

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Andreja ERJAVEC

VLOGA POLIFENOL-OKSIDAZE, PEROKSIDAZ IN FENILALANIN-DEAMINAZE
PRI PORJAVENJU KROMPIRJA

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ROLE OF POLYPHENOL OXIDASE, PEROXIDASES AND PHENYLALANINE
AMMONIA-LYSASE IN POTATO BROWNING

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Veroniko Abram, za somentorja prof. dr. Marjana Simčiča in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentorica: prof. dr. Veronika Abram

Somentor: prof. dr. Marjan Simčič

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andreja Erjavec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.15: 633.491 (043) = 863
KG encimi / krompir / antioksidanti / polifenol-oksidade / peroksidaze / fenilalanin-deaminaze / polifenoli / encimsko porjavenje krompirja / skladiščenje v zračni atmosferi / skladiščenje v kisikovi atmosferi
AV ERJAVEC, Andreja
SA ABRAM, Veronika (mentorica) / SIMČIČ, Marjan (somentor) / CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2007
IN VLOGA POLIFENOL-OKSIDAZE, PEROKSIDAZ IN FENILALANIN-DEAMINAZE PRI PORJAVENJU KROMPIRJA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 56 str., 6 pregl., 22 sl., 54 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI V diplomski nalogi smo preučevali encimsko porjavenje rezin krompirja, do katerega prihaja po mehanskih poškodbah, zaradi oksidacije fenolnih spojin v kinone in tvorbe različnih produktov, ki dajo značilno temnejšo barvo. Hitrost porjavenja smo spremljali na rezinah dveh sort krompirja, Kennebec in Désirée, z določanjem specifične aktivnosti treh encimov; polifenol-oksidade (PPO), peroksidaze (POD) in fenilalanin-deaminaze (PAL). Ugotavljali smo tudi vpliv uporabe različnih antioksidantov (askorbinska kislina, citronska kislina, kalijev metabisulfit in rožmarinov ekstrakt), prisotnosti kisika ter načina hranjenja krompirja na hitrost porjavenja. Za eksperimente z antioksidanti smo uporabili samo gomlje sorte Kennebec, za vpliv načina hranjenja rezin pa obe sorti, tako Kennebec kot Désirée. Stopnjo porjavenja krompirjevih rezin smo določali s kromometrom. Kot najbolj učinkovit antioksidant se je v naših poizkusih po pričakovanjih izkazal K-metabisulfit, saj je najbolj zaviral delovanje PPO in POD, kar smo posredno pokazali tudi z merjenjem barve. Po tretiranju rezin gomljev s citronsko in askorbinsko kislino smo določili manj skupnih fenolnih spojin. Aktivnost PAL pa je najbolj zmanjšalo tretiranje z askorbinsko kislino.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.15: 633.491 (043) = 863
CX enzymes / potatoes / antioxidants / polyphenol oxidase / peroxidases / phenylalanine ammonia-lyase / polyphenols / enzymatic browning of potato / storage in air atmosphere / storage in oxygen atmosphere /
AU ERJAVEC, Andreja
AA ABRAM, Veronika (supervisor) / SIMČIČ, Marjan (co-advisor) / CIGIČ, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2007
TI ROLE OF POLYPHENOL OXIDASE, PEROXIDASES AND PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE IN POTATO BROWNING
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 56 p., 6 tab., 22 fig., 54 ref.
LA sl
AL sl / en
AB In graduation thesis we were researching enzymatic browning of potato slices after mechanical damage due to oxidation of phenolic compounds into quinones and to form various products resulting in a typical darker colour. Rate of browning was observed in slices of two species of potato, Kennebec and Désirée, by determining specific activity of three enzymes; polyphenol oxidase (PPO), peroxidases (POD) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL). We were also assessing impact of using various antioxidants (ascorbic acid, citric acid, potassium metabisulfite and rosemary extract), presence of oxygen and an impact of storage method of potato on rate of browning. Kennebec tubers were used for experiments with antioxidants while Kennebec and Désirée were used for assessing an impact on storage method of potato slices. Browning rate of potato slices browning was measured with chromometer. In accordance with our expectation, potassium metabisulfite was the the most efficient antioxidant as it hindered activity of PPO and POD most efficiently, which was also shown by measuring colour. After treating of potato slices with citric and ascorbic acid less total phenolic compounds were determined. Activity of PAL was most efficiently hindered when being treated with ascorbic acid.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	Str. III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KROMPIR	2
2.1.1 Splošne karakteristike	2
2.1.2 Opis uporabljenih sort krompirja	3
2.1.3 Kemijska sestava gomolja	4
2.2 PORJAVENJE KROMPIRJA	6
2.2.1 Neencimsko porjavenje	6
2.2.2 Encimsko porjavenje	7
2.2.2.1 Polifenol-oksidade	7
2.2.2.2 Peroksidaze	8
2.2.2.3 Fenilalanin-deaminaza	9
2.2.3 Fenolne spojine	10
2.2.4 Antioksidanti	11
2.2.4.1 Kalijev- <i>m</i> -bisulfit	13
2.2.4.2 Askorbinska kislina	13
2.2.4.3 Citronska kislina	14
2.2.4.4 Rožmarinovo olje	14
2.3 NAMEN DELA	15
2.4 DELOVNA HIPOTEZA	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 KROMPIRJEV EKSTRAKT	16
3.1.1 Priprava ekstrakta	16
3.1.2 Priprava pufra I in II	16
3.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	17
3.2.1 Princip	17
3.2.2 Izvedba	17
3.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI ENCIMOV IN SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	18
3.3.1 Določanje PPO aktivnosti	18
3.3.1.1 Princip	18
3.3.1.2 Priprava raztopine TNB	20
3.3.1.3 Raztopina substrata za določanje PPO aktivnosti	20
3.3.1.4 Izvedba	20
3.3.2 Določanje POD aktivnosti	21
3.3.2.1 Princip	21

