikovega oksida ($\text{NO}\cdot$)
- Reaktivne zvrsti kisika (ROS)

Najbolj reaktivni in uničujoči so hidroksilni radikali (Laguerre in sod., 2007). Dejstvo, da so prosti radikali zelo reaktivni pomeni, da imajo majhno kemijsko specifičnost in lahko reagirajo z večino molekul v svoji bližini, kar vključuje proteine, lipide, ogljikove hidrate in DNA (Cigić in Tasič, 2006). Pri avtooksidaciji se vključujejo v verižne reakcije in na kaskadni način tvorijo nove proste radikale, razen če jih ne ustavi antioksidant.

Preglednica 1: Mesto delovanja in učinki prostih radikalov v celici (Korošec, 2000)

Mesto	Učinek
Lipidi	Peroksidacija maščobnih kislin, spremenjena prepustnost membran
Proteini	Oksidacija SH- skupin, aktivacija encimov (kolagenaze), inaktivacija encimov (α_1 -antitripsina)
DNK	Cepljenje verige, povečana poraba NADH, motena sinteza ATP

2.1.2 Avtooksidacija

Avtooksidacija je radikalsko inducirana verižna reakcija, razdeljena na iniciacijo (nastanek prostih radikalov), propagacijo in terminacijo (Koning, 2006).

Iniacijo lahko spodbudijo različni fizikalni dejavniki (zvišana temperatura, ionizirajoče sevanje, UV - sevanje) in kemični dejavniki (kovinski ioni, prosti radikali in metaloproteini) (Laguerre in sod., 2007).

Iniacija vključuje homolitsko odcepitev vodikovega atoma iz maščobnokislinske verige, kar prikazuje reakcija 1:



Nastali prosti radikal ($R\cdot$) je zelo nestabilen in ima kratko življensko dobo. Stabilizira se tako, da veže nase vodikov atom iz drugih spojin.

Avtooksidacijo primarno spodbudijo hidroksilni ($OH\cdot$) in hidroperoksilni ($HOO\cdot$) radikali, lahko pa tudi alkoksilni ($RO\cdot$) in peroksilni ($ROO\cdot$) radikali (Laguerre in sod., 2007).

V drugi fazi (propagacija) nastali prosti radikal reagira s tripletnim kisikom in tvori peroksilni radikal ROO• (reakcija 2) :



Peroksilni radikal reagira naprej z naslednjo lipidno molekulo in tako nastane hidroperoksid (reakcija 3):



Reakcija 2 ima izredno nizko aktivacijsko energijo. Hitrost reakcije 2 je višja od hitrosti reakcije 3, zato je količina ROO• radikalov precej večja od količine R• radikalov.

Hidroperoksidi so zelo nestabilni pri temperaturah nad 150°C. Počasi pa razpadajo že pri nižjih temperaturah, posebej če so prisotni sledovi kovinskih ionov, ki katalizirajo njihov razpad (reakcija 4 in 5).



Proces avtooksidacije se zaključi (terminacija), ko radikali reagirajo med seboj in tvorijo neaktivne produkte (reakcije 5, 6 in 7).



2.1.2.1 Produkti avtooksidacije

Primarni produkti avtooksidacije nenasičenih maščobnih kislin so hidroperoksidi, ki pa so brez vonja in okusa, zato ne prizadanejo kvaliteto živila. Vendar pa lahko hidroperoksidi razpadejo na sekundarne produkte, kot so aldehidi, ketoni, alkoholi in karboksilne kisline. Ti sekundarni produkti povzročijo neprijeten vonj in okus maščobe. Pojav imenujemo oksidacijska žarkost. Poleg žarkega okusa pa so zaradi avtooksidacije uničeni tudi vitamini in pigmenti v živilu (Koning, 2006).

2.1.2.2 Inhibicija avtooksidacije

Avtooksidacijo nenasičenih maščobnih kislin lahko upočasnimo na različne načine (Belitz, 2004):

- preprečimo dostop kisika (možnost pakiranja v vakuumsko embalažo, inertni plini, dodatek glukoza oksidaze)
- skladiščenje pri nizki temperaturi in v temnem prostoru
- dodatek antioksidantov
- odstranitev endogenih aktivatorjev oksidacije: ioni kovin (Cu, Fe) in pigmenti (klorofil)

2.2 ANTIOKSIDANTI IN NJIHOV VPLIV

Antioksidant je snov, ki zavira oksidacijo ali reakcije, v katere vstopajo kisik, peroksidi ali prosti radikali. S stroke živilske tehnologije so antioksidanti pomembni, ker podaljšujejo živilom obstojnost ter jih ščitijo pred žarkostjo in pred škodljivimi oksidativnimi spremembami. Antioksidanti so substance, ki v nizkih koncentracijah v substratu signifikantno zavrejo ali preprečijo oksidacijo substrata (Aruoma in sod., 1992).

Po drugi strani antioksidanti ščitijo organizem pred potencialno škodljivimi oksidirajočimi agensi (Cigić in Tasič, 2006). V celici so v normalnih razmerah prosti radikali v stalnem ravnotežju z antioksidanti, ki z različnimi mehanizmi radikale sproti odstranjujejo. Kadar se ravnotežje poruši, kar imenujemo oksidativni stres, pride do poškodb celičnih struktur, ki so najpogostejši vzrok za staranje, degenerativne bolezni, rak (Korošec, 2000).

Antioksidant mora v živilstvu zagotoviti naslednjim pogojem (Schuler, 1990):

- učinkovitost pri nizkih koncentracijah
- biti morajo brez vonja, okusa in barve
- kompatibilnost s substratom
- netoksičnost

Glede na način delovanja ločimo tri skupine antioksidantov:

- PRIMARNI ANTIOKSIDANTI reagirajo s prostimi radikali in jih spremenijo v stabilnejše produkte ter tako preprečijo nadaljno verižno reakcijo avtooksidacije (Schuler, 1990). V to skupino uvrščamo tudi fenolne spojine. V maščobnem sistemu delujejo primarni antioksidanti v fazi iniciacije ali v fazi propagacije. Fenolne spojine delujejo kot primarni antioksidanti, ker se njihov vodikov atom hitro poveže z radikalom.
- SEKUNDARNI ANTIOKSIDANTI so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo, tako da vežejo kovinske ione, zaradi nižjega redoks potenciala se oksidirajo hitreje ter tako vežejo kisik, razgradijo hidroperoksido do stabilnejših produktov ter absorbirajo UV sevanje (Gordon, 1990). Sem sodijo tudi snovi, ki same po sebi nimajo antioksidativnega učinka, vendar pa ga povečujejo. Tako je npr. citronska kislina aktivna s primarnimi antioksidanti in odjemalci kisika (npr. citronska, fumarna, fosforna kislina) (Raspor in sod., 2000).
- TERCIARNI ANTIOKSIDANTI so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice. To so encimi, ki popravljajo poškodbe DNA, npr. metionin sulfoksid reduktaza.

2.2.1 Naravni antioksidanti

Glavna pomanjkljivost sintetičnih antioksidantov, kot so butiliran hidroksianizol (BHA), butiliran hidroksitoluen (BHT) in propil galat (PG) je, da so zdravju škodljivi. V literaturi najdemo veliko študij, ki potrjujejo njihovo toksičnost, zato je v zadnjem času posvečeno veliko pozornosti identifikaciji in vključevanju naravnih antioksidantov v živila. Trenutno so tehnološko najpomembnejši naravni antioksidanti mešanice tokoferolov, askorbinska in citronska kislina ter njune soli in ekstrakti, pridobljeni iz rastlin, kot so rožmarin in žajbelj (Shahidi, 2000).

Prednosti naravnih antioksidantov so torej, da so sprejemljivejši za potrošnika, ki verjame v kakovost naravnega izdelka (Raspor in sod., 2000). Slabost le-teh pa je, da so predragi, če so očiščeni, medtem ko so neočiščeni precej manj aktivni. Poleg tega se funkcionalne lastnosti različnih pripravkov antioksidanta razlikujejo, če ta ni dovolj standardiziran. Pri uporabi lahko tudi spremeni značilno barvo in okus živilskega izdelka. Varnost naravnih antioksidantov je prav tako lahko vprašljiva in običajno ni znana (Madhavi in sod., 1996).

Najbolj razširjena skupina, pri kateri so odkrili antioksidativno delovanje, so spojine fenolnega tipa. Predvsem flavonoidi predstavljajo pomembno skupino naravnih antioksidantov, ki jih najdemo v sadju in zelenjavi.

2.3 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine, imenovane tudi rastlinski fenoli ali polifenolne spojine, so vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več –OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč (Abram, 2000).

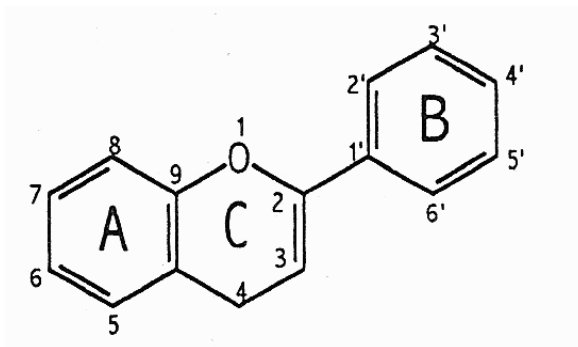
Fenolne kisline so strukturno najpreprostejše fenolne spojine. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti in vse, razen flavonoidov nastajajo iz fenilalanina ali njegovega prekursorja šikimske kisline (Abram in Simčič, 1997).

Te spojine imajo izjemno pomembno fiziološko in morfološko vlogo v rastlinah. V naravi so pomembne pri rasti in reprodukciji rastlin (Bravo, 1998). Pomembne so predvsem za zaščito rastlin pred mehanskim stresom, ki je posledica prisotnih insektov ali mehanskih poškodb, infekcij z glivami, bakterijami in virusi (Goodwin, 1983).

Ekonomsko so rastlinski fenoli pomembni, ker prispevajo k okusu, vonju in barvi živil (Shahidi in sod., 1996).

2.3.1 Flavonoidi

Med dejavniki, ki izboljšajo zdravstveno stanje človeka, velja posebej izpostaviti bioaktivne učinke flavonoidov. Flavonoide uvrščamo med pomembnejšo skupino vodotopnih fenolnih spojin, ki so v rastlinah močno razširjeni. V naravi jih je poznanih več kot 5000. Mnogi od njih so obarvani, običajno so v vakuolah, nekatere najdemo tudi v kromo- ali kloroplastih. Glavna značilnost flavonoidov je gradnik (flavonoidno jedro) iz 15 C-atomov in osnovne strukture $C_6C_3C_6$, ki se imenuje flavan oz. 2-fenilbenzopiran (Hribar in Zlatič, 2006). Osnovno strukturo flavonoidov prikazuje slika 1.



Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000)

Med flavonoide spadajo spojine, ki se ločijo po oksidacijski stopnji heterocikličnega C₃ obroča, kot tudi po različnih substituentah na obročih A, B in C. V naravi so flavonoidi običajno glikolizirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide (glukoza, galaktoza, arabinoza) ali pa tudi daljše verige na C-3, C-5 ali C-7 atom obroča A (Abram, 2000).

Med flavonoide, ki jih ločimo glede na aglikon, ki je ne-sladkorni del molekule spadajo flavoni, flavonoli, katehini, flavanoni, dihidroflavonoli, flava-3,4-dioli, antocianidini, izoflavoni, neoflavoni, kalkoni, dihidrokalkoni, avroni (Abram, 2000).

Najpomembnejši med njimi so brezbarvni katehini, rdečo-vijolično obarvani antocianidini, rumeno obarvani flavonoli in flavoni ter brezbarvni proantocianidini (Gordon, 2003). Vsebnost flavonoidov v sadju in zelenjavi je v veliki meri odvisna od vrste rastline kot tudi od genetskih razlik znotraj same vrste. Poleg genotipa pa seveda vplivajo tudi zunanji dejavniki, zlasti pogoji rasti, letni čas, klimatske razmere, stopnja zrelosti, priprava hrane in predelava (Hribar in Zlatič, 2006).

Epidemiološke raziskave v Evropi, ZDA in na Japonskem navajajo, da je kvercetin v človeški prehrani najbolj pogost flavonoid, saj ga dnevno zaužijejo med 4 in 64 mg (Skibola, 2000). Kvercetinu pripisujejo številne biološke učinke, ki ugodno vplivajo na zdravje človeka; najbolj poznano je antivirusno, protivnetno, antiproliferacijsko in antimikrobno delovanje (Rice-Evans in sod., 1996).

2.3.2 Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin

Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin je posledica njihove sposobnosti lovljenja prostih radikalov, redukcijske sposobnosti in/ali sposobnosti keliranja kovinskih kationov (Rice-Evans in sod., 1997).

Njihov antioksidativni potencial je odvisen od njihove strukture. Polifenoli so učinkovitejši od monofenolov, vendar več kot tri hidroksilne skupine na aromatskem jedru ne izboljšajo antioksidativnega delovanja (Cuvelier in Berset, 1996).

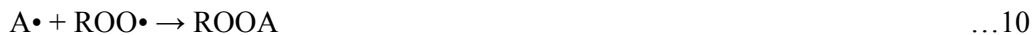
Polifenolne spojine, predvsem flavonoidi, imajo pri preprečevanju oksidacije LDL (lipoproteini majhne gostote) pomembno vlogo, saj lovijo proste radikale, vežejo kovinske ione, ki so potrebni za začetek peroksidacije lipidov ter ščitijo naravni antioksidant α -tokoferol (vitamin E) in karotenoide v delcih LDL pred oksidacijo (Fuhrman in Aviram, 2002).

2.3.3 Mehanizem delovanja primarnih antioksidantov

Fenolni antioksidanti zaustavljajo oksidacijo lipidov, ker se njihov vodikov atom hitro poveže z lipidnim radikalom, kar prikazuje relacija 9 (Fuhrman in Aviram, 2002) (reakcija 8 in 9):



Radikal antioksidanta ($\text{A}\cdot$), ki je dokaj neraktiven, se veže na proste radikale (reakcija 10 in 11). Nov nastal polifenolni radikal $\text{A}\cdot$ je stabiliziran tako, da naprej donira vodikov atom in tako nastajajo kinoni ali pa naprej reagira z drugim lipidnim radikalom ter tako ustavi iniciacijo verižne reakcije (Fuhrman in Aviram, 2002).



Ena molekula antioksidanta lahko torej stabilizira dva prosta radikala. Na ta način se verižna reakcija lahko ustavi oz. upočasni degradacijske reakcije avtooksidacije. (Belitz, 2004).

2.4 VINSKA TRTA (*Vitis Vinifera* L.)

Vinska trta spada v družino *Vitaceae*, ki zajema okoli 600 vrst, med katerimi pa je le nekaj takih, ki jih uporabljamo kot okrasne rastline ali pa se njihov plod uporablja v prehranske namene (Hrček in Korošec-Koruza, 1996). Vinska trta je del velike botanične skupine *Vitis*, ki jo poznamo pod imenom *Vitis Vinifera* L. Vzgoja trte in njeno plemenitenje se je začelo že okrog leta 10.000 pr.n.št., ko je človek iz Bližnjega vzhoda prešel v poljedelsko nastanitveni način preživljanja (Terčelj, 2007).

Listi vinske trte zrastejo na mladikah (enoletni poganjkih) (Vršič, 2001). Na listu razlikujemo listni pecelj in listno ploskev, na njenem začetku se pecelj razčleni v pet glavnih listnih žil. Srednja glavna listna žila poteka do konca listne ploskve in le-to deli na dva dela. List vinske trte je eno-, tri- ali petdelen, kar je odvisno od globine zarez med glavnimi listnatimi žilami. Na spodnji strani je lahko tudi poraščen z dlačicami. Je glavni organ vinske trte, po katerem prepoznamo večino sort (oblika, velikost, dlakavost, razdaljenost listne ploskve, nazobčanost listnega roba, dolžina in barva peclja).



Slika 2: Vinska trta (*Vitis Vinifera* L.) (Grieve, 2006)

Grozd vinske trte je sestavljen iz jagod in pecljevine. Glede na sorte obstajajo precejšnje razlike v velikosti in obliki grozda in barvi jagod. Jagoda, ki je pritrjena na pecljič ima grozdno kožico, meso s sokom in pečke. Barvilo je v kožici, le pri redkih sortah in hibridih je obarvano tudi meso (Vršič, 2001). Grozdna kožica se začne barvati ob začetku zorenja in doseže največjo intenzivnost barve ob polni zrelosti (Šikovec, 1993).

Čas od cvetenja do začetka zorenja je glede na sorto zelo različen. Pri zgodnjih sortah se ta faza hitreje konča, zato grozdje teh sort prej dozori. Dozorela jagoda vsebuje različno količino sladkorja – od 150 do 300 g/L (Šikovec, 1993). Najmanj ga je v celicah mesa, ki ležijo blizu pečk. Manj sladkorja je tudi v celicah tik pod jagodno kožico. Vsebnost skupnih kislin se povečuje proti notranosti jagode (Vršič, 2001). Zrelo grozdje ima širok razpon skupnih kislin – od 5 do 16 g/L glede na sorto, podnebje, letnik, zdravstveno stanje in stopnjo zrelosti (Šikovec, 1993).

Oskrba vinske trte s hranili obsega gnojenje tal in poteka skozi listnato površino. Listi trsov začnejo oddajati metabolite pri velikosti 40 do 45 cm² (pri 30 % končne velikosti lista), vendar lahko še vedno hkrati sprejmejo asimilate do velikosti 70 cm² (50 % končne velikosti). Po cvetenju asimilati pospešeno potujejo v rastoče in dozorevajoče jagode. Proti koncu dozorevanja listje ob grozdju skoraj ne oblikuje več asimilatov, zato jih tudi ne pošilja grozdju (Colnarič, 1991). Fenolne snovi, predvsem antociani, so nakopičeni v listih med zorenjem vinske trte. Kopičenje antocianov v grozdnih kožicah se začne med zorenjem jagod in je odvisno od klimatskih pogojev, predvsem svetlobe in temperature.

Listi vinske trte se zaradi svojih adstringentnih in hemostatičnih lastnosti uporabljajo pri zdravljenju driske, krvavitev in krčnih žil. Sok iz listov vinske trte pa se uporablja tudi kot kopel za oči (Kosar in sod., 2007).

2.4.1 Antioksidativne učinkovine vinske trte

Grozdje in vino predstavljata pomemben vir polifenolnih antioksidantov, ki predstavljajo enostavne fenolne kisline (npr. ester kavne kisline z vinsko kislino) do zelo kompleksnih visoko molekularnih taninov ali proantocianidinov (Rasmussen in sod., 2005). Fenolne snovi imajo pomembno vlogo pri oblikovanju in razvoju organoleptičnih lastnosti rdečega vina. Predvsem vplivajo na barvo, okus in aromo ter stabilnost vina. Fenolne spojine v grozdju in vinu delimo na dve skupini, flavonoidne in neflavonoidne spojine.

Flavonoidni fenoli predstavljajo večji del skupnih fenolov. Nahajajo se v trdih delih grozdja (pečke, jagodna kožica, pecljevina). Flavonoidi vinske trte predstavljajo glavne naravne antioksidante. Med flavonoidi prevladujejo flavonoli (kvercetin, miricitin), ki so nosilci rumeno obarvanih barvil in se nahajajo predvsem v trdih delih grozdja. Antociani, ki so nosilci rdečih in modrih barvil, se nahajajo predvsem v grozdni kožici rdečih sort grozdja (Waterhouse, 2002). Flavanoli (npr. katehini, epikatehini) so brezbarvne snovi, ki so predvsem v pečkih in grozdni kožici.