3.3.2.2 Raztopina substrata	21
3.3.2.3 Izvedba	22
3.3.3 Določanje PAL aktivnosti	22
3.3.3.1 Princip	22
3.3.3.2 Izvedba	23
3.3.3.3 Priprava raztopine substrata	23
3.3.4 Skupne fenolne spojine	24
3.3.4.1 Umeritvena krivulja	24
3.3.4.2 Določanje skupnih fenolnih spojin	25
3.4 MERJENJE BARVE KROMPIRJEVIH REZIN	25
3.4.1 Princip	25
3.4.2 Izvedba	26
3.5 PREPREČITEV PORJAVENJA	26
3.5.1 Z antioksidanti	26
3.5.2 Vpliv načina pakiranja	27
4 REZULTATI	29
4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V VZORCU	29
4.2 DOLOČANJE PPO AKTIVNOSTI	31
4.2.1 Vpliv antioksidantov	31
4.2.2 Vpliv različnega načina hranjenja	33
4.3 DOLOČANJE POD AKTIVNOSTI	34
4.3.1 Vpliv antioksidantov	34
4.3.2 Vpliv različnega načina hranjenja	36
4.4 DOLOČANJE PAL AKTIVNOSTI	36
4.4.1 Vpliv antioksidantov	36
4.4.2 Vpliv načina hranjenja	38
4.5 DOLOČANJE SKUPNIH FENOLOV	38
4.5.1 Umeritvena krivulja	38
4.5.2 Določanje skupnih fenolnih spojin	40
4.5.2.1 Vpliv antioksidantov	40
4.5.2.2 Vpliv načina hranjenja	41
4.6 BARVA KROMPIRJEVIH REZIN	42
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1 DOLOČANJE PPO AKTIVNOSTI	44
5.2 DOLOČANJE POD AKTIVNOSTI	44
5.3 DOLOČANJE PAL AKTIVNOSTI	45
5.4 DOLOČANJE SKUPNIH FENOLOV	46
5.5 DOLOČANJE BARVE KROMPIRJEVIH REZIN	46
SKLEPI	47
6. POVZETEK	49
7. VIRI	51

ZAHVALA

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Shema vzdolžnega prereza gomolja krompirja (Rama in Narasimham, 2003)	3
Slika 2: Gomolj sorte Desiree (CFIA, 2004 a)	4
Slika 3: Gomolj sorte Kennebec (CFIA, 2004 b)	4
Slika 4: Poenostavljen potek Maillardove reakcije –neencimsko porjavenje (Hodge, 1953; Sapers,1993)	7
Slika 5: Potek deaminacije fenilalanina, ki jo katalizira PAL (Heldt, 1997)	9
Slika 6: Potek reakcije, ki jo katalizira PPO in poteka pri določanju njene aktivnosti (Esterbauer in sod.,1977)	19
Slika 7: Potek reakcije za določanje aktivnosti POD z gvajakolom (Stout in sod., 1996)	22
Slika 8: Grafični prikaz vrednosti posameznih parametrov pri kromometru (sistem CIE 1976)	27
Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradfordu (1976); enačba premice je $A = 0,0089 \times m_{\text{prot}}$	30
Slika 10: Odvisnost absorbance pri 420 nm od časa poteka encimsko katalizirane reakcije za določanje aktivnosti PPO	31
Slika 11: Specifična aktivnost PPO v rezinah bele sorte krompirja Kennebec ob času 0 in po 2,5 ure od začetka tretiranja z raztopinami antioksidantov	33
Slika 12: Specifična aktivnost PPO v rezinah gomoljev hranjenih pri 4 °C v različnih atmosferah (A-zrak, B-kisikova atmosfera)	34
Slika 13: Odvisnost absorbance pri 470 nm od časa poteka encimsko katalizirane reakcije za POD	35
Slika 14: Specifična aktivnost POD v rezinah ob času 0 in po 2,5 ure od začetka tretiranja z raztopinami antioksidantov	35
Slika 15: Specifična aktivnost POD v rezinah gomoljev hranjenih pri 4 °C v različnih atmosferah (A-zrak, B-kisikova atmosfera)	36
Slika 16: Odvisnost absorbance pri 295 nm od časa poteka encimsko katalizirane reakcije za PAL	37