Med neflavonoide uvrščamo derivate hidroksicimetne kisline (p-kumarna in kavna kislina), derivate hidroksibenzojske kisline (npr. protokatehinska, vanilinska, galna, siriginska, salicilna kislina), hidrolizirane tanine ter stilbene (resveratrol) (Waterhouse, 2002). Hidrolizirani tanini niso prisotni v grozdju, v majhnih količinah se lahko ekstrahirajo pri predelavi iz pecljevine, večje pa iz nepravilno ovinjene hrastove posode (npr. galna in elaična kislina) (Poročilo o stanju tehnološke zrelosti in ocena kvalitete rdečih sort grozdja, 1995).

V okviru epidemioloških raziskav najdemo veliko objav o flavonoidih (zlasti o katehinu in epikatehinu) v povezavi z zaščito pred kardiovaskularnimi boleznimi. Katehin, epikatehin in kvercetin s svojim antioksidativnim delovanjem dokazano učinkovito inhibirajo razmnoževanje celic, ki povzročajo rak dojke (Damianaki in sod., 2000) na osnovi interakcije s steroidnimi receptorji, kar zmanjša toksični vpliv H_2O_2 in tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti. Antociani, ki predstavljajo večji del flavonoidov v grozdju, na različne načine delujejo kot potencialno kemopreventivne spojine pred nastankom različnih vrst rakavih obolenj. To je bilo dokazano tako na živalskih modelih kot v *in vitro* študijah (Cooke in sod., 2005).

Kavna in ferulna kislina, ki sta hidroksicimetni kislini naj bi bili pomembni spojini za zaščito telesa pred karcinogenim delovanjem nitro spojin. Obe spojini reagirata z nitrati *in vitro* in zaustavljata tvorbo nitrozamina *in vivo* (Soleas in sod., 1997).

Med rastlinskimi polifenoli z dobro antioksidativno učinkovitostjo je veliko zanimanje znanstvenikov pritegnil fitoaleksin resveratrol, ki ga proizvaja vinska trta kot

obrambni sistem proti okužbi s plesnijo *Botrytis*. Resveratrolu, ki se nahaja v listih, grozdni kožici in grozdnih pečkih, so bile v številnih raziskavah dokazane antioksidativne in antimutagene lastnosti. Prvič so ga identificirali v grozdu leta 1976 (Langcake in Pryce, 1976). Jang in sod. so prvič poročali o kemopreventivnem delovanju resveratrola leta 1997, kjer so dokazali, da resveratrol deluje preventivno v treh glavnih fazah karcinogeneze.

Koncentracija fenolnih spojin v grozdu je odvisna od sorte vinske trte in fizioloških ter okoljskih dejavnikov. Sinteza flavonoidnih in neflavonoidnih polifenolov, kot so stilbeni, se lahko poveča po poškodbi ali okužbi s patogenimi mikroorganizmi (Hakkinen, 2000; Montealegre in sod., 2006). Zmanjšanje vsebnosti flavonoidov v grozdu in listih vinske trte povzročajo endogeni dejavniki (rastlinski hormoni) in eksogeni dejavniki (vodna aktivnost, temperatura, svetloba...), ki so v pretirani ali omejeni obliki (Braidot, 2008). Poročajo, da so rastlinski hormoni, kot so abscisna kislina, etilen in avksin odgovorni za povečanje vsebnosti flavonoidov, medtem ko giberelinska kislina zavira sintezo flavonoidov (Jeong in sod., 2004). Negativno lahko na biosintezo flavonoidov vpliva mikrobiološka okužba, zlasti z *Botrytis cinerea* (Braidot, 2008). Delgado in sod. (2004) poročajo o tem, da prekomerna gnojila negativno vplivajo na vsebnost flavonoidov. Predvsem dušik in kalij v visokih koncentracijah povzročita povečanje vegetativne rasti, zakasnitev zorenja in zmanjšanje barve grozdnih jagod. Posredno lahko prevelika vsebnost gnojil povzroča bujno rast listov, ki ponavadi ne zagotavlja dobre osvetljenosti listom. Z odstranjevanjem listne mase sicer zmanjšamo površino, na kateri lahko poteka fotosinteza, vendar izboljšamo zračnost vinske trte. Slednje, skupaj s temperaturo, predstavlja enega glavnih okoljskih dejavnikov za biosintezo flavonoidov. Dokazano je, da zmanjšana izpostavljenost sončni svetlobi vpliva na sintezo in znatno zmanjša vsebnost flavonoidov. Bolj kot svetloba pa je za sintezo antocianov pomembna temperatura (Downey in sod., 2004).

Porast fenolnih snovi med zorenjem grozdja se v primerjavi z vsebnostjo sladkorja bistveno razlikuje. Koncentracija polifenolov raste pri nižjih temperaturah, medtem ko so za kopičenje sladkorja ugodnejše višje temperature. Optimalna temperatura za sintezo fenolnih spojin je od 18 do 25 °C. Seveda pa na vsebnost in sintezo fenolnih spojin vpliva tudi sorta, saj pri zgodnjih sortah listi vinske trte septembra še komaj oddajajo asimilate, medtem ko so listi poznih vinskih sort septembra še zelo aktivni (Vršič, 2001). Med našimi preiskovanimi sortami sta Lasin in Merlot srednje pozni sorti, Maraština in Vranac pa pozni sorti.

2.4.2 Polifenolna sestava vinske trte (*Vitis vinifera* L.)

Katalinič in sod. (2010) so v ekstraktih, pridobljenih iz listov vinske trte (*Vitis vinifera* L.) identificirali naslednje fenolne spojine: katehin, epikatehin, apigenin, kamferol (4-hidroksi flavonol), kvercetin (3,4-hidroksi flavonol), miricetin (3,4,5-trihidroksi flavonol), kvercetin-4-glukozid, rutin, cis- in trans-resveratrol in astringin (stilben). Prevladujoč flavonol je bil monomer kvercetin. V drugi raziskavi je Monagas s sodelavci leta 2006 v listih vinske trte identificirala antocianine: antocianidin-3-glukozid, antocianidin-3-(6-acetil) glukozid in antocianidin-3-(6-p-kumaril) glukozid. Flavonoli, identificirani v listih vinske trte so vključevali kvercetin-3-O-galaktozid, kvercetin-3-O-glukuronid in kvercetin-3-O-glukozid, kamferol-3-O-galaktozid, kamferol-3-O-glikozid, kamferol-3-O-glukuronid ter kvercetin. Trans-kaftarna kislina je bila edina hidroksicimetna kislina, ki so jo našli v listih vinske trte. V tej raziskavi so ugotovili, da je antocianidin-3-glukozid najpogostejši pigment, ki se nahaja v listih vinske trte. Vendar se profil antocianov v listih razlikuje od grozdnih kožic. V listih vinske trte je bil peonidin najpogostejši antocianidin, v grozdnih kožicah pa je prevladoval malvidin.

V grozdnih kožicah najdemo glavne tanine: katehin, epikatehin in epikatehin galat, v manjši meri tudi galokatehin in epigalokatehin (Pinelo in sod., 2006). V rdečem grozdju in vinu so našli flavonole: kamferol, kvercetin, miricetin, skupaj z izoramnetinom. V rdečih grozdnih kožicah so našli tudi laricitrin (metoksilirani produkt kvercetina) in siringetin (metoksilirani produkt C-3-miricetina). V belem grozdju pa so našli samo kamferol in kvercetin (Castillo-Munoz in sod., 2007).

Katalinič in sodelavci (2010) so ugotovili, da je povprečna vsebnost monomerov resveratrola v rdečih sortah skoraj trikrat višja v primerjavi s koncentracijo resveratrola v belih sortah.

Stilbeni nastajajo v povrhnjici listov in kožici grozdja, v grozdnem mesu so prisotne samo sledi. V belih sortah so v kožici grozdja v večini prisotni flavanoli, proantocianidi in hidroksicimetne kisline (Montealegre in sod., 2006), medtem ko so v rdečih sortah grozdnih kožic v glavnem prisotni antociani, flavanoli, proantocianidi, flavonoli in hidroksicimetne kisline (Kammerer in sod., 2004).

2.5 ROŽMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)

Rožmarin spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*), ki so eno- ali večletna zelišča, polgrmi ali grmi. Družina, v katero uvrščamo okoli 3500 rastlin je razširjena v vseh podnebnih področjih, še posebno v Sredozemlju in v srednji Aziji. Nekateri najbolj znani predstavniki te družine so: rožmarin, žajbelj, timijan, origano, sivka, poprova meta in melisa. Med omenjenimi rastlinami je rožmarin najpomembnejši vir naravnih antioksidativnih učinkovin.

Rastlina raste uspešno v zmernem klimatskem območju. Raste predvsem na apnenčastih in peščenih tleh pri pH prsti od 4,5 do 8,0. Uspeva pri temperaturah med 9 in 28 °C in ni odporen proti mrazu. Odporen je proti suši, če le ima na razpolago vsaj 20 cm prsti v globino. Med rastjo se lahko pozno pozimi ali zgodaj spomladi razvijejo cvetovi. Kakšnih pomembnih škodljivcev ali obolenj rožmarin nima (Langley, 1995).

Rožmarin je 0,5 do 2 metra visok, močno razvejan trajen grm. Usnjati, od 1 do 3 cm dolgi suličasti listi brez pecljev imajo navznoter zavite robove. Na zgornji strani so temno zeleni, spodaj pa dlakavi in belkasti. Rožmarin cveti z malimi bledomodrimi ali belimi cvetovi, razvrščenimi na zgornjih delih vejic v navideznih vretencih (Nussdorfer, 1991).



Slika 3: Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Winston, 2003)

V komercialne namene se uporabljata tako kultiviran kot divji rožmarin. Največ rožmarinovega eteričnega olja porabi kozmetična industrija. Uporaben je pri kuhi kot začimba za juhe, omake, marinade in pečeno meso. Rožmarinovo eterično olje v majhnih količinah notranje poživlja. Rožmarin pospešuje delovanje in izločanje žolča, poživlja krvni obtok, pomaga ob nizkem krvnem pritisku in zavira razmnoževanje nekaterih vrst bakterij. Rožmarin kot sestavina čajnih mešanic pospešuje skupaj z drugimi drogami izločanje prebavnih sokov, vetrov, žolča, pomaga pa tudi pri izkašljevanju. Razredčeno rožmarinovo eterično olje uporabljajo za masažo proti revmatičnim bolečinam (Nussdorfer, 1991).

2.5.1 Antioksidativne učinkovine rožmarina

Rožmarin vsebuje naslednje sestavine, ki jim pripisujejo antioksidativni učinek (Leung in Foster, 1996):

- eterično olje (posušeni listi vsebujejo med 1,5 in 2,5 % eteričnega olja, katerega glavne sestavine so: cineol (15 -30 %), kafra (ca. 15 %), α -pinen (35 - 40 %), β -pinen, borneol, izobornilacetat, kamfen, p-kumn, geraniol, limonen, linalool, α -terpineol, verbaenon, safrol),
- diterpenski fenoli (karnozolna kislina, isorožmanol, rožmarindial, rožmaridifenol, rožmarinkinon, 7-metoksi rožmanol),
- fenolne kisline (rožmarinska kislina, labiatne grenčine in depsidi kavne kisline),
- flavoni (cirsimaritin, genkvanin, diosmetin, luteolin),
- triterpenske kisline (oleanolne in ursolna kislina, hidroksi oleanolna kislina).

Leta 1964 je Brieskorn s sodelavci iz listov rožmarina in žajblja izoliral fenolni diterpenski lakton karnozol. Pozneje je Wenkert s sodelavci (1965) odkril, da je glavna terpenska komponenta listov rožmarina karnozolna kislina, karnozol pa nastaja z oksidacijo iz karnozolne kisline. Ugotovili so, da sta karnozolna kislina in karnozol izredno učinkovita antioksidanta, saj sta njuni antioksidativni aktivnosti primerljivi z antioksidativno aktivnostjo BHT (Trojáková in sod., 2001). Karnozol in karnozolna kislina bi naj bila pretežno odgovorna za antioksidativno aktivnost rožmarinovega ekstrakta in sta zelo močna inhibitorja peroksidacije lipidov (Aruoma in sod., 1992).

Antioksidativno aktivni so tudi rožmanol, 7-metil-epirožmanol in epirožmanol. Veliko antioksidativno učinkovitost pripisujejo tudi fenolnim kislinam, rožmarinski in kavni kislini (Frankel in sod., 1996; Cuvelier in Berset, 1996).

Rezultati mnogih epidemioloških študij kažejo na zaščitne učinke bioaktivnih snovi rožmarina tako za kardiovaskularna kot rakava obolenja. Dorrie in sod. (2001) poročajo, da je karnozol induciral apoptozo številnih pro-B in pre-B akutnih limfoblastičnih levkemičnih celičnih linij. Podobno Hur in sod. (2004) navajajo, da je v sveže izoliranih človeških krvnih mononuklearnih celicah rožmarinska kislina inducirala apoptozo citotoksičnih T limfocitov in celic ubijalk. V neki drugi raziskavi pa je karnozolna kislina inhibirala proliferacijo človeških mieloidnih levkemičnih celic, ne da bi pri tem povzročala apoptozo ali celično nekrozo (Surh, 2006).

2.6 STRANSKI PROIZVODI IN ODPADKI

V živilski industriji pri predelavi surovin nastajajo številni odpadni produkti oz. stranski proizvodi. Zaradi pomanjkljive biološke stabilnosti, potencialno patogene narave, visoke vsebnosti vode, potencialno velike nevarnosti avtooksidacije in visoke encimske aktivnosti, pa je ponovna uporaba odpadkov, ki so vezani na živilski proizvod zelo težka (Batič in Soršak, 2008). Dejstvo je, da številni odpadki oz. stranski proizvodi v živilski industriji povzročajo obremenitev okolja z resno grožnjo mikrobiološke nevarnosti v okolju, v kolikor za njih ni poskrbljeno. Primeri iz zgodovine kažejo, da neustrezno ravnanje z odpadki iz živilske industrije lahko privede do tragičnih dogodkov, ki se odražijo na zdravju in življenju prebivalstva (Paš in Raspor, 2008).

Živilska industrija išče načine, kako zmanjšati količino odpadkov pri proizvodnji hrane na eni strani in na drugi povečati uporabno vrednost stranskih proizvodov (Schieber in sod., 2001). Stranske proizvode lahko zavržemo kot odpadek, lahko pa jih upoštevamo kot surovine, ki jih velja izkoristiti zaradi njihovih ugodnih tehnoloških lastnosti ali zaradi dobre hranilne vrednosti. Zato je potrebno vpeljati nove ali modificirane metode, ki bodo široko uporabne in ugodne za razširitev uporabe oz. predelave stranskih produktov (Schieber in sod., 2001; Makris in sod., 2007).

Tradicionalne metode za izkoriščanje odpadkov so bile predvsem agronomsko obarvane, saj so vključevale uporabo odpadkov kot krmo za živali, za nastanek komposta ali kot gnojilo. Novejše metode, ki jih uporabljamo pri izkoriščanju sekundarnih surovin iz živilske industrije, pa so lahko (Paš in Raspor, 2008):

- kemijske (ekstrakcija, obarvanje),
- encimske (encimi, kot so peptidaze, α in β -amilaze),
- (mikro)biološke.

Namen omenjenih metod (Paš in Raspor, 2008):

- nastanek izdelka za prehrano živali ali ljudi (gobe, biomasa bakterij, gliv),
- nastanek neprehranskega izdelka, uporabnega kot procesna kemikalija ali aditiv (mikrobni polisaharidi, procesni encimi),
- proizvodnja energije (bioplin, bioetanol),
- ohranitev ali povrnitev čistega okolja (odstranjevanje težkih kovin, pesticidov).

Med predelavo sadja in zelenjave nastajajo odpadni produkti, to so običajno tisti deli rastlin (lupina in semena), v katerih je vsebnost biološko pomembnih spojin najvišja (Schieber in sod., 2001). Zato se stranskim proizvodom predelave rastlinskih živil namenja pozornost kot surovini za pridobivanje visoko vrednih učinkovin, ki bi imele uporabno vrednost GRAS dodatkov v živilskih izdelkih ter pri pripravi funkcionalnih živil in nutracevtikov (Abramovič in sod., 2008).

2.6.1 Stranski proizvodi pri predelavi grozdja in pridelavi vina

V svetovni proizvodnji sadja je daleč na prvem mestu pridelava grozdja s 60 milijoni ton/leto (Košmerl, 2008). Pri pridelavi vina nastaja večja količina trdnih, predvsem organskih odpadkov, kot so grozdne pečke, tropine po predelavi rdečih vinskih sort in pecljevina z listi. Ti odpadki predstavljajo pomemben in nepogrešljiv vir flavonoidov z antioksidativno in protimikrobno učinkovitostjo in ugodnim vplivom na zdravje ljudi (Makris in sod., 2007).

Proantocianidini stranskih produktov grozdja in vina so predmet vedno večjega zanimanja nutricionistov (González-Paramás in sod., 2004). Bioaktivne fenolne spojine imajo možnost uporabe kot antioksidanti v živilih in kot preventivna prehranska dopolnila za preprečevanje rakavih in drugih obolenj.

Visokovredni antioksidanti, ekstrahirani iz pecljevine in listov, kot npr. resveratrol se že uporabljajo v prehranski, kozmetični in farmacevtski industriji. Tropine predstavljajo bogat vir drugih antioksidantov (procianidinov) in barvil (antocianov v rdeči drozgi). Lahko pa predstavljajo surovino za proizvodnjo olja iz grozdnih pečk, ki ima visoko vsebnost nenasičenih maščobnih kislin (Košmerl, 2008). Zelo so zanimive grozdne kožice belih sort vinske trte, ki jih pri pridelavi grozdja v vino ne izkoristijo, saj niso uporabne pri maceraciji in tako predstavljajo lahko dostopen in poceni surov material za produkcijo zanimivih fenolnih spojin ali produktov. Posušene grozdne pečke vsebujejo znatno količino flavanolorov in kažejo značilno antioksidativno aktivnost, kar nenazadnje omogoča njihovo uporabo kot prehransko dopolnilo ali za proizvodnjo fitofarmacevtskih sredstev (González-Paramás in sod., 2004).

Vinarske odpadke uporabljajo tudi za kondicioniranje zemlje, adsorbent ionov težkih kovin in kot gnojilo (Arvanitoyannis in sod., 2006).

Obstaja pa tudi kar nekaj biotehnoloških aplikacij uporabe grozdnih odpadkov. Grozdne kožice uporabljajo kot substrat pri fermentaciji z mikroorganizmom *Aureobasidium pullulan* za proizvodnjo ekstracelularnega polisaharida pululana (Israilides in sod., 1998). Grozdne pečke uporabljajo kot substrat pri fermentaciji za proizvodnjo oksidativnega encima lakaza (Moldes in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Listi in kožice vinske trte

Za analizo smo uporabili metanolne raztopine ekstraktov kožic grozdnih jagod in listov treh rdečih sort vinske trte: Lasin, Merlot in Vranac ter ene bele sorte: Maraština. Listi vinske trte so bili zbrani v treh obdobjih vegetacije: maj, avgust in september. Ekstrakti iz listov vinske trte in kožic grozdnih jagod so bili pripravljene na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Splitu. Diplomsko delo je del širše raziskave, ki je potekala v okviru bilateralnega sodelovanja med Slovenijo in Hrvaško. Ekstrakti so bili pripravljene z uporabo topila - zmes etanol/voda (80/20, v/v). Po odparevanju ekstrakcijskega topila so ekstrakte rekonstituirali v 50 % metanolu (v/v) (Katalinić in sod., 2010).