Slika 17: Specifična aktivnost PAL ob času 0 in po 2,5 ure od začetka tretiranja z raztopinami antioksidantov	37
Slika 18: Specifična aktivnost PAL v rezinah gomoljev hranjenih pri 4 °C v različnih atmosferah (A-zrak, B-kisikova atmosfera)	38
Slika 19: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino za določanje skupnih fenolnih spojin; enačba premice je $A_{746}=0,0239x c$	39
Slika 20: Skupne fenolne spojine ob času 0 in po 2,5 h od začetka tretiranja z raztopinami antioksidantov	41
Slika 21: Skupne fenolne spojine v rezinah gomoljev hranjenih pri 4 °C v različnih atmosferah (A-zrak, B-kisikova atmosfera)	42
Slika 22: Vrednosti L izmerjene na rezinah gomoljev sorte Kennebec določene s kromometrom Minolta CR-20b	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemijska sestava krompirjevega gomolja (Souci in sod., 2000)	5
Preglednica 2: Priprava vzorcev za umeritveno krivuljo za določanje koncentracije proteinov	18
Preglednica 3: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino za določanje skupnih fenolnih spojin	25
Preglednica 4: Absorbanca raztopin in koncentracija proteinov v vseh supernatantih iz krompirjevih gomoljev	30
Preglednica 5: Zbrane povprečne vrednosti meritev naklonov k	32
Preglednica 6: Absorbanca razstopin in koncentracija fenolnih spojin v vseh supernatantih iz krompirjevih gomoljev	40

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CBB Coomassie Brilliant Blue G-250

DOPA 3,4 dihidroksifenilalanin

F- C reagent Folin- Ciocalteau- jev reagent

KK klorogenska kislina

PAL fenilalanin-deaminaza

POD peroksidaza

PPO polifenol- oksidaza

1 UVOD

Krompir je kot živilo, pa tudi kot surovina, zelo pomemben. Zaradi njegove hranilne vrednosti, skladiščnih lastnosti, razširjenosti in cene, je zelo priljubljeno živilo, ki ga lahko uživamo celo leto. Ker se krompir danes uporablja zaradi višjega življenjskega standarda predvsem kot dodatek k mesu, ga sadimo v Sloveniji na približno 30000 ha (po drugi svetovni vojni 60000 ha). Poleg rabe svežega krompirja v gospodinjstvu, ga uporabljamo tudi v živilski industriji za izdelavo izdelkov in polizdelkov iz krompirja, ki so zanimivi za širši krog potrošnikov, saj nam omogočajo prihranek časa pri kuhanju. Krompir, ki ga uporabljamo za prehrano, moramo najprej oprati in olupiti. To opravilo pa zahteva, predvsem v večjih obratih (obrati družbene prehrane, bolnišnice, hotelske kuhinje, šole), veliko delovnih moči, delovnih površin in skladiščnega prostora. Zato je postala v zadnjih letih večja potreba po že olupljenem krompirju. Tak krompir pa mora biti primerno pakiran in biološko stabilen, saj predstavlja porjavenje krompirja velik problem v živilski industriji.

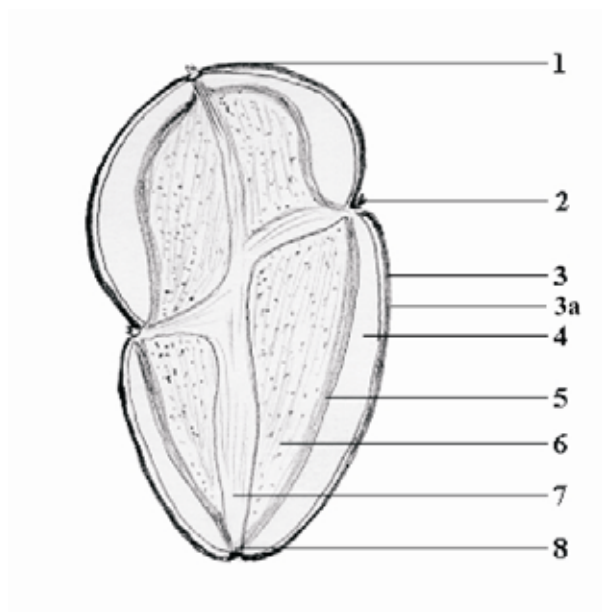
2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIR

2.1.1 Splošne karakteristike

Krompir je ena pomembnejših poljščin v kmetijstvu. Razširjen je povsod, kjer so primerne klimatske razmere. Dokler je bil krompir živilo za zadovoljevanje osnovnih prehranskih potreb, še zlasti pred drugo svetovno vojno, med njo in nekaj let po njej, smo ga pridelovali v Sloveniji tudi na 60000 ha na leto, torej na več kot 18 % njiv. Zdaj, ko ga uporabljamo predvsem kot dodatek ter za določene vrste industrijske predelave, ga sadimo na nekaj več kot 29000 hektarih (Kus, 1994).

Zunanja lupina krompirja (slika 1) vsebuje plast plutastega periderma, ki sega 1/8 do 1/6 mm globoko in preprečuje izgubo vode ter naselitev plesni. Stene plutastih celic so impregnirane z oksidiranimi in polimeriziranimi dolgoverižnimi maščobnimi kislinami, zato je lupina rjavkaste barve. Korteks je 2 mm debela plast pod peridermom in vsebuje večji del mineralnih snovi. Nato sledi skorjasti parenhim, ki vsebuje precej škroba. Notranji mozgov parenhim in zunanji mozgov parenhim vsebujeta velik delež škroba in ležita znotraj cevnege poveska. Največ beljakovin pa je v sredici in parenhimu skorje.