3.1.2 Ekstrakt iz rožmarinovit listov

Ekstrakt iz rožmarinovit listov s komercialnim imenom Vivox 70 smo pridobili od proizvajalca Vitiva d.o.o., Markovci Slovenija. Med fenolnimi spojinami, ki jih po navedbi proizvajalca vsebuje omenjeni ekstrakt, je 70 % karnozolne kisline (izraženo kot masni delež glede na skupne fenolne spojine v ekstraktu), 3,7 % karnozola in 1,9 % metilkarnozola.

3.1.3 Reagenti

- β -karoten (čistost > 97 %, Fluka, Švica)
- DPPH• reagent (Sigma, Nemčija)
- Etanol (96 %, Merck, Nemčija)
- DPPH• reagent (Sigma, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Švica)
- Kalijev dihidrogenfosfat (V) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)
- Kloroform (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- Linolna kislina (čistost > 95 %, Sigma, Nemčija)
- Metanol (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- Natrijev karbonat (analitske čistosti, Alkaloid, Makedonija)

- Tween 20 detergent (Sigma, Nemčija)
- Kalijev heksacianoferat (III) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)
- Kalij dihidrogenfosfat (Kemika, Hrvaška)
- Triklorocetna kislina (čistost 99,5 %, Merck, Nemčija)
- Železov (III) klorid (čistost > 99 %, Carlo Erba Reagenti, Italija)
- Natrijev hidrogenfosfat (V) (analitske čistosti, Zorka, Šabac, Srbija)
- Dinatrij hidrogenfosfat (Kemika, Hrvaška)
- NBT – Nitroblue tetrazolium tableta (Sigma, Nemčija)
- PMS – fenazinmetasulfat (Sigma, Nemčija)
- NADH (β -nikotinamid adenin dinukleotid, reduced disodium salt (Sigma, Nemčija)

3.1.4 Aparature in pribor

- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija)
- Hladilnik z zmrzovalnikom (Gorenje HZS 2926, Slovenija)
- Mešalnik (IKA[®] MS3 basic, Nemčija)
- Magnetno mešalo (IKA[®] RH basic KT/C, Nemčija)
- Rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica)
- Spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, Združene države Amerike)
- Stresalnik (Tehtnica Vibromix 314 EVT, Slovenija)
- Tehtnica (Mettler Toledo AT201, Švica)
- Ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52, Nemčija)
- Vakuumska centrifuga (GeneVac HT-4 series II, Združene države Amerike)
- Vrtinčnik (Yellowline, TTS2, Slovenija)

3.2 METODE

3.2.1 Določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili s Folin-Ciocalteu metodo, ki sta jo izpopolnila Singleton in Rossi, leta 1965. Sestava Folin-Ciocalteu reagenta ni popolnoma znana, vendar vemo, da vsebuje fosmolibdovski/fosfovolframov kompleks. Metoda temelji na sposobnosti preiskovanih spojin, da povzroči redukcijo molibdena v fosmolibdovski/fosfovolframovem kompleksu. To povzroči modro obarvanje (Magalhaes in sod., 2008), kar zasledujemo spektrofotometrično, tako da izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 765 nm. Večja absorbanca pomeni večjo koncentracijo fenolnih spojin (Abram in sod., 2010).

Postopek:

V epico smo odpipetirali 0,2 ml ustrezno razredčene metanolne raztopine ekstrakta in dodali 0,125 ml Folin-Ciocalteu reagenta (razredčenega z vodo v razmerju 1:1) in vsebino premešali ob uporabi vrtinčnika. Za tem smo dodali 0,125 ml 20 % raztopine natrijevega karbonata in dopolnili z bidestilirano vodo do 1 ml. Ponovno smo vsebino premešali in centrifugirali 10 min pri 13000 obr/min. Po 40 min od dodatka Folin-Ciocalteu reagenta, smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm, A_{765} . Slepí vzorec smo pripravili tako, da smo v epico namesto vzorca odpipetirali metanol. Vsako meritev smo opravili trikrat.

3.2.1.1 Priprava umeritvene krivulje z galno kislino za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo

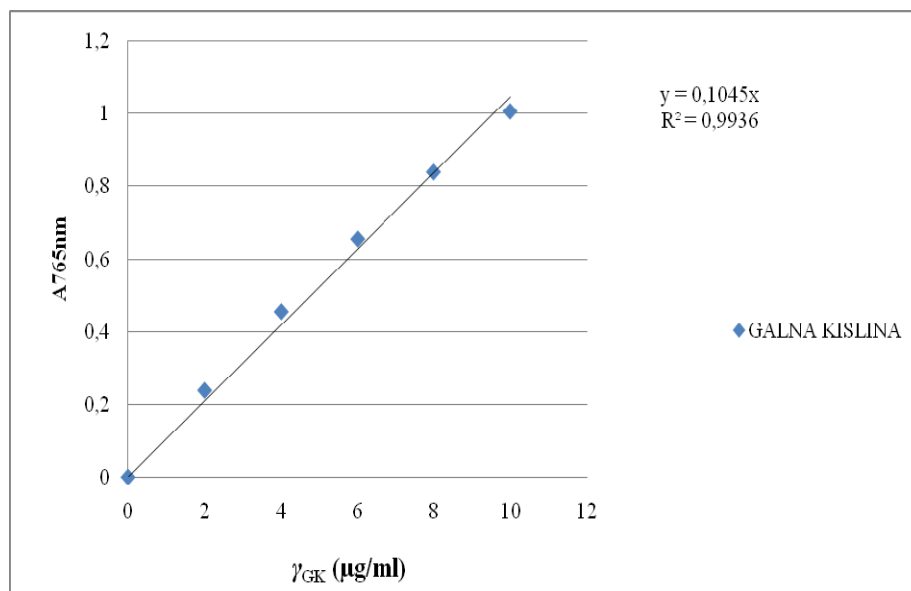
Umeritveno krivuljo pripravimo po zgoraj opisanem postopku z izbrano čisto fenolno spojino. Graf odvisnosti A_{765} za izbrano fenolno spojino od koncentracije te spojine omogoči, da iz izmerjene vrednosti A_{765} za ekstrakt odčitamo vrednost koncentracije skupnih fenolnih spojin v ekstraktu (Naczki in sod., 2004).

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. V 25 ml bučko smo odtehtali 10 mg galne kisline, dopolnili do oznake z bidestilirano vodo in tako pripravili osnovno raztopino galne kisline z masno koncentracijo ($\gamma_{g.k.}$) 400 $\mu\text{g/ml}$. V epice smo odmerili različne volumne osnovne raztopine ter v skladu s Folin-Ciocalteu metodo izmerili absorbanco pri 765 nm. V preglednici 2 so prikazane vrednosti za masno koncentracijo galne kisline v reakcijski mešanici in vrednosti izmerjene absorbance.

Preglednica 2: Vrednosti masne koncentracije galne kisline ($\gamma_{g,k}$) v epici in povprečne vrednosti absorbance (A_{765}) za umeritveno krivuljo

$\gamma_{g,k}$ ($\mu\text{g/ml}$)	A_{765} povp
0	0
2	0,2378
4	0,4551
6	0,6543
8	0,8386
10	1,0057

Iz masne koncentracije in izmerjene absorbance galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 4. Z linearno regresijsko analizo smo izračunali smerni koeficient premice (k). Vrednost k je 0,1045.



Slika 4: Umeritvena krivulja z galno kislino

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v reakcijski zmesi t.j. v epici (γ_{epica}) smo izračunali iz naslednje zveze:

$$\gamma_{epica} = \frac{A_{765}}{k} \quad \dots 12$$

γ_{epica} – masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi ($\mu\text{g/ml}$)

A_{765} – absorbanca pri valovni dolžini 765 nm

k – smerni koeficient premice (umeritvene krivulje)

S pomočjo zveze med masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi in volumnom reakcijske zmesi v epici (V_{epice}) smo izračunali maso fenolnih spojin v epici (m_{epice}):

$$m_{epice} = \gamma_{epica} * V_{epice} \quad \dots 13$$

m_{epice} – masa fenolnih spojin v epici (μg)

γ_{epica} – masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi ($\mu\text{g/ml}$)

V_{epice} – volumen reakcijske zmesi v epici (ml)

Nato smo izračunali še masno koncentracijo fenolnih spojin v izhodni raztopini, to je v raztopini ekstrakta (γ_{izh}):

$$\gamma_{izh} = \frac{\gamma_{epica} * V_{pip}}{V_{epica}} \quad \dots 14$$

γ_{epica} – masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi ($\mu\text{g/ml}$)

γ_{izh} – masna koncentracija izhodne raztopine ekstrakta ($\mu\text{g/ml}$)

V_{pip} – volumen pipetiranja izhodne raztopine ekstrakta v reakcijsko zmes (ml)

3.2.2 Določitev sposobnosti lovljenja radikala DPPH•

Pri analizi smo lovljenje DPPH• radikala spremljali tako, da smo po dodatku ekstrakta k etanolni raztopini DPPH• zasledovali znižanje absorbance pri valovni dolžini 517 nm. Zmanjšanje absorbance raztopine DPPH• je sorazmerno koncentraciji in antioksidativni učinkovitosti antioksidanta.

Postopek:

Sposobnost lovljenja stabilnega prostega radikala DPPH• smo določili po metodi, ki jo je leta 1995 opisal Brand-Williams s sodelavci.

Za pripravo DPPH• reagenta smo v 50 ml bučko odtehtali 1,97 mg 2,2-difenil-2-pikrilhidrazila in ga s 96 % etanolom razredčili do oznake.

V kiveto smo odmerili 2,9 ml raztopine DPPH• reagenta in 0,1 ml raztopine ustrezno razredčenega ekstrakta ter 30 minut v ustreznem časovnem intervalu spremljali absorbanco pri 517 nm, A_{517} . Meritev smo izvedli vsakih 30 sekund. Slepri vzorec je vseboval 96 % etanol. Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca, A_{K517} , kjer smo k 2,9 ml raztopine DPPH• dodali 0,1 ml 96 % etanola.

3.2.3 Analiza sposobnosti redukcije

Pri analizi redukcijske sposobnosti smo določili, v kolikšni meri so preiskovani ekstrakti sposobni reducirati ione Fe^{3+} v ione Fe^{2+} . Vsebnost Fe^{2+} ionov smo določili spektrofotometrično pri valovni dolžini 740 nm.

Postopek:

Najprej smo pripravili vse potrebne reagente. Za pripravo raztopine kalijevega heksocianoferata (III) smo zatehtali 1 g omenjene spojine, prenesli v 100 ml bučko in razredčili z bidestilirano vodo do oznake. Raztopino trikloroocetne kisline smo pripravili tako, da smo zatehtali 20 g omenjene kisline, prenesli v 100 ml bučko in razredčili z bidestilirano vodo do oznake. Prav tako smo zatehtali 0,5 g železovega (III) klorida ($FeCl_3$), prenesli v 50 ml bučko in ga razredčili do oznake. Fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo zatehtali 3,38 g KH_2PO_4 in 3,53 g Na_2HPO_4 , razredčili z bidestilirano vodo v 1000 ml čaši, z NaOH uravnali pH na vrednost 6,8, prenesli vsebino v 1000 ml bučko in dopolnili z vodo do oznake.

V epruveto smo odpipetirali 0,5 ml ustrezno razredčene raztopine ekstrakta in dodali 2,5 ml fosfatnega pufru (pH 6,8), 2,5 ml raztopine kalijevega heksacianoferata (III) in 2,5 ml raztopine trikloroacetne kisline. Vsebino v epruveti smo dobro premešali in centrifugirali 10 minut pri 13000 obr/min. Po centrifugiranju smo odpipetirali 2,5 ml supernatanta v novo epruveto in dodali 2,5 ml bidestilirane vode ter 1 ml raztopine železovega (III) klorida. Zmes smo dobro premešali na vorteksu in po 25 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 740 nm, A_{740} , proti slepemu vzorcu, ki smo mu namesto raztopine ekstrakta dodali metanol. Barva reakcijske zmesi se je spreminjala iz rumene v zeleno-modro. Vsako meritev smo opravili v dveh paralelkah.

3.2.4 Beljenje β -karotena

Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin v preiskovanih ekstraktih, ki tekmujejo z β -karotenom pri reakciji s peroksilnim radikalom, zaznamo kot upočasnen proces razbarvanja β -karotena. Razgradnjo β -karotena smo merili spektrofotometrično pri valovni dolžini 470 nm in jo primerjali z intenzivnostjo razpada β -karotena v kontrolnem vzorcu, kjer ni bilo antioksidanta.

Postopek:

Najprej smo pripravili vse potrebne reagente in emulzijo β -karotena, linolne kisline, tween 20 in vode.

Raztopino β -karotena smo pripravili tako, da smo v bučki z 10 ml kloroforma raztopili 2 mg β -karotena. Emulzijo smo pripravili tako, da smo v bučko odpipetirali 8 ml kloroformne raztopine β -karotena, 160 μ l linolne kisline in 1600 μ l emulgatorja tween 20. Vsebino smo dobro premešali in na rotavaporju pri temperaturi 40 °C odparili kloroform. Preostanku smo počasi dodajali 400 ml bidestilirane vode in vse skupaj stresali približno 5 minut, da smo dobili rumeno-oranžno emulzijo.

Emulzijo smo razporedili v epruvete, in sicer v vsako po 5 ml emulzije, zraven pa dodali tolikšen volumen raztopine posameznega ekstrakta, da smo v emulziji dosegli za vse preiskovane ekstrakte enako koncentracijo fenolnih spojin. Koncentracija fenolnih spojin v emulziji je bila 0,05 mg/ml.

Pripravili smo tudi kontrolni vzorec, ki je namesto raztopine ekstrakta vseboval metanol. Za primerjavo smo poleg kontrolnega vzorca pripravili še emulzijo, ki je vsebovala BHT. Za slepi vzorec smo uporabili emulzijo brez β -karotena.

Potem smo pripravljene vzorce emulzije za 120 minut izpostavili termični avtooksidaciji, tako da smo jih postavili v vodno kopel pri 50 °C. Vsakih 20 minut

smo proti slepemu vzorcu izmerili absorbanco pri valovni dolžini 470 nm za vzorce emulzije, ki so vsebovale preiskovani ekstrakt (A_{VZ470}) in za kontrolni vzorec (A_{K470}). Vsako meritev smo ponovili v dveh paralelkah.

3.2.5 Analiza sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala

Superoksidni anionski radikali se generirajo v PMS-NADH sistemih in povzročijo redukcijo reagenta NBT, katerega reducirano obliko določamo spektrofotometrično pri 570 nm (Roback in Gryglewski, 1988).

Postopek:

Sposobnost lovljenja superoksidnega aniona temelji na metodi, ki sta jo opisala Roback in Gryglewski (1988) z majhnimi modifikacijami.

Reagente, ki smo jih uporabili pri sami metodi, smo pripravili v fosfatnem pufru (pH=7,4). NBT, NADH in PMS reagente smo pripravili vsak dan sveže in jih med izvajanjem analize hranili na ledu.

V epruvete smo odpipetirali 0,5 ml ustrezno razredčenih raztopin ekstraktov, 0,5 ml raztopine NBT (150 μ M) in 0,5 ml NADH reagenta (468 μ M). Reakcija se je začela šele z dodatkom 0,5 ml PMS reagenta (60 μ M). Vsebino smo dobro premešali na vorteksu in po 5 minutah od dodatka PMS izmerili absorbanco pri 560 nm (A_{VZ560}) proti slepemu vzorcu. Za slepi vzorec smo odpipetirali 0,5 ml fosfatnega pufra in vse našteje reagente, razen PMS reagenta. Pripravili smo tudi kontrolni vzorec, tako da smo namesto raztopine ekstrakta dodali 96 % etanol in pomerili absorbanco (A_{K560}). Vse meritve so bile opravljene v dveh paralelkah.

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate meritev smo podali kot povprečne vrednosti vseh meritev znotraj določene metode \pm standardni odklon, ki smo ga izračunali po enačbi 15 (Košmelj, 2001):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad \dots 15$$

SD - standardni odklon

N – število vzorcev

x_i – vrednosti i-te meritve

\bar{x} – povprečna vrednost

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN S FOLIN-CIOCALTEU METODO

Z metodo Folin-Ciocalteu smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin v metanolnih raztopinah ekstraktov iz listov različnih sort vinske trte. Za primerjavo smo uporabili še raztopine ekstraktov grozdnih kožic istih sort vinske trte in ekstrakt rožmarinovih listov Vivox 70.

Metoda Folin-Ciocalteu je preprosta, občutljiva in natančna in se pogosto uporablja za določanje skupnih fenolnih spojin v rastlinskih izvlečkih. Pomanjkljivost te metode pa je, da lahko na analizo rezultata vplivajo tudi druge reducirajoče substance, in sicer ogljikovi hidrati, aminokisliline, organske kisline in drugi reducenti (Prior in sod., 2005).

Temelji na prenosu elektronov iz fenolnih spojin in ostalih reducirajočih snovi na molibden, pri čemer nastane modro obarvan produkt, ki absorbira svetlobo pri 765 nm (Magalhaes in sod., 2008). Izmerjena absorbanca je premosorazmerna s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili s pomočjo umeritvene krivulje z galno kislino (Slika 4) in vsebnost fenolnih spojin izrazili kot ekvivalent galne kisline.

V preglednici 3 so podane vrednosti za A_{765} in vrednosti za masno koncentracijo fenolnih spojin v raztopinah ekstraktov kožic grozdnih jagod in listov štirih sort vinske trte: Lasin, Merlot, Maraština in Vranac, ki smo jih zbrali v treh obdobjih vegetacije, in sicer meseca maja, avgusta in septembra. Masno koncentracijo v raztopinah ekstraktov smo izračunali v skladu z relacijami 12, 13 in 14.

Preglednica 3: Vrednosti A_{765} in masna koncentracija fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte, grozdnih kožic in ekstraktu rožmarinovitih listov. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	A_{765} 1.paralelka	A_{765} 2.paralelka	A_{765} povp.	γ (mg/ml)
VRA-5	0,5117	0,5118	0,5118	24,49
MAR-5	0,3621	0,3620	0,3621	17,32
LAS-5	0,4343	0,4341	0,4342	20,78
VRA-8	0,5608	0,5607	0,5607	26,83
MAR-8	0,4302	0,4302	0,4302	20,59
LAS-8	0,4231	0,4232	0,4231	20,25
MER-8	0,5214	0,5210	0,5212	24,94
VRA-9	0,6349	0,6351	0,6350	30,38
MAR-9	0,5417	0,5415	0,5416	25,91
LAS-9	0,4643	0,4643	0,4643	22,21
MER-9	0,7648	0,7649	0,7649	36,60
VRA-KO	0,6330	0,6329	0,6330	6,06
MAR-KO	0,2873	0,2873	0,2873	1,38
LAS-KO	0,3244	0,3243	0,3243	0,78
MER-KO	0,4832	0,4832	0,4832	2,31
VIVOX 70	0,7036	0,7036	0,7036	0,34

Legenda: **5, 8, 9**: mesec, v katerem so bili zbrani listi vinske trte različnih sort za pridobitev ekstrakta; **KO**: oznaka za ekstrakt iz grozdnih kožic; **VRA**: ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Vranac; **MAR**: ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Maraština; **LAS**: ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Lasin; **MER**: ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Merlot, **VIVOX 70**: ekstrakt, pridobljen iz rožmarinovitih listov

Če primerjamo ekstrakte listov vinske trte v različnih mesecih vegetacije, vidimo, da pri vseh sortah koncentracija skupnih fenolnih spojin opazno naraste z obdobjem vegetacije od meseca maja do septembra. To lahko pripišemo temu, da nenehno oddajanje asimilatov in drugih snovi v grozdnje jagode zahteva različne spremembe v vsebnosti hranil v listih med rastjo trte. Če primerjamo vsebnosti skupnih fenolov med različnimi sortami, vidimo, da med posameznimi sortami obstajajo razlike. Pri vseh sortah pa opazimo, da je največja vsebnost skupnih fenolnih spojin v listih vinske trte ravno v septembru. V tem mesecu je med ekstrakti listov vinske trte največ skupnih fenolov vsebovala vinska sorta Merlot, in sicer kar 36,60 mg/ml, sledila je sorta Vranac s 30,38 mg/ml, bela sorta Maraština je vsebovala 25,91 mg/ml. Najmanj fenolnih spojin je vsebovala sorta Lasin s 22,21 mg/ml.