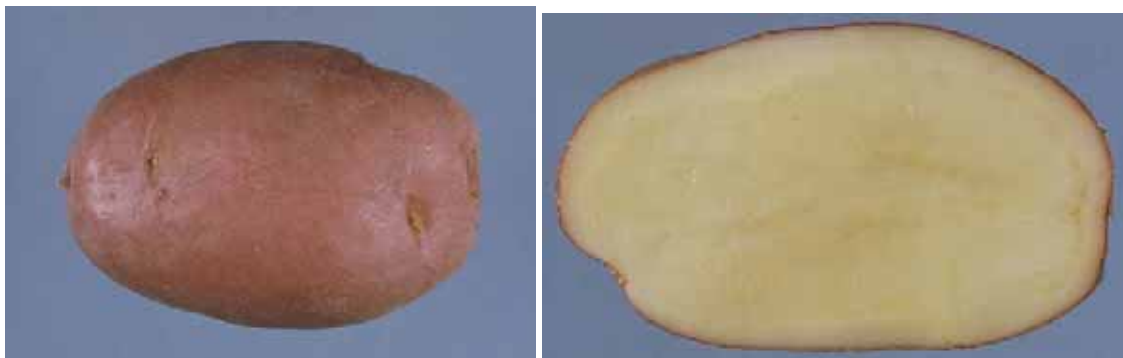


Slika 1: Shema vzdolžnega prereza gomolja krompirja; 1 - stolon, 2 - rastna točka (oko), 3 - plutast epiderm (periderm), 3a – korteks, 4 - skorjasti parenhim, 5 - vaskularni obroč (ksilem), 6 - zunanji mozgov parenhim, 7 - notranji mozgov parenhim, 8 - apikalno oko (Rama in Narasimham, 2003)

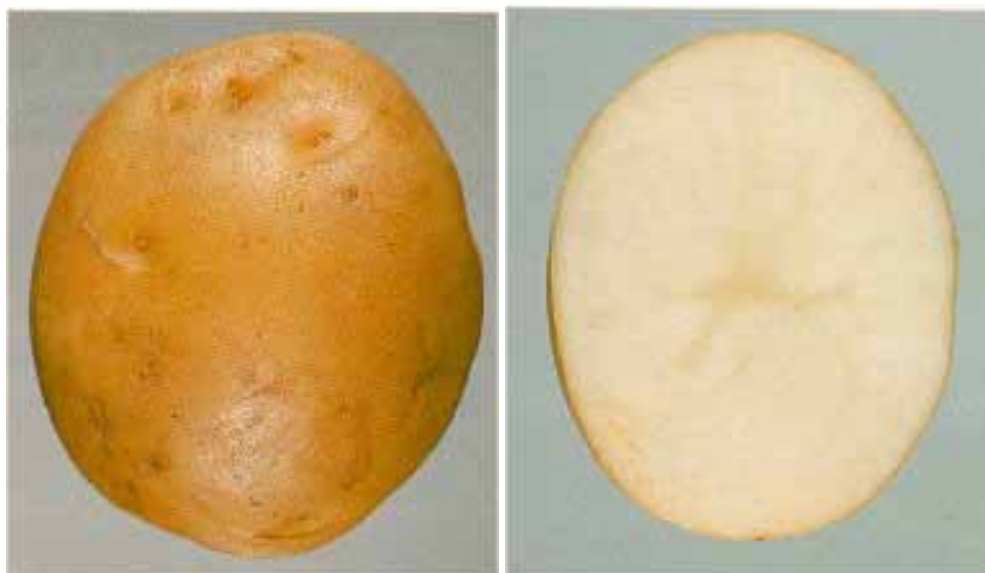
2.1.2 Opis uporabljenih sort krompirja

Za raziskavo smo izbrali sorti Désirée in Kennebec. Désirée je srednje pozna, nizozemska sorta, potrjena leta 1962 (Kus, 1994). V zadnjem času je ta v Sloveniji najbolj razširjena sorta. Je rodovitna in tvori večje število precej debelih in izenačenih gomoljev. Gomolji so podolgovato-ovalni, oči plitve, kožica gladka in rdeča, meso svetlorumeno, po kuhanju praviloma ne spremeni barve. Krompir te sorte je dokaj odporen proti poškodbam, ki jih povzročajo udarci. Kožica je obarvana rdeče zaradi flavonov in antocianov v peridermu in korteksu (Plestenjak, 1990; Kus, 1994).

Sorta Kennebec izhaja iz Združenih držav Amerike in je bila potrjena leta 1948 (Kus, 1994). Je srednje pozna, zelo rodovitna sorta, ki naredi manjše število debelih, precej izenačenih gomoljev. Gomolji so okroglo-ovalni, oči plitve, kožica gladka in svetlorumena, meso pa belo. Za razliko od prejšnje je ta sorta bolj dovzetna za poškodbe zaradi udarcev, obenem pa je odpornejša proti suši in visokim temperaturam. Sorta Kennebec je primerna za pridelovanje poznega jedilnega krompirja in za predelavo v čips (Kus, 1994).



Slika 2: Gomolj sorte Désirée: a) celoten gomolj (levo) in b) vzdolžni prerez gomolja (desno) (CFIA, 2004 a)



Slika 3: Gomolj sorte Kennebec a) celoten gomolj (levo) ter b) vzdolžni prerez gomolja sorte Kennebec (desno) (CFIA, 2004 b)

2.1.3 Kemijska sestava krompirjevega gomolja

Kemijska sestava krompirja (preglednica 1) je odvisna od številnih dejavnikov: sorte krompirja, kemijske sestave tal, načina obdelave in gnojenja, načina skladiščenja itd.

Preglednica 1: Kemijska sestava krompirjevega gomolja (Souci in sod., 2000)

Sestavine v 100 g krompirja	Vsebnost (g)		Vsebnost-povprečne vrednosti (g)
	od	do	
voda	73,8	81,8	77,8
skupni dušik	-	-	0,33
ogljikovi hidrati	-	-	14,8
proteini	1,42	2,93	2,04
vlakna	0,67	2,29	2,07
maščobe	0,04	0,17	0,11
minerali	0,60	1,30	1,02
organske kisline	-	-	0,61

Pomembnejši ogljikovi hidrati so: škrob 14,1 g, glukoza 240 mg, fruktoza 170 mg, saharoza 300 mg približne povprečne vrednosti v 100 g krompirja (Souci in sod., 2000). Čeprav ima krompir kot živilo mnogo dobrih lastnosti, moramo vendarle omeniti tudi nekaj njegovih pomanjkljivosti. Predvsem je voluminozno živilo, ki vsebuje povprečno skoraj 80 % vode, ima sorazmerno kratko življenjsko dobo in je zelo dovzetno za poškodbe. Krompirjevi gomolji so živi organizmi, ker je v njih veliko vode, zato so za skladiščenje zelo občutljivi. Gomolji dihajo in za življenje porabljajo hrano, zato se tudi z najskrbnejšim skladiščenjem ne moremo izogniti vsaj malenkostnim izgubam, ki znašajo 3-5 % gomoljev. Povprečno računamo, da izgubimo čez zimo okrog 10 % pridelka. Skladiščenje vpliva na sestavine krompirja. Že dolgo je znano, da količina monosaharidov in krajših oligosaharidov v krompirju narašča, če je skladiščen pri sorazmerno nizki temperaturi. Količina teh spojin, ki nastaja pri skladiščenju z nizko temperaturo, pa je poleg temperature odvisna tudi od sorte, zrelosti in stanja krompirja pred skladiščenjem. Hitro se dviga delež monosaharidov in krajših oligosaharidov pri temperaturi 1-2 °C, pri temperaturi 3-5 °C pa je sprememba zelo majhna. Z znižanjem skladiščne temperature vsebnost škroba pada. Pri temperaturi skladiščenja 1-3 °C se najbolj zmanjša delež škroba (Kus, 1994).

2.2 PORJAVENJE KROMPIRJA

Olupljen krompir na zraku zelo hitro potemni. Za spremembo so odgovorne fenolne spojine, ki jih krompir vsebuje in encim polifenol-oksidaza (PPO). Tudi tirozin, ki je aminokislina, je substrat za PPO in se nahaja v notranjem delu gomolja in predstavlja 0,1-0,3 % suhe mase krompirja (Souci in sod., 2000).

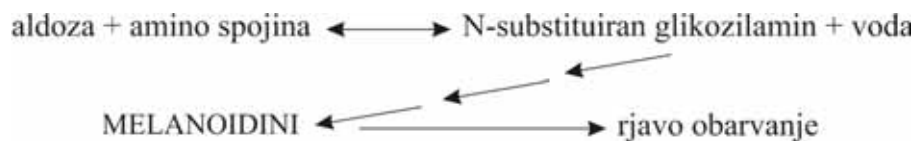
V nekaterih primerih (rozine, fermentirani listi čaja) je porjavenje živil zaželeno (Martinez in Whitaker, 1995). S tehnološkega vidika pa predstavlja porjavenje krompirja veliko težavo, saj le to negativno vpliva na njegovo kvaliteto. V splošnem lahko porjavenje razdelimo v neencimsko ter encimsko porjavenje.

Pri predelavi krompirja se srečamo s tremi tipi sprememb barve krompirja. To so:

- neencimsko porjavenje, ki je posledica Maillardove reakcije, to porjavenje je najpomembnejše pri sušenju in pečenju krompirja, kot tudi pri skladiščenju posušenih izdelkov,
- encimsko porjavenje je sprememba barve zaradi delovanja encimov in se pojavlja le v svežem, nekuhanem krompirju,
- potemnenje krompirja po kuhanju, ki ni sorodno encimskemu porjavenju, je rezultat medsebojnega učinkovanja železovih soli krompirja s klorogensko in kavno kislino s tem, da tvorijo komplekse, ki lažje oksidirajo s kisikom iz zraka v črne polimere (Smith, 1977).

2.2.1 Neencimsko porjavenje

Neencimsko porjavenje zelenjave je posledica nastanka temnih melanoidnih pigmentov, ki nastajajo v Maillardovi reakciji (slika 4) iz reducirajočih sladkorjev in amino skupin (največkrat od proteinov) (Labuza in Schmidl, 1986). Do nastanka rjavih pigmentov brez encimov lahko privedeta tudi razgradnja ogljikovih hidratov in razgradnja askorbinske kisline (Lee in Nagy, 1988). Zanimivo je, da lahko tudi neencimska oksidacija polifenolnih spojin privede do tvorbe rjavih pigmentov (Cilliers in Singleton, 1989).