Med grozdnimi kožicami je največ fenolnih snovi vseboval ekstrakt sorte Vranac (6,06 mg/ml), sledila je sorta Merlot (2,31 mg/ml), sledita, podobno kot pri listih, bela sorta Maraština (1,38 mg/ml) in sorta Lasin, ki je vsebovala najmanj skupnih fenolnih snovi (0,78 mg/ml).

Koncentracijo skupnih fenolnih snovi smo določili tudi v raztopini ekstrakta rožmarinovitih listov Vivox 70, ki smo jo pripravili tako, da smo v 25 ml bučko

zatehtali 25 mg ekstrakta in jo dopolnili s 96 % etanolom. Tako je koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih rožmarinovitih listov znašala 0,34 mg/ml.

Razlike v vsebnosti fenolnih spojin lahko pripišemo tako okoljskim kot fiziološkim dejavnikom. Na sintezo in vsebnost flavonoidov v grozdju vplivajo geografski položaj, zemlja oziroma talni pogoji, vremenske razmere, možnost mikrobiološke okužbe in drugi stresni pogoji ter gnojenje. Na sintezo fenolnih spojin vpliva tudi sorta, saj pri zgodnjih sortah listi vinske trte septembra še komaj oddajajo asimilate, medtem ko so listi poznih vinskih sort septembra še zelo aktivni (Vršič, 2001). Med našimi preiskovanimi sortami sta Lasin in Merlot srednje pozni sorti, Maraština in Vranac pa pozni sorti.

4.2 DOLOČITEV SPOSOBNOSTI LOVLJENJA RADIKALA DPPH•

Z določitvijo sposobnosti lovljenja DPPH• radikala smo želeli preveriti, kako je za ekstrakte listov vinske trte ta sposobnost odvisna od obdobja vegetacije, v katerem so bili listi pobrani. Poleg tega pa smo želeli podati primerjavo v sposobnosti lovljenja DPPH• radikala med ekstrakti listov vinske trte in ekstrakti grozdnih kožic oziroma ekstraktom rožmarinovitih listov.

DPPH metoda je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidacijskega potenciala, ki jo je leta 1958 predstavil Blois (Blois, 1958). Molyneux (2004) je okarakteriziral DPPH• radikal kot stabilen prosti radikal, saj zaradi delokalizacije prostega elektrona molekula ne tvori dimer. Metoda temelji na reakciji med stabilnim radikalom DPPH• (1,1' - difenil-2-pikrilhidrazil) in donorji vodika (npr. fenoli). Pri tem fenolna spojina odda vodikov atom DPPH• radikal in ta preide v obliko difenilpikrilhidrazin (DPPH-H). Tako se v reakcijski zmesi zmanjša količina radikala. Rastopina zato izgublja vijolično barvo in se postopoma spreminja v zeleno do svetlo rumeno barvo. Enačba 16 opisuje reakcijo prenosa vodikovega atoma iz fenolne spojine (AOH) na radikal DPPH•:



Metoda je relativno hitra in preprosta, zato je zelo razširjena in splošno uporabna za določanje antioksidativne učinkovitosti. Pomanjkljivost te metode je, da določene snovi, ki imajo podoben absorpcijski spekter kot DPPH• radikal, motijo analizo in je zato interpretacija rezultatov težavna. Take interference še posebej ustvarjajo karotenoidi in drugi pigmenti (Prior in sod., 2005).

DPPH• radikal nima nobene podobnosti z visoko reaktivnimi peroksilnimi radikali, ki sodelujejo pri lipidni avtooksidaciji. Veliko antioksidantov, ki hitro reagirajo s peroksilnimi radikali, lahko reagirajo z DPPH• radikalom zelo počasi ali pa sploh ne (Prior in sod., 2005).

Analizo sposobnosti lovljenja DPPH• radikala smo izvedli spektrofotometrično pri valovni dolžini 517 nm, kjer je absorpcijski maksimum radikala. Čim boljši je antioksidant, manjši delež radikala DPPH• preostane v reakcijski zmesi in zato je manjša tudi absorbanca.

Delež DPPH• radikala, ki preostane v reakcijski zmesi, smo izračunali po enačbi 17:

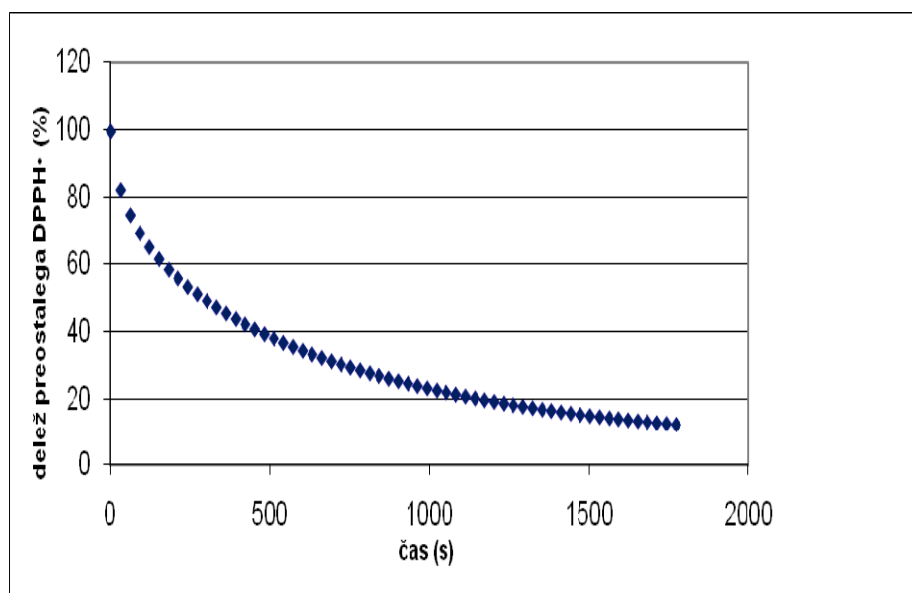
$$\text{delež preostalega DPPH}\bullet = \frac{A_{\text{vz517}}}{A_{\text{k517}}} * 100\% \quad \dots 17$$

kjer je:

A_{vz517} – absorbanca vzorca pri valovni dolžini 517 nm

A_{k517} – absorbanca kontrole pri valovni dolžini 517 nm

Na sliki 5 je prikazana vsebnost preostalega DPPH• v reakcijski zmesi v odvisnosti od časa inkubacije. Vidimo, da se vsebnost DPPH• v reakcijski zmesi zmanjšuje s časom inkubacije. Zmanjševanje količine DPPH• smo na sliki 5 ponazorili na ekstraktu listov vinske trte sorte Vranac, zbranim v mesecu maju (VRA-5) pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 16,32 µg/ml. S sliko 5 smo želeli prikazati kinetiko reakcije in poudariti, da se v začetnem obdobju inkubacije s časom vsebnost DPPH• zmanjšuje v večji meri kot pa kasneje, v nadaljevanju inkubacije.



Slika 5: Delež DPPH•, ki je preostal v reakcijski zmesi v odvisnosti od časa inkubacije za ekstrakt iz listov vinske trte sorte Vranac, ki so bili zbrani v mesecu maju

Koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakte listov vinske trte, pri kateri smo določali A_{517} ter deleži preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije, so podane v preglednici 4. V preglednici 5 so podane iste vrednosti za ekstrakte grozdnih kožic preiskovanih vinskih sort in ekstrakt rožmarinovitih listov Vivox 70. Iz preglednic 4 in 5 vidimo, da so vsi naši preiskovani vzorci pokazali sposobnost za lovljenje prostega radikala DPPH•.

Preglednica 4: Koncentracije fenolnih spojin za ekstrakte listov vinske trte (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	γ ($\mu\text{g/ml}$)	A_{517} po 30min	Delež preostalega DPPH• (%)
VRA-5	1,63	0,909	79,7
	3,26	0,733	64,2
	4,90	0,568	49,8
	8,16	0,360	31,6
	16,32	0,137	12,0
MAR-5	1,15	1,065	89,3
	2,31	0,914	76,7
	4,62	0,730	61,2
	5,77	0,663	55,6
	6,93	0,588	49,3
LAS-5	1,38	0,954	82,7
	2,77	0,777	67,4
	4,15	0,643	55,7
	5,54	0,512	44,4
	6,92	0,420	36,4
VRA-8	1,38	0,973	83,1
	2,77	0,784	66,9
	4,15	0,636	54,3
	5,54	0,531	45,4
	6,92	0,422	36,0
MAR-8	0,67	0,983	86,8
	1,34	0,897	79,2
	2,68	0,766	67,6
	4,01	0,641	56,6
	5,35	0,528	46,6
	6,69	0,459	40,5
LAS-8	1,35	0,927	87,4
	4,05	0,743	70,0
	6,75	0,606	57,2
	8,10	0,530	50,0
	9,45	0,472	44,5
	13,50	0,355	33,5
MER-8	1,66	0,938	83,0
	3,32	0,830	73,4
	4,99	0,678	60,0
	6,65	0,533	47,2
	8,31	0,465	41,1
	9,97	0,401	35,5

...se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Koncentracije fenolnih spojin za ekstrakte listov vinske trte (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	γ ($\mu\text{g/ml}$)	A_{517} po 30min	Delež preostalega DPPH• (%)
VRA-9	1,01	0,920	81,3
	2,03	0,758	67,0
	3,04	0,635	56,1
	4,05	0,489	43,2
	5,06	0,402	35,5
MAR-9	1,73	0,971	83,7
	3,46	0,869	74,9
	5,18	0,737	63,5
	6,91	0,649	55,9
	8,64	0,538	46,4
	10,37	0,500	43,1
LAS-9	0,74	0,963	85,7
	1,48	0,864	76,9
	2,22	0,733	65,3
	2,96	0,641	57,0
	3,70	0,555	49,4
	4,44	0,492	43,8
MER-9	0,49	1,018	91,0
	1,83	0,833	74,5
	3,05	0,738	66,0
	4,27	0,570	51,0
	4,88	0,501	44,8
	6,10	0,448	40,1

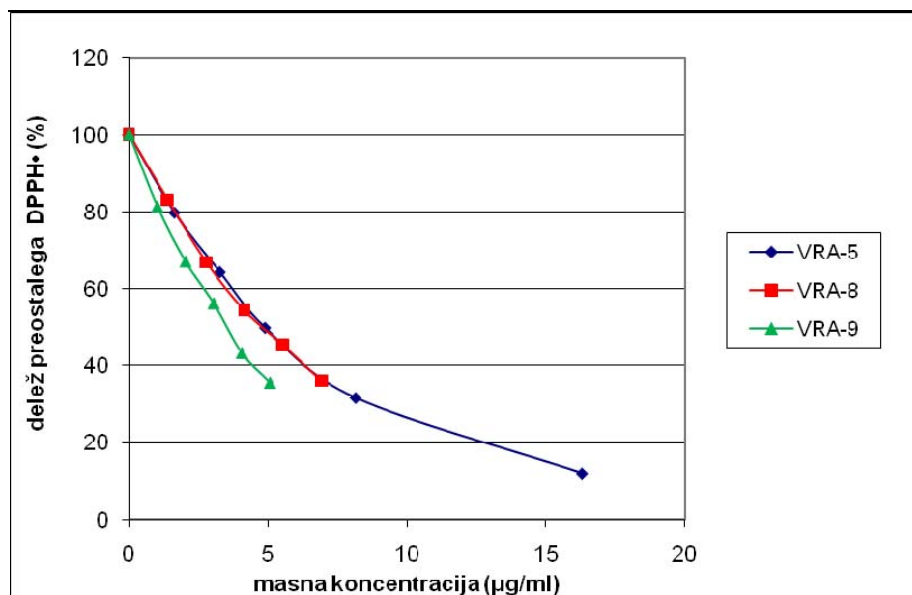
Legenda: **5, 8, 9**: mesec, v katerem so bili zbrani listi vinske trte različnih sort za pridobitev ekstrakta; **VRA**: ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Vranac; **MAR**: ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Maraština; **LAS**: ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Lasin; **MER**: ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Merlot

Preglednica 5: Koncentracije fenolnih spojin za ekstrakte grozdnih kožic in ekstrakt listov rožmarina (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije

Ekstrakt	γ ($\mu\text{g/ml}$)	A_{517} po 30min	Delež preostalega DPPH• (%)
VRA-KO	2,1	0,820	72,4
	3,49	0,664	58,6
	5,24	0,515	45,4
	6,11	0,395	34,8
	6,98	0,392	34,6
	8,73	0,407	35,9
MAR-KO	4,04	0,856	76,3
	7,07	0,737	65,6
	10,1	0,637	56,7
	12,12	0,564	50,3
	14,14	0,480	42,8
LAS-KO	4,47	0,882	76,2
	8,95	0,668	57,7
	11,18	0,564	48,7
	6,71	0,750	64,8
MER-KO	4,66	0,711	63,4
	9,31	0,438	39,1
	6,98	0,588	52,4
	8,15	0,538	48,0
	3,46	0,798	71,1
Vivox 70	1,06	0,846	73,1
	1,59	0,722	62,3
	2,11	0,592	51,1
	3,17	0,228	19,7
	4,23	0,179	15,5

Legenda: **VRA-KO**: ekstrakt, pridobljen iz grozdnih kožic vinske sorte Vranac; **MAR-KO**: ekstrakt, pridobljen iz grozdnih kožic vinske sorte Maraština; **LAS-KO**: ekstrakt, pridobljen iz grozdnih kožic vinske sorte Lasin; **MER-KO**: ekstrakt, pridobljen iz grozdnih kožic vinske sorte Merlot; **VIVOX-70**: ekstrakt, pridobljen iz rožmarinovih listov

Na sliki 6 je na primeru ekstraktov listov vinske sorte Vranac, ki so bili zbrani maja, avgusta in septembra (VRA-5, VRA-8, VRA-9) prikazan delež preostalega radikala DPPH• po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Iz slike je razvidno, da se z višanjem koncentracije fenolnih spojin, delež DPPH• radikala zmanjšuje. To pomeni, da je pri večji vsebnosti fenolnih spojin, »ujetih« več DPPH• radikalov. Iz tega sklepamo, da so fenolne spojine preiskovanih ekstraktov uspešni lovilci DPPH• radikala. Na sliki 6 opazimo, da v določenem koncentracijskem območju delež preostalega radikala DPPH• linearno pada s koncentracijo fenolnih spojin, pri višjih koncentracijah pa omenjena odvisnost ni več linearna.



Slika 6: Delež DPPH•, ki je preostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakte iz listov vinske trte sorte Vranac. Ekstrakti listov vinske trte sorte Vranac so bili zbrani v mesecu maju (VRA-5), avgustu (VRA-8) in septembru (VRA-9)

Sposobnost lovljenja DPPH• radikala smo predstavili kot koncentracijo fenolnih spojin, ki je potrebna za 50 % zmanjšanje začetne koncentracije DPPH• radikala (ED_{50}). To koncentracijo smo izračunali iz naklona oz. smernega koeficienta linearnega dela krivulje, ki podaja koncentracijsko odvisnost deleža preostalega DPPH•. Smerni koeficient smo izračunali s pomočjo linearne regresijske analize z metodo najmanjših kvadratov. Večji kot je naklon premice, nižja je ED_{50} vrednost, s tem pa boljša sposobnost lovljenja DPPH• radikala.

ED_{50} smo izračunali po enačbi 18:

$$ED_{50} = \frac{-50}{k}$$

...18

kjer je:

ED_{50} – koncentracija fenolnih spojin, ki povzroči zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH• radikala za 50 %

k – smerni koeficient linearnega dela krivulje

Vrednosti smernih koeficientov in vrednosti ED_{50} so podane v preglednici 6.

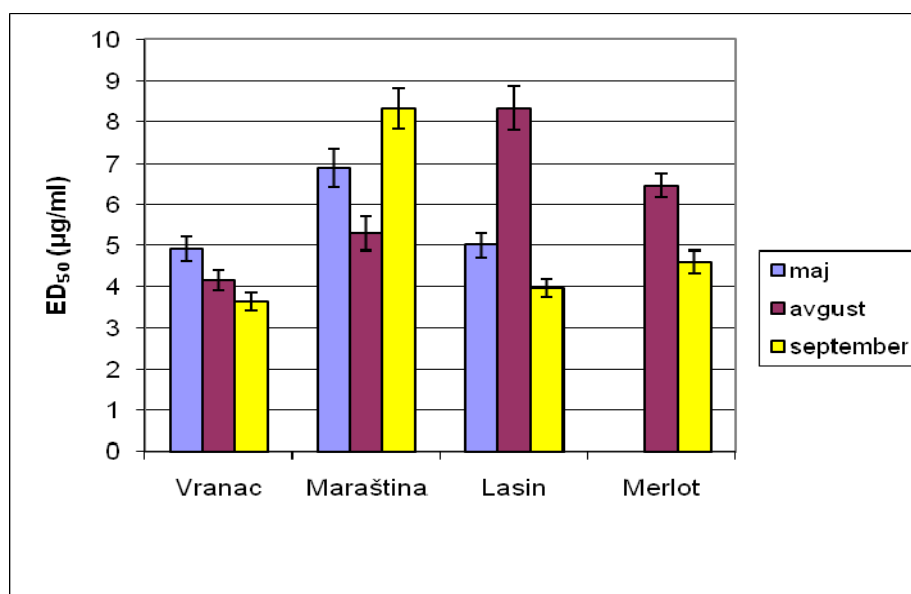
Preglednica 6: Nakloni premic (k) in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne koncentracije DPPH• radikala (ED₅₀) v ekstraktih vinskih listov, grozdnih kožic in rožmarinovih listov. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	k (µg/ml) ⁻¹	ED ₅₀ (µg/ml)
VRA-5	10,2 ± 0,6	4,9 ± 0,3
VRA-8	12,0 ± 0,7	4,2 ± 0,2
VRA-9	13,7 ± 0,8	3,7 ± 0,2
MAR-5	7,3 ± 0,5	6,9 ± 0,5
MAR-8	9,5 ± 0,7	5,3 ± 0,4
MAR-9	6,0 ± 0,4	8,3 ± 0,5
LAS-5	10,0 ± 0,6	5,0 ± 0,3
LAS-8	6,0 ± 0,4	8,3 ± 0,5
LAS-9	12,6 ± 0,7	4,0 ± 0,2
MER-8	7,7 ± 0,3	6,5 ± 0,3
MER-9	10,9 ± 0,6	4,6 ± 0,3
VRA-KO	10,3 ± 0,6	4,9 ± 0,3
MAR-KO	3,9 ± 0,3	13 ± 1
LAS-KO	4,6 ± 0,3	10,9 ± 0,6
MER-KO	6,2 ± 0,5	8,0 ± 0,6
Vivox 70	20 ± 1	2,5 ± 0,2

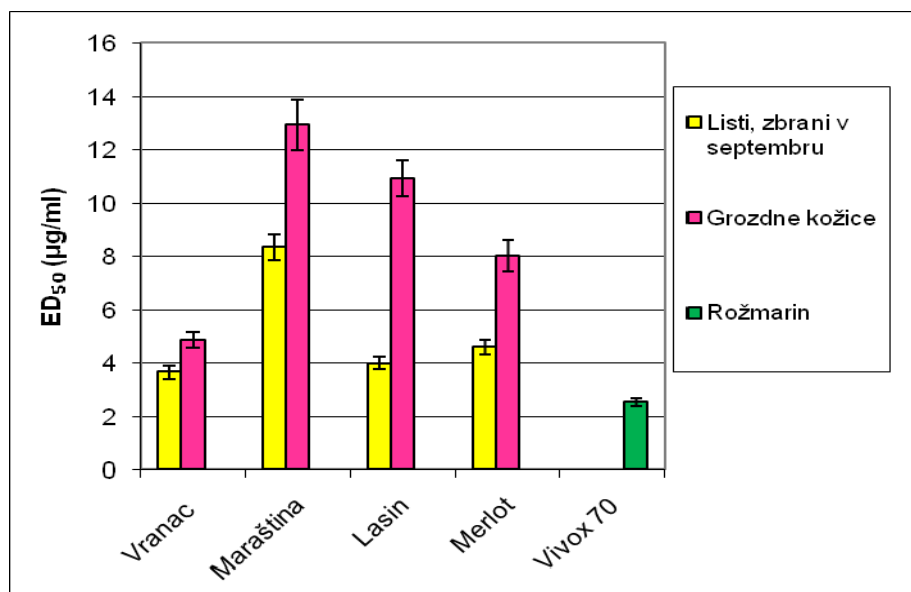
Legenda: **5, 8, 9**: mesec, v katerem so bili zbrani listi vinske trte različnih sort za pridobitev ekstrakta; **KO**: oznaka za ekstrakt iz grozdnih kožic; **VRA**: ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Vranac; **MAR**: ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Maraština; **LAS**: ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Lasin; **MER**: ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Merlot, **VIVOX 70**: ekstrakt, pridobljen iz rožmarinovih listov

Kot lahko vidimo iz rezultatov v preglednici 6, je najboljšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala pokazal ekstrakt iz rožmarinovih listov (Vivox 70), saj je imel največji naklon premice, s tem pa najnižjo vrednost ED₅₀ ((2,5 ± 0,2) µg/ml). Primerjavo med vrednostmi ED₅₀ za ekstrakte preiskovanih sort listov vinske trte, v različnih mesecih vegetacije, prikazuje slika 7. Na sliki 7 vidimo, da se je le pri vinskih sortah Vranac in Merlot, sposobnost lovljena DPPH• radikala povečevala z obdobjem vegetacije. Podobno sta se preiskovani sorti izkazali pri določanju skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo, kjer je koncentracija fenolnih spojin naraščala z obdobjem vegetacije. Pri sorti Maraština sposobnost lovljenja DPPH• radikala sprva naraste in zatem v mesecu septembru pade. Pri sorti Lasin, obratno, sprva pade ter zatem opazno naraste. Najboljšo sposobnost lovljenja radikala je med listi vinske trte pokazala vinska sorta Vranac v septembru, ko je ED₅₀ dosegla vrednost (3,7 ± 0,2) µg/ml.

Na sliki 8 je grafično prikazana primerjava za ED_{50} vrednosti med ekstrakti listov vinske trte, zbranih v mesecu septembru, grozdnimi kožicami in ekstraktom rožmarinovitih listov Vivox 70. Pri vsaki od preiskovanih sort so ekstrakti grozdnih kožic pokazali slabšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala kot ekstrakti listov vinske trte. Podobno kot pri listih vinske trte, je ekstrakt grozdnih kožic sorte Vranac pokazal najboljšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala. Najslabšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala je pokazal ekstrakt grozdnih kožic bele sorte Maraština. V primerjavi z ekstrakti listov vinske trte in grozdnih kožic se je ekstrakt rožmarinovitih listov izkazal kot najboljši s sposobnostjo lovljenja DPPH• radikala.



Slika 7: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi, ki je potrebna za 50 % znižanje začetne vsebnosti DPPH• radikala za ekstrakte iz listov vinske trte, štirih različnih sort, ki so bili zbrani v mesecu maju, avgustu in septembru



Slika 8: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi, ki je potrebna za 50 % znižanje začetne vsebnosti DPPH• radikala za ekstrakte iz listov vinske trte, zbranih septembra, grozdnih kožic in rožmarinovih listov

4.3 ANALIZA SPOSOBNOSTI REDUKCIJE

Pri tem analiznem postopku smo za ekstrakte iz listov vinske trte, ki smo ji pobrali septembra, preverili vpliv sorte na redukcijsko sposobnost in podali primerjavo med med ekstrakti listov vinske trte in ekstrakti listov rožmarina.

Analiza sposobnosti redukcije določene spojine je pokazatelj njene potencialne antioksidativne učinkovitosti. S to metodo določamo sposobnost antioksidanta prenesti elektron, ki reducira katerokoli spojino, tako kovine kot radikale. Antioksidant deluje kot reducent in na ta način reducira (Fe^{3+}) ione do (Fe^{2+}) ionov. Potek reakcije smo opazili kot spreminjanje barve reakcijske zmesi iz rumene v zeleno-modro. Vsebnost nastalega iona Fe^{2+} smo zasledovali kot povečanje absorbance A_{740} .

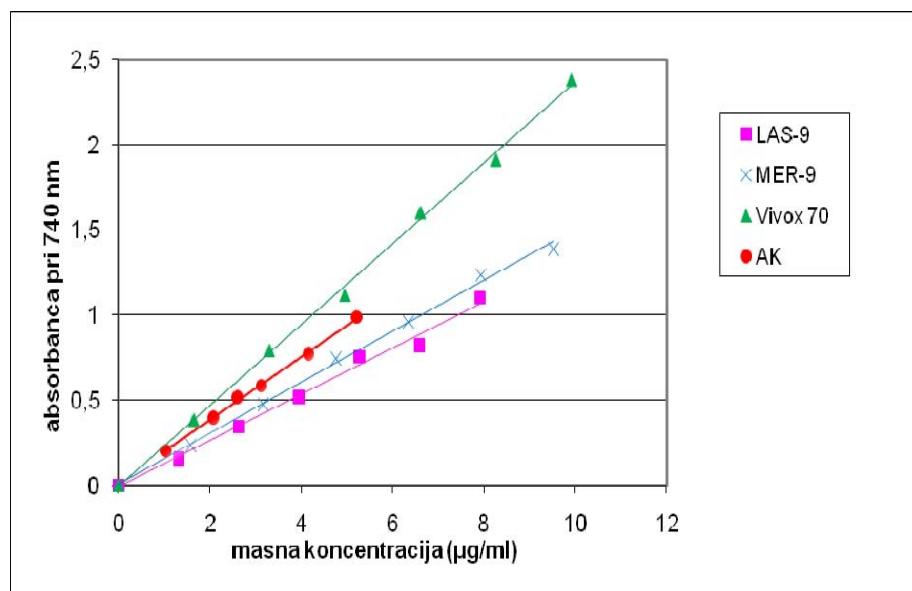
V preglednici 7 so podane izmerjene vrednosti za A_{740} in povprečna vrednost absorbanc pri preiskovanih koncentracijah. Za primerjavo smo opravili analizo tudi za askorbinsko kislino, ki je znana kot dober antioksidant.

Preglednica 7: Koncentracije fenolnih spojin za ekstrakte listov vinske trte zbranih v mesecu septembru, ekstrakt rožmarinovitih listov in askorbinske kisline v reakcijski zmesi (γ) ter vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{740})

Ekstrakt	γ ($\mu\text{g/ml}$)	A_{740} 1.paralelka	A_{740} 2.paralelka	A_{povp}
VRA-9	1,319	0,2741	0,2795	$0,277 \pm 0,003$
	2,637	0,5877	0,6028	$0,595 \pm 0,008$
	3,956	0,8634	0,9099	$0,89 \pm 0,02$
	5,275	1,1348	1,2337	$1,18 \pm 0,05$
	6,593	1,3497	1,3610	$1,355 \pm 0,006$
MAR-9	1,125	0,1872	0,2073	$0,20 \pm 0,01$
	2,249	0,3873	0,4500	$0,42 \pm 0,03$
	3,374	0,6558	0,6597	$0,658 \pm 0,002$
	4,498	0,8965	0,9036	$0,900 \pm 0,004$
	5,623	1,0683	1,2084	$1,138 \pm 0,07$
6,748	1,3528	1,3513	$1,3520 \pm 0,0008$	
LAS-9	1,319	0,1645	0,1489	$0,157 \pm 0,008$
	2,637	0,3581	0,3350	$0,35 \pm 0,01$
	3,956	0,5352	0,5012	$0,52 \pm 0,02$
	5,275	0,7504	0,7577	$0,754 \pm 0,004$
	6,593	0,8518	0,7906	$0,82 \pm 0,03$
7,912	1,1131	1,0875	$1,10 \pm 0,01$	
MER-9	1,588	0,2268	0,2428	$0,235 \pm 0,008$
	3,177	0,4563	0,4942	$0,48 \pm 0,02$
	4,765	0,6937	0,7945	$0,74 \pm 0,05$
	6,353	0,8539	1,0648	$0,96 \pm 0,11$
	7,941	1,1572	1,3101	$1,23 \pm 0,08$
9,530	1,3621	1,4108	$1,39 \pm 0,02$	
Vivox 70	1,652	0,3946	0,3744	$0,38 \pm 0,01$
	3,304	0,7912	0,7925	$0,7918 \pm 0,0007$
	4,955	1,1164	1,1152	$1,1158 \pm 0,0006$
	6,607	1,6023	1,5968	$1,599 \pm 0,003$
AK	1,042	0,1967	0,2092	$0,203 \pm 0,006$
	2,083	0,4124	0,3855	$0,40 \pm 0,01$
	2,604	0,5087	0,5301	$0,52 \pm 0,01$
	3,125	0,5912	0,5820	$0,587 \pm 0,005$
	4,166	0,7602	0,7842	$0,77 \pm 0,01$
5,208	0,9721	1,0041	$0,99 \pm 0,02$	

Legenda: **9**: mesec september, v katerem so bili zbrani listi vinske trte različnih sort za pridobitev ekstrakta; **VRA**: ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Vranac; **MAR**: ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Maraština; **LAS**: ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Lasin; **MER**: ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Merlot; **VIVOX-70**: ekstrakt, pridobljen iz rožmarinovitih listov; **AK**: askorbinska kislina

Na sliki 9 je kot primer za štiri vzorce (LAS-9, MER-9, Vivox 70 in AK) prikazana odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Iz slike 9 je razvidno, da A_{740} linearno narašča s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi.



Slika 9: Odvisnost absorbance A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakte listov vinske trte sort Lasin (LAS-9) in Merlot (MER-9), ekstrakt listov rožmarina in askorbinske kisline. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu septembru (oznaka 9)

Sposobnost redukcije smo kvantitativno ovrednotili kot naklone premic, ki podajajo koncentracijsko odvisnost A_{740} in so za nekaj omenjenih vzorcev prikazani na sliki 9. Naklon premic smo izračunali s pomočjo linearne regresijske analize z metodo najmanjših kvadratov. Večji naklon pomeni večjo sposobnost redukcije. Vrednosti naklonov, oziroma sposobnosti redukcije so za vse preiskovane vzorce, vključno z askorbinsko kislino, podane v preglednici 8.

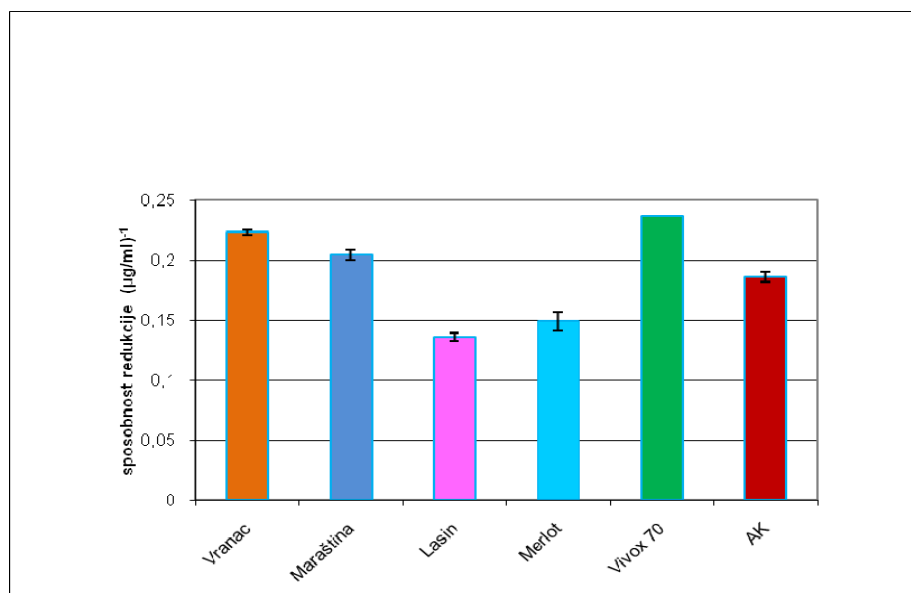
Preglednica 8: Sposobnost redukcije ekstraktov listov vinske trte, rožmarinovitih listov in askorbinske kisline, ter primerjava (v deležu) z askorbinsko kislino (AK). Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	Sposobnost redukcije ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)	Primerjava sposobnosti redukcije v primerjavi z askorbinsko kislino
VRA-9	$0,223 \pm 0,002$	1,19
MAR-9	$0,204 \pm 0,004$	1,08
LAS-9	$0,136 \pm 0,003$	0,76
MER-9	$0,149 \pm 0,008$	0,81
Vivox 70	$0,237 \pm 0,001$	1,28
AK	$0,186 \pm 0,004$	1

Na sliki 10 smo pokazali primerjavo med sposobnostjo redukcije za ekstrakte listov vinske trte, zbranimi v septembru, rožmarinov ekstrakt in askorbinsko kislino (AK). Na sliki 10 opazimo, da je imel ekstrakt rožmarinovitih listov najvišji naklon premice, torej največjo sposobnost redukcije ($0,237 \pm 0,0001 \text{ } (\mu\text{g/ml})^{-1}$). Največjo sposobnost redukcije med preiskovanimi ekstrakti listov vinske trte je pokazala vinska sorta Vranac ($0,223 \pm 0,002 \text{ } (\mu\text{g/ml})^{-1}$), nekoliko nižjo vrednost je dosegla tudi sorta Maraština ($0,204 \pm 0,004 \text{ } (\mu\text{g/ml})^{-1}$), slabšo sposobnost redukcije pa sta pokazali sorti Merlot ($0,149 \pm 0,008 \text{ } (\mu\text{g/ml})^{-1}$) in Lasin ($0,136 \pm 0,003 \text{ } (\mu\text{g/ml})^{-1}$).

Lastnosti posamezne sorte močno vplivajo na oddajanje in sprejem hranil, saj pri zgodnjih sortah listi vinske trte septembra še komaj oddajajo asimilate, medtem ko so listi poznih vinskih sort septembra še zelo aktivni (Vršič, 2001). Med našimi preiskovanimi sortami sta Lasin in Merlot srednje pozni sorti in sta obe pokazali primerljivo sposobnost redukcije. Sorti Maraština in Vranac, ki sta pozni sorti sta pokazali primerljivo in boljšo sposobnost redukcije.

Če liste vinske trte primerjamo z askorbinsko kislino, opazimo, da je le-ta slabši reducent od sort Vranac in Maraština, saj je njena sposobnost redukcije le ($0,186 \pm 0,004 \text{ } (\mu\text{g/ml})^{-1}$). Iz tega lahko sklepamo, da za enak učinek potrebujemo manjšo koncentracijo teh ekstraktov kot askorbinske kisline. V primerjavi z ekstraktom rožmarinovitih listov ($0,237 \pm 0,001 \text{ } (\mu\text{g/ml})^{-1}$) je imela askorbinska kislina prav tako nižjo sposobnost redukcije.



Slika 10: Sposobnost redukcije askorbinske kisline in ekstraktov rožmarinovitih listov ter listov vinske trte, zbranih v mesecu septembru

4.4 BELJENJE β – KAROTENA

Živila so heterogeni sistemi, zato je smiselno določiti antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin tudi v modelnem sistemu emulzije (Abram in sod., 2010). Pri metodi beljenja β -karotena ob zvišani temperaturi inkubiramo emulzijo linolne kisline v vodi v prisotnosti β -karotena in ustreznega emulgatorja. Pri oksidaciji linolne kisline nastane zelo reaktivni peroksilni radikal ($\text{ROO}\cdot$), ki nato reagira z oranžnordečim β -karotenom. Posledica te reakcije je izguba značilne oranžne barve β -karotena (relacija 19).

Razbarvanje β -karotena lahko zmanjšamo z dodatkom fenolnih spojin. Te tekmujejo z β -karotenom v reakciji s peroksilnimi radikali (Prior in sod., 2005). Potek reakcije je prikazan z enačbo 20, kjer fenolna spojina (AOH) odda vodikov atom peroksilnemu radikalu. To vodi v nastanek hidroperoksida (ROOH), fenolna spojina pa preide v obliko stabilnejšega fenoksilnega radikala ($\text{AO}\cdot$) (Abram in sod., 2010).



Razgradnjo oz. razbarvanost β -karotena merimo spektrofotometrično in primerjamo z razbarvanjem β -karotena v slepem vzorcu, kjer ni prisotnih fenolnih spojin. Z metodo beljenja β -karotena smo za različne sorte vinske trte pokazali, kako vpliva obdobje vegetacije, v katerem so bili zbrani listi vinske trte, na antioksidativno učinkovitost njihovih ekstraktov v emulziji ter podali primerjavo z ekstrakti grozdnih kožic.

Čeprav je β -karoten tarčna molekula, ki je izpostavljena peroksilnim radikalom $\text{ROO}\cdot$, pa lahko do razbarvanja pride tudi zaradi drugih razlogov, kar lahko oteži interpretacijo rezultatov (Prior in sod., 2005).