Slika 4: Poenostavljen potek Maillardove reakcije - neencimsko porjavenje (Hodge, 1953; Sapers, 1993)

V diplomskem delu se v problematiko neencimskega porjavenja krompirjevih gomoljev ter porjavenja gomoljev po kuhanju nismo poglobljali.

2.2.2 Encimsko porjavenje

V krompirjevem gomolju pride do encimskega porjavenja zaradi oksidacije fenolnih spojin z encimi kot so 1,2-benzendiol:kisik-oksido-reduktaza (PPO) in peroksidaze (POD) (Hammer, 1993). Nekateri rezultati kažejo, da predstavlja ozko grlo pri encimskem porjavenju zadostna količina sintetiziranih polifenolov. Za ključni encim v sintezi fenolnih spojin smatrajo encim fenilalanin-deaminazo (PAL) (Hisaminato in sod., 2001).

2.2.2.1 Polifenol-oksidade

PPO so v rastlinah prvič odkrili leta 1895. V zdravih rastlinskih celicah je PPO fizično ločena od svojega substrata, ki je v vakuolah. PPO katalizira reakcije oksidacije fenolnih spojin *in vivo* v celicah po poškodbi le-teh. Po poškodbah se vsebina kloroplastov pomeša s citoplazmo in vsebino vakuol (Hind in sod., 1995). Po klasifikaciji IUB (International Union of Biochemistry) ločimo monofenol-monooksigenazo (EC 1.14.18.1) in katehol-oksidozazo (EC 1.10.3.1). Monofenol-monooksigenazo najdemo tudi pod trivialnimi imeni tirozinaza, fenolaza, fenol-oksidozaza, monofenol-oksidozaza in krezolaza, medtem ko za drugo, katehol-oksidozazo, najdemo še imena difenol-oksidozaza, *o*-difenolaza, fenolaza, polifenol-oksidozaza in tudi tirozinaza (Hammer, 1993).

PPO v prisotnosti atmosferskega kisika katalizirajo hidroksilacijo monofenolne spojine v *o*-difenole (monofenol-monooksigenaza) in nato oksidacijo teh v *o*-kinone (katehol-oksidadza) (Mc Evily in sod., 1992; Hammer, 1993). *o*-kinoni so zelo reaktivne spojine in zlahka reagirajo s sulfhidrilnimi, amino, indol in imidazolnimi skupinami iz drugih spojin. Posledično nastanejo rjavo obarvani polimerni produkti, ki so tudi vzrok za raziskovanje PPO v živilski industriji. Kinoni s svojo reaktivnostjo in protimikrobno aktivnostjo povečajo tudi odpornost rastlin na razne škodljivce in rastlinske patogene (Donko, 2001).

Na splošno PPO oksidirajo veliko različnih fenolnih spojin, med najpomembnejšimi najdemo katehine, estre cimetine kisline, 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) in aminokislino tirozin (Sapers, 1993). Preko šikimatne poti nastane v krompirju iz tirozina pigment dopakrom (Hammer, 1993; Murata in sod., 2004). Nastanek dopakroma lahko preprečimo z znižanjem pH vrednosti (pod optimalnim za encim), znižanjem temperature (vpliv na hitrost reakcije), anoksičnimi pogoji ali z dodatkom natrijevega benzoata (kompeticija med benzoatom in fenolnimi spojinami za encim) (Hammer, 1993).

Optimalni pH za delovanje PPO je v območju med 5 in 7. Za PPO je značilno, da imajo v aktivnem centru dva bakrova iona (Cu^{2+}). Ti dve mesti v encimu (CuA in CuB) imata zelo ohranjeno aminokislinsko zaporedje. Za rastlinske polifenol-oksidadze pa je značilna še tretja, s histidinom bogata ohranjena regija CuC (Martinez in Whitaker, 1995; Hammer, 1993). Encim je temperaturno labilen in ga lahko inhibiramo, razen s segrevanjem, tudi s kislinami, halidi, fenolnimi kislinami, sulfiti, kelatorji, reducenti oz. antioksidanti (npr. askorbinska kislina), cisteinom (Sapers, 1993; Hammer, 1993). PPO najdemo razen v rastlinah tudi v živalih in glivah. V rastlinah so ti encimi kodirani z jedrno DNA, so pa v plastidih. V plastidih se le-ti aktivirajo, med transportom po citoplazmi, pa so neaktivni. V starih tkivih, zrelih sadežih ali kadar pride do poškodb rastlinske celice pa so aktivne PPO prisotne tudi v citoplazmi (Hammer, 1993).