Antioksidativno učinkovitost naših ekstraktov smo izrazili kot koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}), ki smo ga izračunali po enačbi 21:

$$C_{\text{AO}} = \left(1 - \frac{A_{\text{vz470}}^0 - A_{\text{vz470}}^t}{A_{\text{vz470}}^0 - A_{\text{vz470}}^t} \right) * 100 \% \quad \dots 21$$

C_{AO} – koeficient antioksidativne učinkovitosti (%)

A_{vz470}^0 – absorbanca vzorca v času $t = 0$ pri valovni dolžini 470 nm

A_{vz470}^t – absorbanca vzorca pri določenem času pri valovni dolžini 470 nm

A_{k470}^0 – absorbanca kontrole v času $t = 0$ pri valovni dolžini 470 nm

A_{k470}^t - absorbanca kontrole pri določenem času pri valovni dolžini 470 nm

Preglednica 9: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{470}) v emulziji in koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) v odvisnosti od časa inkubacije (t) za ekstrakte iz listov vinske trte pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	t (min)	A_{470} (1.paralelka)	C_{AO} (%) (1.paralelka)	A_{470} (2.paralelka)	C_{AO} (%) (2.paralelka)	C_{AO} (%) \pm SD
VRA-5	0	0,6395	100	0,6432	100	100
	20	0,6341	96,089	0,6437	100,337	98 \pm 2
	40	0,6090	90,477	0,6197	93,650	92 \pm 2
	60	0,5733	85,706	0,5905	89,607	87,7 \pm 2
	80	0,5443	82,822	0,5628	86,065	84 \pm 2
	100	0,5185	79,318	0,5396	82,557	81 \pm 2
	120	0,4888	74,800	0,5150	78,627	77 \pm 2
MAR-5	0	0,6615	100	0,6480	100	100
	20	0,6599	98,812	0,6404	95,467	97 \pm 2
	40	0,6410	93,606	0,6158	91,272	92 \pm 1
	60	0,6288	92,939	0,5914	88,812	91 \pm 2
	80	0,6054	89,872	0,5639	85,411	88 \pm 2
	100	0,5895	87,691	0,5421	82,169	85 \pm 3
	120	0,5666	84,122	0,5116	77,262	81 \pm 3
LAS-5	0	0,6555	100	0,6574	100	100
	20	0,6542	99,086	0,6504	95,792	97 \pm 2
	40	0,6381	94,582	0,6293	92,383	93 \pm 1
	60	0,6203	92,412	0,6066	89,953	91 \pm 1
	80	0,6016	90,283	0,5820	86,916	89 \pm 2
	100	0,5775	86,677	0,5527	82,359	85 \pm 2
	120	0,5623	84,420	0,5331	79,266	82 \pm 3
VRA-8	0	0,6033	100	0,5978	100	100
	20	0,5877	87,889	0,5864	90,757	89 \pm 1
	40	0,5578	83,531	0,5588	84,816	84,2 \pm 0,6
	60	0,5341	82,696	0,5356	83,422	83,1 \pm 0,4
	80	0,5079	80,685	0,5131	82,016	81,4 \pm 0,7
	100	0,4786	76,946	0,4842	78,357	77,7 \pm 0,7
	120	0,4514	72,703	0,4575	74,433	73,6 \pm 0,9
MAR-8	0	0,6291	100	0,6408	100	100
	20	0,6372	105,785	0,6377	98,137	102 \pm 4
	40	0,6064	92,899	0,6163	93,365	93,1 \pm 0,2
	60	0,5734	87,981	0,5904	90,044	89 \pm 1
	80	0,5327	82,606	0,5655	86,929	85 \pm 2
	100	0,5008	78,057	0,5415	83,280	81 \pm 3
	120	0,4681	73,074	0,5201	79,860	77 \pm 3

...se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 9: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{470}) v emulziji in koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) v odvisnosti od časa inkubacije (t) za ekstrakte iz listov vinske trte pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	t(min)	A_{470} (1.paralelka)	C_{AO} (%) (1.paralelka)	A_{470} (2.paralelka)	C_{AO} (%) (2.paralelka)	C_{AO} (%) ± SD
LAS-8	0	0,6521	100	0,6542	100	100
	20	0,6385	90,196	0,6424	92,991	92 ± 1
	40	0,6129	87,761	0,6161	89,696	88,7 ± 1
	60	0,5891	86,410	0,5899	87,302	86,9 ± 0,4
	80	0,5575	82,945	0,5605	83,741	83,3 ± 0,4
	100	0,5329	79,629	0,5374	80,331	80 ± 0,4
	120	0,5066	75,666	0,5121	76,306	76 ± 0,3
MER-8	0	0,6473	100,000	0,6415	100,000	100 ± 0
	20	0,5928	60,660	0,5974	73,749	67 ± 7
	40	0,5292	63,131	0,5292	69,616	66 ± 3
	60	0,4741	62,628	0,5015	72,339	67 ± 5
	80	0,4225	59,433	0,4551	67,667	64 ± 4
	100	0,3797	54,263	0,4190	62,531	58 ± 4
	120	0,3505	50,358	0,3904	58,123	54 ± 4
VRA-9	0	0,6073	100	0,6030	100	100
	20	0,5984	93,127	0,5941	92,761	92,9 ± 0,2
	40	0,5836	91,441	0,5781	90,312	90,9 ± 0,6
	60	0,5647	89,364	0,5606	88,700	89,0 ± 0,3
	80	0,5513	88,673	0,5459	87,876	88,3 ± 0,4
	100	0,5326	86,207	0,5294	85,992	86,1 ± 0,1
	120	0,5188	84,109	0,5155	84,057	84,05 ± 0,03
MAR-9	0	0,6075	100	0,6088	100	100
	20	0,5981	92,717	0,5998	92,680	92,70 ± 0,02
	40	0,5469	78,061	0,5828	89,848	84 ± 6
	60	0,5556	87,033	0,5670	88,850	87,9 ± 0,9
	80	0,5371	85,753	0,5503	87,557	86,7 ± 0,9
	100	0,5135	82,624	0,5283	84,657	83,6 ± 1
	120	0,4930	79,434	0,5098	81,951	81 ± 1
LAS-9	0	0,6109	100	0,6015	100	100
	20	0,6032	94,086	0,5850	86,533	90 ± 4
	40	0,5839	90,242	0,5571	82,697	87 ± 4
	60	0,5665	88,919	0,5281	80,434	84,7 ± 4,2
	80	0,5482	87,307	0,5044	79,381	83,3 ± 4,0
	100	0,5293	84,926	0,4797	76,796	81 ± 4
	120	0,5103	81,930	0,4549	73,290	78 ± 4
MER-9	0	0,6080	100	0,6086	100	100
	20	0,5966	91,175	0,5985	91,792	91,5 ± 0,3
	40	0,5795	89,677	0,5771	87,725	88,7 ± 1
	60	0,5620	88,511	0,5573	86,316	87 ± 1
	80	0,5388	85,994	0,5384	85,090	85,5 ± 0,5
	100	0,5140	82,627	0,5139	81,960	82,3 ± 0,3
	120	0,4881	78,450	0,4915	78,661	78,6 ± 0,1

Preglednica 10: Vrednosti izmerjene absorbanca (A_{470}) v emulziji in koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) v odvisnosti od časa inkubacije (t) za ekstrakte grozdnih kožic in BHT pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml

Ekstrakt	t(min)	A_{470} (1.paralelka)	C_{AO} (%) (1.paralelka)	A_{470} (2.paralelka)	C_{AO} (%) (2.paralelka)	C_{AO} (%) \pm SD
VRA-KO	0	0,5667	100,000	0,5613	100,000	100 \pm 0
	20	0,5514	95,176	0,5503	96,589	95,9 \pm 0,7
	40	0,5475	95,766	0,5490	97,303	96,5 \pm 0,8
	60	0,5444	95,397	0,5368	95,003	95,2 \pm 0,2
	80	0,5339	93,271	0,5242	92,485	92,9 \pm 0,4
	100	0,5190	90,280	0,5160	90,865	90,6 \pm 0,3
	120	0,5009	86,604	0,5023	88,099	87,4 \pm 0,7
MAR-KO	0	0,4188	100,000	0,4025	100,000	100 \pm 0
	20	0,4148	97,943	0,4112	104,312	101 \pm 3
	40	0,3876	90,292	0,3898	96,034	93 \pm 3
	60	0,3627	84,348	0,3708	90,914	88 \pm 3
	80	0,3351	77,286	0,3462	84,222	81 \pm 3
	100	0,3042	69,511	0,3257	78,743	74 \pm 5
	120	0,2797	63,590	0,3107	75,194	69 \pm 6
LAS-KO	0	0,5482	100,000	0,5399	100,000	100 \pm 0
	20	0,5163	89,925	0,5079	90,047	89,99 \pm 0,06
	40	0,5127	92,162	0,4836	87,628	90 \pm 2
	60	0,4911	88,196	0,4604	83,741	86 \pm 2
	80	0,4709	84,129	0,4381	79,390	82 \pm 2
	100	0,4556	81,124	0,4198	75,775	78 \pm 3
	120	0,4413	78,223	0,4048	72,746	76 \pm 3
MER-KO	0	0,5507	100,000	0,5659	100,000	100 \pm 0
	20	0,5579	102,289	0,5571	97,263	100 \pm 3
	40	0,5495	99,725	0,5479	96,045	98 \pm 2
	60	0,5361	96,982	0,5312	92,906	95 \pm 2
	80	0,5316	96,087	0,5238	91,223	94 \pm 2
	100	0,6214	114,415	0,5167	90,085	102 \pm 12
	120	0,5178	93,295	0,4970	86,125	90 \pm 4
BHT	0	0,43118	100,000	0,43019	100,000	100 \pm 0
	20	0,42688	98,572	0,42723	98,959	98,8 \pm 0,2
	40	0,42444	98,344	0,42428	98,482	98,4 \pm 0,1
	60	0,41925	97,405	0,41859	97,372	97,4 \pm 0,1
	80	0,41585	96,360	0,41625	96,533	96,5 \pm 0,1
	100	0,39998	92,610	0,40008	92,471	92,5 \pm 0,1
	120	0,39834	92,625	0,39732	92,297	92,5 \pm 0,2

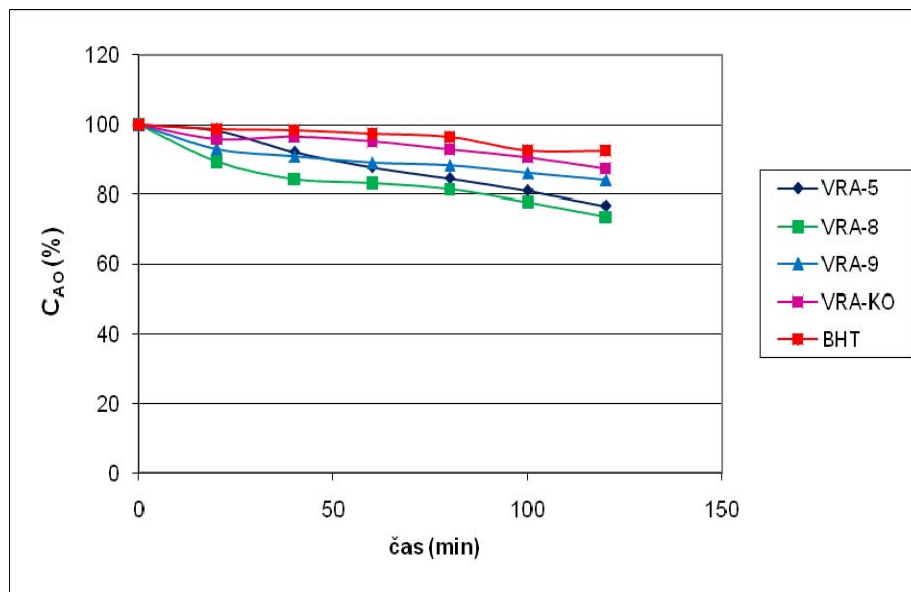
Legenda za preglednico 9 in 10: **5, 8, 9:** mesec, v katerem so bili zbrani listi vinske trte različnih sort za pridobitev ekstrakta; **KO:** oznaka za ekstrakt iz grozdnih kožic; **VRA:** ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Vranac; **MAR:** ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Maraština; **LAS:** ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Lasin; **MER:** ekstrakt, pridobljen iz vinske sorte Merlot; **BHT:** butiliran hidroksitoluen

V preglednici 9 so za ekstrakte listov vinske trte, zbranih v različnih vegetacijskih obdobjih, prikazane vrednosti absorbance (A_{470}) pri različnih časih inkubacije (t) in koeficienti antioksidativne učinkovitosti v emulziji. Koncentracija fenolnih spojin v emulziji je bila 0,05 mg/ml. Vrednosti koeficienta antioksidativne učinkovitosti smo za primerjavo določili tudi komercialnemu antioksidantu BHT.

V preglednici 10 so za ekstrakte grozdnih kožic in komercialni antioksidant BHT prikazane vrednosti absorbance (A_{470}) pri različnih časih inkubacije (t) in koeficienti antioksidativne učinkovitosti v emulziji.

Kot je razvidno iz preglednic 9 in 10, vrednosti C_{AO} s časom padajo, kar kaže, da se antioksidativna učinkovitost preiskovanih ekstraktov in BHT z obdobjem inkubacije niža.

Na sliki 11 je kot primer za 4 izbrane vzorce vinske sorte Vranac (VRA-5, VRA-8, VRA-9, VRA-KO) in antioksidant BHT prikazano, kako vrednosti koeficienta antioksidativne učinkovitosti padajo v odvisnosti od časa. Iz preglednice 11 in iz slike 11 je razvidno, da je antioksidant BHT izkazal najvišjo sposobnost lovljenja peroksilnih radikalov v emulziji in to sposobnost relativno dobro ohranil v celotnem obdobju inkubacije, saj je po 120 min inkubacije vrednost koeficienta antioksidativne učinkovitosti za BHT znašala $(92,5 \pm 0,2) \%$.



Slika 11: Koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) v emulziji linolne kisline v vodi v odvisnosti od časa inkubacije za ekstrakte listov vinske trte in grozdnih kožic (oznaka KO) sorte Vranac ter BHT pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

V preglednici 11 so zbrane vrednosti koeficienta antioksidativne učinkovitosti po 120 minutah inkubacije za vse preiskovane ekstrakte. Poleg tega je podana primerjava C_{AO} ekstraktov (v deležu) s komercialnim antioksidantom BHT.

Preglednica 11: Koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) po 120 minutah inkubacije in primerjava (v deležu) s komercialnim antioksidantom BHT.

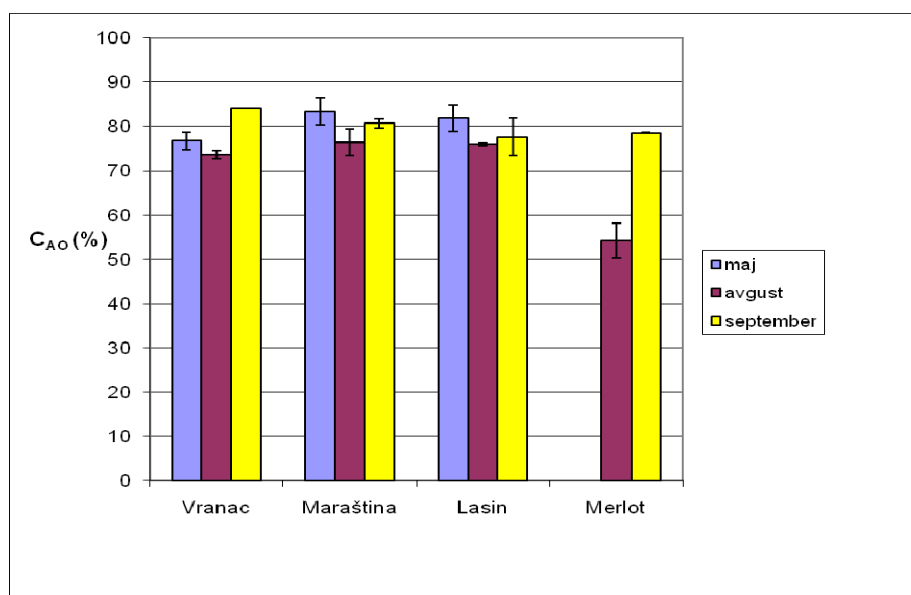
Ekstrakt	C_{AO} (%)	Primerjava antioksidativne učinkovitosti z BHT
VRA-5	77 ± 2	0,83
LAS-5	82 ± 3	0,87
MAR-5	81 ± 3	0,88
VRA-8	$73,6 \pm 0,9$	0,80
MAR-8	77 ± 3	0,83
LAS-8	$76 \pm 0,3$	0,82
MER-8	54 ± 4	0,58
VRA-9	$84,05 \pm 0,03$	0,91
MAR-9	81 ± 1	0,88
LAS-9	78 ± 4	0,84
MER-9	$78,6 \pm 0,1$	0,85
VRA-KO	$87,4 \pm 0,7$	0,94
MAR-KO	69 ± 6	0,75
LAS-KO	76 ± 3	0,82
MER-KO	90 ± 4	0,97
BHT	$92,5 \pm 0,2$	1

Legenda: **5, 8, 9:** mesec, v katerem so bili zbrani listi vinske trte različnih sort za pridobitev ekstrakta; **KO:** oznaka za ekstrakt iz grozdnih kožic; **VRA:** ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Vranac; **MAR:** ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Maraština; **LAS:** ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Lasin; **MER:** ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Merlot; **BHT:** butiliran hidroksitoluen

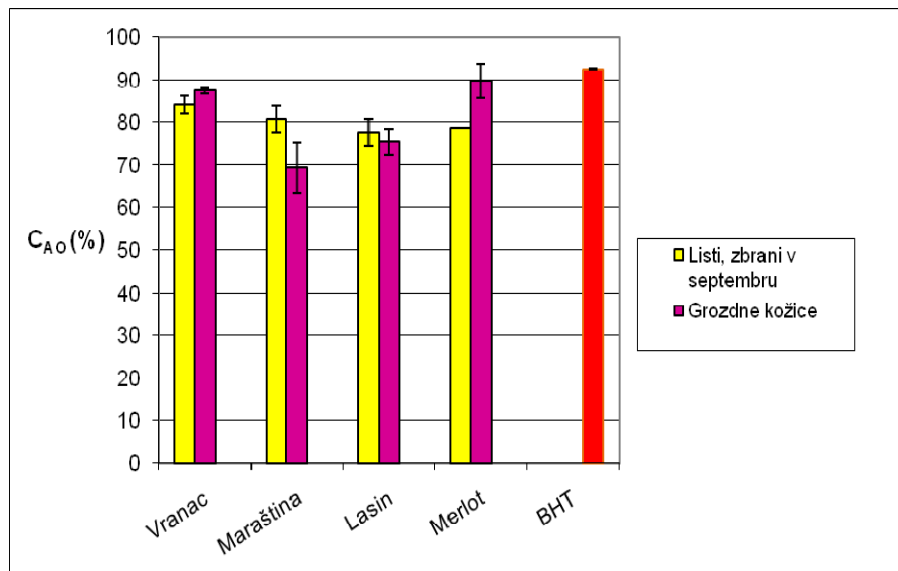
Med preiskovanimi ekstrakti je najvišjo antioksidativno učinkovitost pokazal ekstrakt iz grozdnih kožic sorte Merlot, za katerega je vrednost C_{AO} po 120 min inkubacije znašala 90 %, kar je dobrih 97 % odstotkov vrednosti, ki smo jo določili za BHT. Najnižjo sposobnost lovljenja peroksilnih radikalov po 120 min inkubacije je pokazal ekstrakt iz vinskih listov, zbranih v avgustu, sorte Merlot, za katerega je vrednost C_{AO} znašala 54 %. To predstavlja le slabih 60 % ustrezne vrednosti za BHT.

Na sliki 12 smo med listi vinske trte različnih sort, zbranimi v različnih obdobjih vegetacije, primerjali koeficiente antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) v emulziji po 120 minutah inkubacije. Na sliki 12 opazimo, da se C_{AO} ekstraktov le delno spreminja z obdobjem vegetacije pri sortah Vranac, Maraština in Lasin. Pri sorti Merlot je antioksidativna učinkovitost ekstrakta znatno narasla pri listih vinske trte, zbranih v septembru v primerjavi z antioksidativno učinkovitostjo ekstrakta listov zbranih v avgustu.

Na sliki 13 smo za preiskovane sorte primerjali vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti po 120 minutah inkubacije za ekstrakte listov vinske trte, ki so bili zbrani v septembru z ekstrakti grozdnih kožic in antioksidantom BHT pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml.