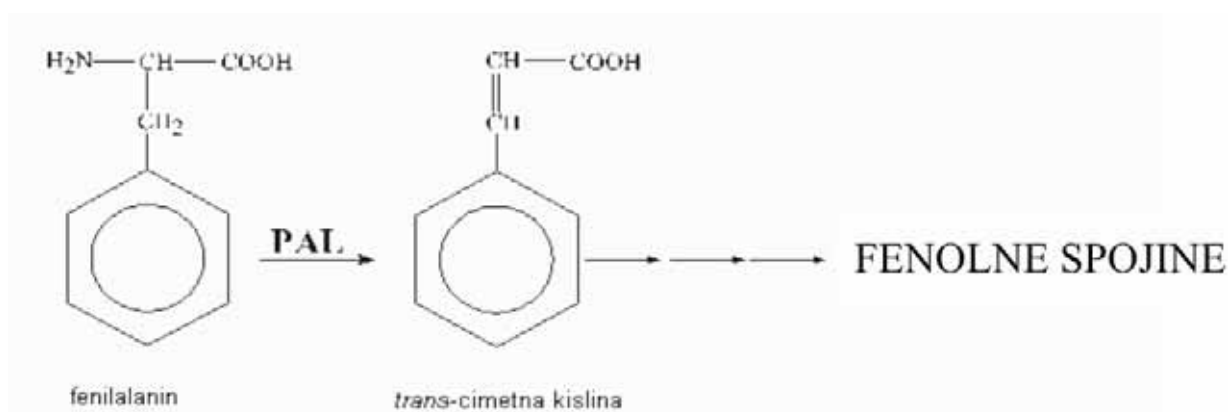
2.2.2.2 Peroksidaze

Peroksidaze (EC 1.11.1.7) so razširjene tako v živalskem kot v rastlinskem kraljestvu. Prištevamo jih v veliko družino oksidoreduktaz, ki s svojim delovanjem vplivajo na barvo,

aromo in prehransko vrednost surove in predelane hrane. Sodijo med encime, ki prav tako kot PPO oksidirajo fenolne spojine v kinone. Njihova oksidacijska sposobnost pa je povezana s prisotnostjo vodikovega peroksida (H_2O_2). V kombinaciji s PPO lahko deluje sinergistično in še dodatno doprinese k oksidaciji fenolnih spojin. Ob delovanju PPO se namreč sprošča H_2O_2 , ki je potreben za delovanje POD (Robards in sod.,1999). Produkti takih reakcij so pogosto obarvani, kar se s pridom uporablja za različne analizne metode. POD imajo lahko kot prostetično skupino hem, flavoprotein, ali selen vsebujočo podenoto (Hammer, 1993).

2.2.2.3 Fenilalanin-deaminaza

PAL je v vseh višjih rastlinah. Po IUB klasifikaciji imajo oznako EC 4.3.1.5. Encim katalizira prvo reakcijo sinteze fenolnih spojin. Z deaminacijo fenilalanina nastane *trans*-cimetna kislina. PAL tako omogoča nadaljnjo sintezo različnih fenilpropanoidnih oz. fenolnih metabolitov vključno s ferulno, *p*-kumarno in sinapinsko kislino, flavonoidi, tanini, antocianini in lignini (Su in Hsu, 2003; Herrig in sod., 2002; Martinez in Whitaker, 1995). Prostetična elektrofilna skupina v aktivnem mestu PAL je 3,5-dihidro-5-metilen-4H-imidazol-4-on in verjetno povzroči elektrofilni napad na aromatsko jedro v prvi stopnji reakcije (Rettig s sod., 2000).



Slika 5: Potek deaminacije fenilalanina, ki jo katalizira PAL (Heldt, 1997)

2.2.3 Fenolne spojine

V rastlinah najdemo veliko fenolnih spojin, ponavadi jih je okoli 1-2 %. Le te lahko vsebujejo eno ali več -OH skupin. Fenolne spojine so kemično zelo reaktivne snovi, so kisle in rade tvorijo tako inter- kot intramolekularne vezi ter se hitro oksidirajo. Encimi PPO v rastlinah katalizirajo nastanek *o*-kinonov in ti nato polimerizirajo v obarvane produkte flobafene. Običajno je taka polimerizacija nezaželjena, saj se lahko pojavi tako neprimerna barva, vonj, kakor tudi zmanjšanje hranilne vrednosti živila (Abram in Simčič, 1997).

Rastlinske fenolne spojine so pomembne tudi z ekonomskega stališča, saj prispevajo k okusu, vonju in barvi živil. Fenolnim spojinam pripisujejo veliko vlog, saj naj bi prispevale k zaščiti rastlin pred mehanskimi poškodbami, rastlinojedci, glivami, bakterijami in virusi, delujejo kot kemične signalne spojine pri cvetenju, oplojevanju in rastlinski simbiozi. Običajen odgovor rastline na stres je povečanje skupnih fenolnih spojin, posebno klorogenske kisline. Po poškodbi rastline pride do oksidacije že obstoječih fenolnih snovi, v kar je vključena PPO, tako nastali *o*-kinoni imajo tudi antimikrobno aktivnost, njihovi polimerizirani produkti pa lahko obarjajo proteine. Na mestu poškodbe rastline se začne tvoriti lignin, ki prepreči izgubljanje vode in ustvari fizično bariero, za nastanek so potrebne določene fenolne spojine. Fenoli v rastlini seveda delujejo tudi kot antioksidanti, ki organizem ščitijo pred reaktivnimi radikali (Shahidi in Naczk, 1995). Dnevno s hrano vnesemo v organizem do 1g fenolnih spojin, kar zelo verjetno vpliva na normalno delovanje organizma (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne spojine so razdeljene na več načinov. Najbolj enostavna je razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Abram, 2000):

- C₆: enostavni fenoli,
- C₆-C₁: fenolne kisline, običajno so polimerizirane (vanilinska, siringinska, galna kislina),
- C₆-C₂: fenilacetne kisline,
- C₆-C₃: hidroksicimetne kisline, fenilpropeni, kumarini, izokumarini, kromoni,
- C₆-C₄: naftokinoni,

- $C_6-C_1-C_6$: ksantoni,
- $C_6-C_2-C_6$: stilbeni, antrakinoni,
- $C_6-C_3-C_6$: flavonoidi,
- $(C_6-C_3)_2$: lignani, neolignani,
- $(C_6-C_3-C_6)_2$: biflavonoidi,
- $(C_6-C_3)_n$: lignini,
- $(C_6)_n$: melanini,
- $(C_6-C_3-C_6)_n$: kondenzirani tanini.