Slika 12: Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) po 120 min inkubacije za ekstrakte listov vinske trte v emulziji linolne kisline v vodi pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml. Listi vinske trte, štirih različnih sort, so bili zbrani v mesecu maju, avgustu in septembru



Slika 13: Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}) po 120 min inkubacije za ekstrakte listov vinske trte, zbranih v mesecu septembru in grozdnih kožic ter za BHT v emulziji linolne kisline v vodi pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml

Iz slike 13 je razvidno, da imajo ekstrakti grozdnih kožic pri dveh sortah (Maraština in Lasin) nekoliko slabšo antioksidativno učinkovitost od njihovih listov. Pri sortah Vranac in Merlot pa so ekstrakti grozdnih kožic pokazali nekoliko boljšo antioksidativno učinkovitost kot ekstrakti listov vinske trte. Če primerjamo ekstrakte listov se je kot najboljša sorta izkazala Vranac z 84,05 % antioksidativno učinkovitostjo, najslabša sorta Lasin pa je pokazala 77,6 % antioksidativno učinkovitost. Med ekstrakti grozdnih kožic je pokazal najslabšo antioksidativno učinkovitost ekstrakt bele sorte Maraština. Podobno kot pri sposobnosti redukcije opazimo, da sta ekstrakta listov poznih sort Vranac in Maraština pokazala nekoliko boljšo antioksidativno učinkovitost v emulziji od ekstraktov listov srednje poznih sort Lasin in Merlot. Glede na to, da so preiskovani izvlečki fenolnih spojin iz listov vinske trte pokazali v emulziji β -karotena in linolne kisline sicer nižjo, a vendarle primerljivo antioksidativno sposobnost komercialnemu antioksidantu BHT, lahko sklepamo, da fenolne spojine v ekstraktih reagirajo uspešno s peroksilnim radikalom ter na ta način inhibirajo proces oksidacije linolne kisline emulgirane v vodi.

4.5 ANALIZA SPOSOBNOSTI LOVLJENJA SUPEROKSIDNEGA ANIONA

Superoksidni anionski radikal ($O_2^{\cdot-}$) je eden izmed najbolj reaktivnih kisikovih intermediatov, ki nastajajo v različnih procesih v celici in pod določenimi pogoji lahko proizvajajo proste radikale (Al-Mamun in sod., 2007). Povzroči lahko razne celične poškodbe, inaktivira antioksidativne in mitohondrijske encime, kot so katalaza, mitohondrijska NADH reduktaza, peroksidaza in ATP-aza (Sigler in sod., 1999).

Sposobnost lovljenja superoksidnega aniona temelji na redukciji reagenta NBT, ki z antioksidanti iz naših ekstraktov, tekmuje za superoksidni anionski radikal. Bolj kot je antioksidant učinkovit, več $O_2^{\cdot-}$ radikala bo ujel in manj NBT se bo reduciralo. Reducirano obliko NBT smo zasledovali spektrofotometrično pri 570 nm po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi. Nižja vrednost absorbance pomeni nižjo vsebnost reducirane oblike NBT v reakcijski zmesi. Znižanje absorbance je torej sorazmerno sposobnosti preiskovanega vzorca za lovljenje $O_2^{\cdot-}$ radikala. Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (superoxide anion scavenging activity) smo izrazili kot SASA in izračunali z naslednjo relacijo:

$$SASA = \left(1 - \frac{A_{vz570}}{A_{k570}}\right) * 100 \% \quad \dots 22$$

kjer je:

A_{vz570} – absorbanca vzorca pri valovni dolžini 570 nm

A_{k570} – absorbanca kontrole pri valovni dolžini 570 nm

V preglednici 12 so za ekstrakte listov vinske trte, ki so bili zbrani v različnih vegetacijskih obdobjih, podane vrednosti izmerjenih absorbanc A_{570} in vrednosti SASA pri preiskovanih koncentracijah fenolnih spojin v reakcijski zmesi.

Preglednica 12: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{570}) in sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) pri različnih koncentracijah fenolnih spojin (γ) ekstraktov iz listov vinske trte, štirih različnih sort. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	γ (mg/l)	A_{570} 1.paralelka	SASA (%) 1.paralelka	A_{570} 2.paralelka	SASA (%) 2.paralelka	SASA \pm SD (%)
VRA-5	0	0,2393	0	0,2735	0	0
	1,224	0,1676	30,0	0,1837	32,8	31 \pm 1
	2,449	0,1206	49,6	0,1365	50,1	50 \pm 2
	3,673	0,1038	56,6	0,1178	56,9	57 \pm 2
	4,897	0,1157	51,6	0,1071	55,4	53 \pm 2
	6,122	0,0983	58,9	0,1237	54,8	57 \pm 2
MAR-5	0	0,2095	0	0,2462	0	0
	0,866	0,1644	21,5	0,1838	25,3	23 \pm 2
	1,732	0,1284	38,7	0,1516	38,4	38,6 \pm 0,1
	2,598	0,1061	49,4	0,1193	51,5	50 \pm 1
	3,465	0,0974	53,5	0,1135	53,9	53,7 \pm 0,2
	4,331	0,1046	50,0	0,1117	54,6	52 \pm 2
LAS-5	0	0,3163	0	0,2560	0	0
	1,039	0,2572	18,7	0,1888	26,2	22 \pm 4
	2,078	0,1971	37,7	0,1458	43,1	40 \pm 3
	3,116	0,1676	47,0	0,1186	53,7	50 \pm 3
	4,155	0,1359	57,0	0,0936	57,7	57,4 \pm 0,3
	5,194	0,1215	61,6	0,2214	56,7	59 \pm 2
VRA-8	0	0,2654	0	0,2668	0	0
	1,341	0,1501	43,4	0,1440	46,0	45 \pm 1
	2,683	0,1067	59,8	0,1189	55,4	58 \pm 2
	4,024	0,1015	61,8	0,0951	64,3	63 \pm 1
	5,366	0,0945	64,4	0,0928	65,2	64,8 \pm 0,4
	6,707	0,0899	66,1	0,1001	62,5	64 \pm 2
MAR-8	0	0,2647	0	0,2516	0	0
	1,004	0,1916	21,5	0,1981	21,3	21,4 \pm 0,1
	2,007	0,1751	33,9	0,1651	34,4	34,1 \pm 0,3
	3,011	0,1398	47,2	0,1160	53,9	51 \pm 3
	4,014	0,1272	52,0	0,1072	57,4	55 \pm 3
	5,018	0,1200	54,7	0,1109	55,9	55,3 \pm 0,6
LAS-8	0	0,2652	0	0,2931	0	0
	1,012	0,1553	43,4	0,1932	34,1	39 \pm 5
	2,025	0,1299	59,8	0,1413	51,8	56 \pm 4
	3,037	0,1022	61,8	0,1245	57,5	60 \pm 2
	4,049	0,0904	64,4	0,1171	60,1	62 \pm 2
	5,062	0,0981	66,1	0,1234	57,9	62 \pm 4

...se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 12: Vrednosti izmerjene absorbanca (A_{570}) in sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) pri različnih koncentracijah fenolnih spojin (γ) ekstraktov iz listov vinske trte, štirih različnih sort. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju (oznaka 5), avgustu (oznaka 8) in septembru (oznaka 9)

Ekstrakt	γ (mg/l)	A_{570} 1.paralelka	SASA (%) 1.paralelka	A_{570} 2.paralelka	SASA (%) 2.paralelka	SASA \pm SD (%)
MER-8	0	0,2700	0	0,3278	0	0
	1,247	0,2110	21,9	0,2534	22,7	22,3 \pm 0,4
	2,494	0,1631	39,6	0,2022	38,3	39,0 \pm 0,6
	3,741	0,1179	56,3	0,1766	55,7	56,0 \pm 0,3
	4,987	0,1105	59,1	0,1527	61,7	60 \pm 1
	6,234	0,1118	58,6	0,1359	58,6	58,58 \pm 0,02
VRA-9	0	0,2267	0	0,2198	0	0
	1,519	0,1329	41,4	0,1516	31,0	36 \pm 5
	3,038	0,0968	57,3	0,1029	53,2	55 \pm 2
	4,558	0,0884	61,0	0,0869	58,7	60 \pm 1
	6,077	0,0842	62,8	0,0828	62,3	62,6 \pm 0,2
	7,596	0,0737	67,5	0,0789	64,1	66 \pm 2
MAR-9	0	0,2431	0	0,2349	0	0
	0,648	0,1888	22,3	0,1699	27,7	25 \pm 3
	1,296	0,1402	42,3	0,1289	45,1	44 \pm 1
	2,591	0,1067	56,1	0,1004	57,3	56,7 \pm 0,6
	3,887	0,0991	59,2	0,0887	62,2	61 \pm 2
LAS-9	0	0,2624	0	0,3007	0	0
	5,183	0,0947	61,0	0,0911	61,2	61,1 \pm 0,1
	0,555	0,2445	6,8	0,2582	14,2	10 \pm 4
	1,111	0,1742	33,6	0,1917	22,0	28 \pm 6
	2,221	0,1323	49,6	0,1495	45,4	47 \pm 2
	3,332	0,1164	55,6	0,1365	54,6	55,1 \pm 0,5
	4,443	0,1414	53,0	0,1335	51,2	52,1 \pm 0,9
MER-9	0	0,2604	0	0,2580	0	0
	0,915	0,1754	32,6	0,1663	35,6	34 \pm 1
	1,830	0,1355	48,0	0,1299	49,7	48,8 \pm 0,9
	3,660	0,1047	59,8	0,1023	60,4	60,1 \pm 0,3
	5,489	0,0878	66,3	0,0818	68,3	67 \pm 1
	7,319	0,0866	66,7	0,0825	68,0	67,4 \pm 0,6

Legenda: **5, 8, 9:** mesec, v katerem so bili zbrani listi vinske trte različnih sort za pridobitev ekstrakta; **VRA:** ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Vranac; **MAR:** ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Maraština; **LAS:** ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Lasin; **MER:** ekstrakt, pridobljen iz listov vinske sorte Merlot

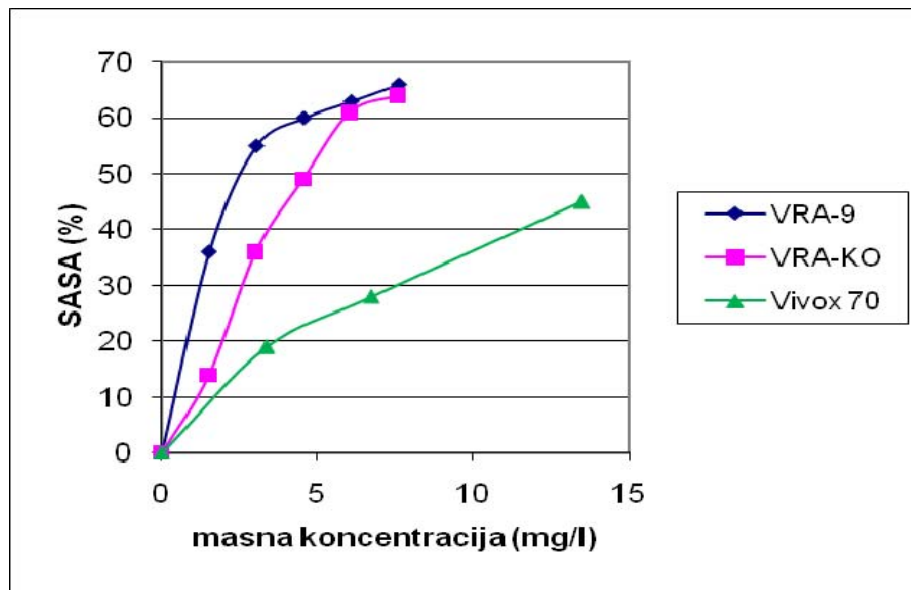
Preglednica 13 prikazuje za ekstrakte grozdnih kožic in rožmarinovih listov vrednosti izmerjenih absorbanc A_{570} in vrednosti SASA pri preiskovanih koncentracijah fenolnih spojin v reakcijski zmesi.

Preglednica 13: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{570}) in sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) pri različnih koncentracijah fenolnih spojin ekstraktov grozdnih kožic in ekstrakta rožmarinovih listov (γ)

Ekstrakt	γ (mg/l)	A_{570} 1.paralelka	SASA (%) 1.paralelka	A_{570} 2.paralelka	SASA (%) 2.paralelka	SASA \pm SD (%)
VRA-KO	0	0,3844	0	0,3401	0	0
	1,5143	0,3179	17,3	0,3007	11,6	14 \pm 3
	3,0286	0,2326	39,5	0,2324	31,7	36 \pm 4
	4,5429	0,1981	48,5	0,1725	49,3	48,9 \pm 0,4
	6,0572	0,1380	64,1	0,1463	57,0	61 \pm 4
	7,5715	0,1230	68,0	0,1346	60,4	64 \pm 4
MAR-KO	0	0,3599	0	0,4631	0	0
	0,6873	0,3448	4,2	0,4455	3,8	4,0 \pm 0,2
	1,3746	0,3114	4,0	0,4504	2,7	3,4 \pm 0,7
	2,0619	0,3154	12,4	0,3932	15,1	14 \pm 1
	2,7492	0,2998	16,7	0,3963	14,4	16 \pm 1
	3,4365	0,2853	20,7	0,3589	22,5	21,6 \pm 0,9
LAS-KO	0	0,4358	0	0,3952	0	0
	0,7759	0,3768	13,5	0,3311	16,2	15 \pm 1
	1,5518	0,3224	26,0	0,3097	21,7	24 \pm 2
	2,3277	0,3017	30,8	0,2737	30,7	30,748 \pm 0,008
	3,1036	0,2825	35,2	0,2656	32,8	34 \pm 1
	3,8795	0,2631	39,6	0,2517	36,3	38 \pm 2
MER-KO	0	0,4128	0	0,3311	0	0
	1,1559	0,3533	14,4	0,2941	11,2	13 \pm 2
	2,3118	0,2580	37,5	0,2355	28,9	33 \pm 4
	3,4677	0,2042	50,5	0,1811	45,3	48 \pm 3
	4,6236	0,1998	51,6	0,1665	49,7	51 \pm 1
	5,7795	0,1764	57,3	0,1697	48,7	53 \pm 4
Vivox 70	0	0,7117	0	0,6244	0	0
	3,3667	0,5055	19,0	0,5033	19,4	19,2 \pm 0,2
	6,7334	0,4976	30,1	0,4630	25,9	28 \pm 2
	13,4668	0,3852	45,9	0,3467	44,5	45,2 \pm 0,7
	20,2002	0,2237	68,6	0,2211	64,6	67 \pm 2
	26,9336	0,0877	87,7	0,0939	85,0	86 \pm 1
	33,667	0,0483	93,2	0,0785	87,4	90 \pm 3

Legenda: **VRA-KO**: ekstrakt, pridobljen iz grozdnih kožic vinske sorte Vranac; **MAR-KO**: ekstrakt, pridobljen iz grozdnih kožic vinske sorte Maraština; **LAS-KO**: ekstrakt, pridobljen iz grozdnih kožic vinske sorte Lasin; **MER-KO**: ekstrakt, pridobljen iz grozdnih kožic vinske sorte Merlot; **VIVOX-70**: ekstrakt, pridobljen iz rožmarinovih listov

Na sliki 14 je za primer vinske sorte Vranac in ekstrakta rožmarinovitih listov prikazana odvisnost SASA od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Iz slike 14 opazimo, da sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala narašča s koncentracijo fenolnih spojin.



Slika 14: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakt lista vinske trte in grozdne kožice, sorte Vranac ter za ekstrakt rožmarinovitih listov

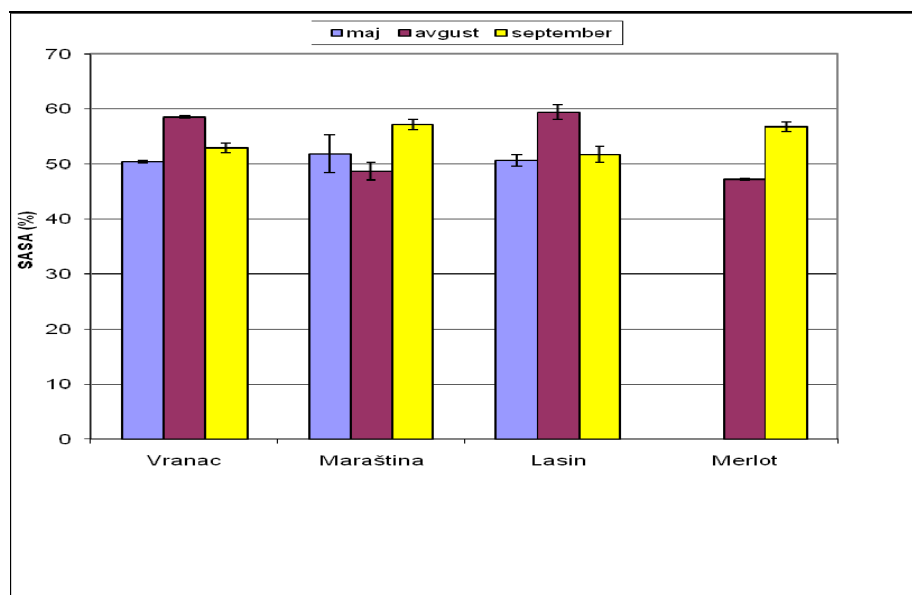
Da bi bolj nazorno predstavili primerjavo med preiskovanimi vzorci v sposobnosti lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikalov, smo izračunali vrednost SASA za ekstrakte listov vinske trte, grozdnih kožic in rožmarinovitih listov pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3,5 mg/l. Vrednosti smo izračunali iz parametrov krivulj koncentracijske odvisnosti SASA, ki so za nekaj vzorcev prikazane na sliki 14. Vrednost parametrov smo določili s pomočjo nelinearne regresijske analize.

Primerjavo v sposobnosti lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikalov, med listi vinske trte različnih sort in v različnih obdobjih vegetacije, smo prikazali na sliki 15. Iz slike 15 vidimo, da je antioksidativna učinkovitost odvisna od obdobja vegetacije. Med ekstrakti listov vinske trte sorte Vranac je najnižjo sposobnost pokazal ekstrakt listov, ki so bili zbrani v maju, najvišjo pa ekstrakt listov zbranih v avgustu. Pri sorti Maraština smo opazili ravno obraten trend, kjer so listi zbrani avgusta pokazali znižanje učinkovitosti v

primerjavi z učinkovitostjo listov, ki so bili zbrani meseca maja oz. avgusta. Ekstrakt listov sorte Lasin pobranih avgusta je pokazal opazno zvišanje učinkovitosti v primerjavi z ekstraktom listov pobranih maja in septembra. Ekstrakt listov sorte Lasin pobranih avgusta je tudi na splošno v primerjavi z vsemi ostalimi preiskovanimi ekstrakti z vrednostjo SASA = 59,4 % pokazal najboljšo sposobnost lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikala.

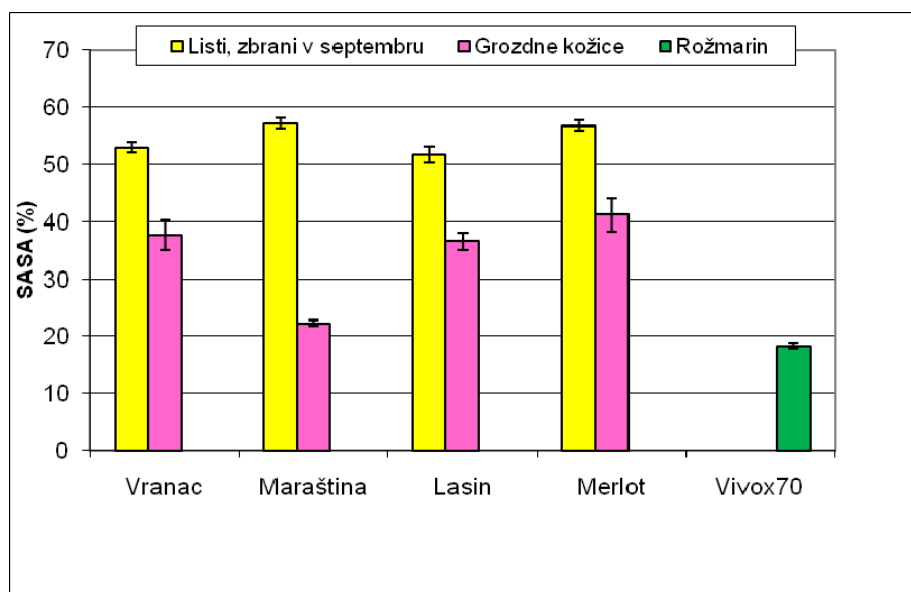
Pri sorti Merlot smo opazili, podobno kot pri DPPH• testu in metodi beljenja β -karotena, zvišanje antioksidativne učinkovitosti ekstrakta listov zbranih meseca septembra v primerjavi z ekstraktom listov zbranih avgusta. Če primerjamo liste zbrane v septembru opazimo, da se je sorta Maraština izkazala za najboljšo z 57,2 % antioksidativno učinkovitostjo, sledi sorta Merlot (56,7 %), sorta Vranac (52,9 %), sorta Lasin pa ima najnižjo antioksidativno učinkovitost (51,7 %).

Te razlike lahko pripišemo različni kakovosti fenolnih spojin v različnih mesecih vegetacije in prav tako različni vsebini proantocianidov.



Slika 15: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za ekstrakte listov vinske trte, štirih razlih sort, pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3,5 mg/l. Listi vinske trte so bili zbrani v mesecu maju, avgustu in septembru

Slika 16 prikazuje primerjavo sposobnosti lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikalov listov vinske trte zbranih v septembru z ekstrakti grozdnih kožic in listov rožmarina. Najslabšo antioksidativno učinkovitost je le s 18,2 % sposobnostjo lovljenja prostih radikala pokazal ekstrakt rožmarinovitih listov Vivox 70.



Slika 16: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za ekstrakte listov vinske trte, pobranih v mesecu septembru in ekstrakte grozdnih kožic ter za ekstrakt rožmarinovitih listov pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3,5 mg/l

Iz slike 16 vidimo, da imajo ekstrakti listov vinske trte znatno boljšo antioksidativno učinkovitost kot ekstrakti grozdnih kožic ali ekstrakt rožmarinovitih listov. Pri sorti Maraština je ekstrakt iz listov presegel ekstrakt iz kožic kar za 200 %. Za nekoliko manj (v povprečju za 38 %) je ekstrakt iz listov v sposobnosti lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikalov presegel ekstrakt iz grozdnih kožic pri sortah Vranac, Lasin in Merlot. Med ekstrakti grozdnih kožic je podobno kot pri sposobnosti lovljenja DPPH• radikala in sposobnosti redukcije, pokazal najslabšo sposobnost lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikala ekstrakt bele sorte Maraština.

5 SKLEPI

Na podlagi opravljenih analiz in dobljenih rezultatov lahko sklepamo naslednje:

- Ekstrakti listov vinske trte, grozdnih kožic in ekstrakt rožmarinovitih listov vsebujejo fenolne spojine.
- Obdobje vegetacije, v katerem so bili zbrani listi vinske trte, vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin.
- Za vse ekstrakte smo z različnimi *in vitro* metodami dokazali, da so antioksidativno učinkoviti.
- Fenolne spojine v ekstraktih so sposobne reducirati kovinske ione, zavirati oksidacijo linolne kisline emulgirane v vodi in loviti DPPH• oziroma O₂⁻ radikale.
- Obdobje vegetacije ne vpliva samo na vsebnost celokupnih fenolnih spojin, pač pa tudi na antioksidativno učinkovitost.
- Poleg tega, da vpliva na antioksidativno učinkovitost vegetacijsko obdobje, v katerem so bili listi vinske trte zbrani, smo opazili razliko tudi med različnimi sortami.
- Antioksidativna učinkovitost je odvisna od izbrane metode.
 - Fenolne spojine v ekstraktih listov rožmarina Vivox 70 so tako pokazale najboljšo redukcijsko sposobnost in najboljšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala, a obenem najslabšo sposobnost lovljenja superoksidnega aniona.
 - Fenolne spojine v ekstraktih listov vinske trte so pokazale boljšo sposobnost lovljenja superoksidnega aniona, boljšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala od fenolnih spojin v ekstraktih grozdnih kožic ter dokaj primerljivo sposobnost lovljenja peroksilnega radikala v emulziji.
- Fenolne spojine v vseh preiskovanih ekstraktih so glede na *in vitro* antioksidativno učinkovitost primerljive s komercialnima antioksidantoma: askorbinsko kislino in BHT pri čemer so fenolne spojine preiskovanih ekstraktov pokazale nekoliko nižjo antioksidativno učinkovitost.
- Rezultati našega dela so potrdili naše hipoteze.

6 POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo v ekstraktih listov vinske trte, ki so bili pobrani v različnih vegetacijskih obdobjih, ekstraktih grozdnih kožic in komercialnem ekstraktu listov rožmarina Vivox 70 določili vsebnost skupnih fenolnih spojin. Listi vinske trte so bili pobrani v treh različnih mesecih, to je maja (peti mesec), nato avgusta (osmi mesec) in septembra (deveti mesec). Raziskavo smo opravili na štirih različnih sortah vinske trte: Lasin, Merlot, Maraština in Vranac. Z različnimi metodami smo nato preiskovanim ekstraktom določili antioksidativno učinkovitost. Poleg tega smo izvedli primerjavo antioksidativne učinkovitosti ekstraktov s komercialno dostopnim antioksidantom BHT in askorbinsko kislino.

Ekstrakti kožic grozdnih jagod in listov vinske trte so bili pripravljene na Fakulteti za kemijo in tehnologijo, Univerze v Splitu. V analizo smo dobili metanolne raztopine omenjenih ekstraktov.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v metanolnih raztopinah ekstraktov smo določili spektrofotometrično z metodo Folin-Ciocalteu. Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo izrazili kot maso galne kisline na ml ekstrakta. Opazili smo naraščanje v vsebnosti skupnih fenolnih spojin z obdobjem vegetacije. Potrdili smo hipotezo, da čas obiranja listov vinske trte v različnih obdobjih vegetacije rastline, vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin. Najmanj skupnih fenolnih spojin so imeli ekstrakti, za katere so liste pobrali v maju, največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin pa so pokazali ekstrakti, za katere so liste pobrali v mesecu septembru. Če primerjamo liste različnih vinskih sort pobranih septembra, opazimo, da vsebuje največ skupnih fenolnih spojin vinska sorta Merlot, sledi sorta Vranac in sorta Maraština. Najmanj fenolnih spojin smo določili v metanolni raztopini ekstrakta iz listov vinske trte sorte Lasin. Ekstrakti listov vinske trte vsebujejo bistveno več skupnih fenolnih spojin od ekstraktov grozdnih kožic.

V nadaljevanju smo dokazali *in vitro* antioksidativno učinkovitost preiskovanih ekstraktov s štirimi različnimi metodami:

- določitev sposobnosti lovljenja DPPH• radikala,
- določitev sposobnosti redukcije kovinskih ionov,
- določitev sposobnosti zaviranja oksidacije linolne kisline emulgirane v vodi, (beljenje β -karotena)
- določitev sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala.

Vsi preiskovani ekstrakti so pokazali antioksidativni potencial. Fenolne spojine v ekstraktih so sposobne reducirati kovinske ione, zavirati oksidacijo linolne kisline, emulgirane v vodi ter loviti DPPH• radikale in $O_2^{\cdot-}$ radikale.

Obdobje vegetacije vpliva na antioksidativno učinkovitost. Pri vseh sortah je v največji meri vpliv vegetacijskega obdobja izražen pri sposobnosti lovljenja DPPH• radikala in v manjši meri pri sposobnosti lovljenja superoksidnega aniona ter peroksidnega radikala v emulziji.

Poleg tega, da vpliva na antioksidativno učinkovitost vegetacijsko obdobje, v katerem so bili listi vinske trte zbrani, smo opazili razliko tudi med različnimi sortami. Fenolne spojine v ekstraktu listov srednje poznih sort Vranac oz. Maraština so se izkazale kot najboljše pri reduciranju kovinskih ionov, zaviranju oksidacije linolne kisline v emulziji in pri lovljenju DPPH• radikala oz. pri lovljenju $O_2^{\cdot-}$ radikala. Fenolne spojine v ekstraktu listov sorte Lasin so pokazale najslabšo antioksidativno učinkovitost v vodni emulziji linolne kisline in lovljenju $O_2^{\cdot-}$ radikala ter najnižjo sposobnost redukcije.

Vsi preiskovani ekstrakti so v *in vitro* testih primerljivi z ekstraktom rožmarinovitih listov in ekstrakti grozdnih kožic. Fenolne spojine v ekstraktih listov vinske trte so v testih, kjer preverjamo sposobnost lovljenja DPPH• radikala in sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala pokazale boljšo antioksidativno učinkovitost od fenolnih spojin v ekstraktih grozdnih kožic. Pri metodi beljenja β -karotena so ekstrakti listov in kožic pokazali primerljivo antioksidativno učinkovitost. Fenolne spojine v ekstraktu rožmarinovitih listov so se izkazale kot najboljše pri lovljenju DPPH• radikala in reduciranju kovinskih ionov, medtem ko so pokazale pri lovljenju superoksidnega anionskega radikala najslabšo učinkovitost.

Naše ekstrakte pa smo primerjali tudi s komercialnima antioksidantoma BHT in askorbinsko kislino. Fenolne spojine v ekstraktih listov vinske trte sort Vranac in Maraština so pokazale boljšo sposobnost redukcije kot askorbinska kislina. V vodni emulziji linolne kisline je bila antioksidativna učinkovitost preiskovanih ekstraktov slabša od BHT.

Z rezultati smo potrdili možnost uporabe fenolnih izvlečkov kot antioksidativnega sredstva. Poskuse smo izvedli v modelnih testih *in vitro*, zato bi bilo potrebno preveriti učinek izvlečkov tudi v živilih.

7 VIRI

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. - 27. okt 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589

Abram V., Abramovič H., Skrt M., Kač M., Poklar Ulrih N. 2010. Antioksidacijska učinkovitost fenolnih spojin. Kemija v šoli in družbi, 22, 2 : 14-19

Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave – funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188

Al-Mammun M., Yamaki K., Masumizu T., Nakai Y., Saito K., Sano H., Tamuro Y. 2007. Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern Japan determined using electron spin resonance spectrometry. International Journal of Biological Sciences, 3, 6: 349-355

Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R., Löliger J. 1992. Antioxydant and prooxydant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. Xenobiotica, 22: 257-268

Arvanitoyannis I.S., Ladas D., Mavromatis A. 2006. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. International Journal of Food Science and Technology, 41, 5: 475-487

Batič M., Soršak Jukič L. 2008. Predpisi o ravnanju z živilskimi odpadki. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-26

Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. 2004. Food chemistry. 3rd revised ed. Berlin, Springer: 190-222

Blois M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181: 1199-1200

Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Macri F., Vianello A. 2008. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling and Behaviour*, 3, 9: 626-632

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30

Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-333

Brieskorn C.H., Fuchs A., Briedenberg J.B., McChesney J.D., Wenkert E. 1964. The structure of carnosol. *Journal of Organic Chemistry*, 29: 2293-2298

Castillo-Munoz N., Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E., Hermosin-Gutierrez I. 2007. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3: 992-1002

Cigić B., Rudan Tasič D. 2006. Antioksidanti in prooksidanti. V: *Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih*. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9.-10. nov. 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 110-113

Colnarič J., Vrabl S. 1991. *Vinogradništvo*. Ljubljana, Kmečki glas: 221-222

Cooke D., Steward W.P., Gescher A.J., Marczylo T. 2005. Anthocyanins from fruits and vegetable: Does bright colour signal cancer chemopreventive activity. *European Journal of Cancer*, 41: 1931-1940

Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. 1996. Antioxidant activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 73, 5: 645-652

Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P.M., Castanas E. 2000. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78: 429-441

Delgado R., Martin P., del Alamo M., Gonzalez M.R. 2004. Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 623-630

Dorrie J., Sapala K., Zunino S.J. 2001. Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. *Cancer Letters*, 170, 1: 33-39

Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P.. 2004. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10: 55–73

Frankel E.N., Huang S.-W., Aeschbach R., Prior E. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 131-135

Fuhrman B., Aviram M. 2002. Polyphenols and flavonoids protect LDL against atherogenic modifications. V: *Handbook of antioxidants*. 2nd ed. Cadenas E., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 303-336

Fukumoto L.R., Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597–3604

González-Paramás A.M., Esteban-Ruano S., Santos-Buelga C., De Pascual-Teresa S., Rivas-Gonzalo J.C. 2004. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2: 234-238

Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. *Introduction to plant biochemistry*. 2nd ed. Oxford, Pergamon Press: 528-557

Gordon M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. V: *Food antioxidants*. Hudson B.J.F. (ed.). New York, Elsevier Science: 1-18

Gordon M.H. 2003. Antioxidants. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 261-265

Grieve M. 2006. *Vitis Vinifera* L. A modern herbal. New York. Botanical.com: 1 str.
<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/v/vine--09-1.jpg> (01.02.2011)

Hakkinen S. 2000. Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Doctoral dissertation. Kuopio, Kuopio University Publications D. Medical Sciences: 17-21

Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte: ilustriran prikaz trsnega izbora za Slovenijo. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 9-9

Hribar J., Zlatić E. 2006. Flavonoidi sadja in zelenjave kot antikarcinogene komponente. V: *Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih*. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9.-10. nov. 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 158-163

Hur Y. G., Yun Y., Won Y. 2004. Rosmarinic acid induces p53-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *Journal of Immunology*, 172, 1: 79-87

Israilides C., Smith A., Harthill J., Barnett C., Bambalov G., Scanlon B. 1998. Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 613-617

Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220

Jeong S.T., Goto-Yamamoto N., Kobayashi S., Esaka A. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skin. *Plant Science*, 167: 247-252

Kammerer D., Claus A., Carle R., Scheiber A. 2004. Polyphenol screening of pomace red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4360-4376

Katalinič V., Smole Možina S., Skroza D., Generalič I., Abramovič H., Miloš M., Ljubenkovič I., Pisernik S., Pezo I., Terpinc P., Boban M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* L. varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119, 2: 715-723

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

Koning A., Koning C.B., Koning P. 2006. Antioxidants. V: *Handbook of food science, technology and engineering*. Vol.2. Hui Y.H. (ed.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 85-1 – 85-5

Košmelj K. 2001. *Uporabna statistika*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 249 str.

Košmerl T. 2008. Odpadki in stranski proizvodi pri predelavi grozdja in pridelavi vina. V: *Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija*. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151-158

Kosar M., Küsar E., Malyer H., Uylaser V., Tükben C., Hüsnü can Baser K. 2007. Effect of brining on biological activity of leaves of *Vitis vinifera* L. (Cv. Sultani Cü ekirdeksiz) from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4596-4603

Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to coneract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 224-282

Langcake P., Pryce R.J., 1976. The production of resveratrol by *Vitis Vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9: 77-86

Langley L. 1995. *Encyclopedia of herbs & their uses: The definitive A-Z guide to the uses and cultivation of herbs*. London, Dorling Kindersley Limited: 348-349

Leung A.Y., Foster S. 1996. *Encyclopedia of common natural ingredients: Used in food, drugs and cosmetics*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons: 536-537

Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. 1996. *Food antioxidants: Technological, toxicological and health perspectives*. New York, Marcel Dekker: 490 str.

Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613: 1-19

Makris D.P., Boskou G., Andrikopoulos N.K. 2007. Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 125-132

Matthäus B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3444-3452

Montealegre R.R., Peces R., Vozmediano J.L., Gascuena J. M., Romero G.E. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a worm climate. *Jouranl of Food Composition and Analysis*, 19: 687-693

Moldes D., Gallego P., Rodriquez-Couto S., Sanroman A. 2003. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*, 25: 491-495

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for the antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219

Monagas M., Hernández-Ledesma B., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B. 2006. Commercial dietary ingredients from *Vitis Vinifera* L. leaves and grape skins: Antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 319-327

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

Nussdorfer N. 1991. V kraljestvu začimb. Portorož, Droga: 108-109

Paš M., Raspor P. 2008. Biotehnološko izkoriščanje sekundarnih surovin iz živilstva. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 109-121

Pinelo M., Arnous A., Meyer A.S. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 579-590

Poročilo o stanju tehnološke zrelosti in ocena kvalitete rdečih sort grozdja – letnik 94 za primorski vinorodni rajon. 1995. Nova Gorica, Kmetijsko veterinarski zavod: 7-16

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

Rasmussen S. E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K., Poulsen L. 2005. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 159-174

Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioprocesi pridobivanja antioksidantov V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54-65

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933-956

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 4: 152-159

Roback J., Gryglewski R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxides anions. *Biochemical Pharmacology*, 37: 837-841

Roussis I.G., Lambropoulos I., Tzimas P., Gkoulioti A., Marinos V., Tsoupeis D., Boutaris I. 2008. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 614-621

Schieber A., Stintzing F.C., Carle R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 401-413

Schuler P. 1990. Natural antioxidants exploited commercially. V: *Food Antioxidants*. Hudson B.J.F. (ed.). New York, Elsevier Science: 99-168

Shahidi F., Nazck M. 1996. *Food phenolics: Sources, chemistry, effects and applications*. Lancaster, Technomic Publishing Company, Inc.: 199-233

Shahidi F. 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44, 3: 158-163

Sigler R., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms- I. Microbial vs. Higher cells- damage and defenses in relation to cell ageing and death. *Folia Microbiologica*, 44, 6: 587-624

Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158

Skibola C.F., Smith M.T. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 375-383

Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. 1997. Wine as a biological fluid: History, production and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11: 287-313

Surh Y.J. 2006. Chemopreventive phenolic compounds I Common spices. V: *Carcinogenic and anticarcinogenic food components*. Baer-Dubowska W., Bartoszek A., Malejka-Giganti D. (eds.). Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group: 197-218

Šikovec S. 1993. *Vinarstvo: od grozdja do vina*. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 22-37

Terčelj D. 2007. *Kultura vina na Slovenskem*. Ptuj, Tovarna tradicij: 33-33

Trojáková L., Réblová Z., Nguyen H.T.T., Pokorný J. 2001. Antioxidant activity of rosemary and sage extracts in rapeseed oil. *Journal of Food Lipids*, 8: 1-13

Vršič S., Lešnik M. 2001. *Vinogradništvo*. Ljubljana, Kmečki glas: 8-59

Winston C. 2003. Rosemary: A culinary delight. Michigan, Andrews University, Vegetarianism & Vegetarian Nutrition: 1 str.
<http://www.vegetarian-nutrition.info/herbs/rosemary.php> (01.02.2011)

Waterhouse A.L. 2002. The phenolics wine antioxidants. V: Handbook of antioxidants. 2nd ed. Cadenas E., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker: 401-416

Wenkert E., Fuchs A., McChesney J.D. 1965. Chemical artifacts from the family labiatae. Journal of Organic Chemistry, 30: 2931-2934

ZAHVALA

Najprej se najlepše zahvaljujem mentorici prof. dr. Heleni Abramovič za strokovno pomoč in nasvete ter za skrben in natančen pregled diplomske naloge.

Hvala prof. dr. Blažu Cigiču za strokoven in hiter končni pregled diplomske naloge.

Velika zahvala gre Petri Terpinc uni. dipl. inž. živ. tehn. za pomoč pri uvajanju in izvedbi eksperimentalnega dela diplomske naloge.

Za vso pomoč, prijaznost in razumevanje se zahvaljujem tudi ostalim zaposlenim na Katedri za biokemijo in kemijo živil.

Hvala Lini Burkan za pomoč pri iskanju literature.

Posebna zahvala gre moji družini, ki mi je tekom študija stala ob strani ter me finančno in moralno podpirala na moji poti do diplome.

Hvala Andreju za čas in potrpežljivost pri oblikovanju diplomske naloge. Hvala ti za vso podporo in ljubezen.

Hvala tudi Niki za pomoč in zabavne dni, ki sva jih skupaj preživele v laboratoriju.