2.2.4 Antioksidanti

Antioksidanti so snovi, ki lahko zadržijo, zavrejo ali preprečijo nastanek žarkosti živil, kakor tudi ostala poslabšanja okusa zaradi oksidacije. Idealen tehnološki antioksidant mora biti varen za uporabo, biti mora brez neželenih okusov, vonjev in barve. Taka snov mora delovati v majhnih koncentracijah, vključevanje v živilo mora biti enostavno, prenesti mora toplotno obdelavo, delovati mora integralno v hrani in v telesu uživalca, seveda pa mora biti tudi cenovno dostopen, saj naj cena antioksidanta ne bi presegala 0,5 % vrednosti stroškov živila (Coppen, 1994). Biotska dostopnost različnih oblik antioksidantov je odvisna od njihove vključenosti v strukture (v celične stene in druge vlakninske strukture), od interakcij med snovmi (na primer med amilozo in nekaterimi sekundarnimi metaboliti rastlin), od topnosti v prebavnem traktu ter od prisotnosti, aktivnosti in zasedenosti prenosnih mehanizmov preko črevesne stene v krvni obtok. Na tej poti in tudi v krvnem serumu lahko potekajo kemijske reakcije. Z ugotavljanjem prisotnosti antioksidantov v krvnem serumu lahko ovrednotimo njihovo biotsko dostopnost. Tudi pri takem ugotavljanju pa je še neznano, v koliki meri, na kakšen način in s kolikšno zakasnitvijo se antioksidanti pojavljajo v celicah oziroma na posameznih mestih delovanja. Pojavljanje antioksidantov ali produktov njihove presnove v urinu je eden od znakov biotske dostopnosti (Kreft in sod., 2000).

Antioksidanti lahko delujejo na več načinov. Lahko lovijo (proste) radikale, vežejo kovinske ione v kelatne spojine in inhibirajo lipoksigenaze, ciklooksigenaze (Briviba in Sies, 1994) ali vežejo kisik (Shahidi in Naczk, 1995). Radikali ali kot jih zelo pogosto,

čeprav neustrezno, imenujemo prosti radikali, so atomi (samostojni ali v molekuli), ki imajo en elektron brez para in so zato zelo reaktivni. Antioksidanti ponavadi z lahkoto oddajo vodik prostim radikalom, ki se tako spremenijo v bolj stabilne in seveda manj reaktivne produkte. Na tak način oksidacijo zadržujejo, dokler se ne porabijo (Korošec, 2000; Salobir, 2000).

Glede na način delovanja razvrščamo antioksidante v dve skupini: primarne in sekundarne. Primarni antioksidanti so običajno donorji vodika prostim radikalom, pri čemer se sami pretvorijo v stabilen radikal in s tem prekinejo verižno reakcijo. Med primarne antioksidante spadajo: fenoli, tokoferoli, galna kislina in njeni derivati, flavonoidi (kvercetin, ramnetin, kamferol, rutin, kvercitrin, kavna kislina, karnozol, karnozolna kislina) in mnoge druge naravne spojine (Gordon, 1993).

Sekundarni antioksidanti omogočajo delovanje primarnim antioksidantom ali pa inhibirajo prooksidante. Sem spadajo fosfolipidi, ki sinergistično delujejo na tokoferole in citronsko kislino, ki tvori komplekse s kovinskimi ioni (Gordon, 1993). Njihova značilnost je, da reagirajo s kovinskimi ioni, ki so katalizatorji oksidacije, odvezemajo kisik iz medija, razgrajujejo hidroperokside do komponent, ki niso radikali, absorbirajo UV svetlobo in nenazadnje deaktivirajo aktivni kisik. Sekundarne antioksidante razvrščamo v tri podskupine:

- odjemalci kisika (askorbinska kislina, askorbil-palmitat, sulfiti, izovalerijanska kislina, flavonoidi, karotenoidi, polifenoli),
- tvorci kelatov (citronska kislina, estri citronske kisline, EDTA, polifosfati, vinska kislina, fitinska kislina, lecitin),
- drugi sekundarni antioksidanti (ekstrakti začimb, aminokisline in peptidi, flavonoidi, karotenoidi, ekstrakti čajev) (Madhavi in Salunkhe, 1995).

Za preučevanje vpliva antioksidantov na upočasnitev porjavenja krompirjevih gomoljev, smo uporabili sekundarne antioksidante :

- kalijev-*m*-bisulfit in askorbinska kislina sta lovilca kisika,
- citronsko kislino, ki spada v skupino kelatnih agensov,

- rožmarinov ekstrakt, ki je ekstrakt dišavnice in jo prištevamo med druge sekundarne antioksidante.

2.2.4.1 Kalijev-*m*-bisulfit

Prvo znano dodajanje sulfidov v hrano za preprečevanje neencimskega in encimskega porjavenja sega v antiko. Sulfidi lahko delujejo kot antimikrobno sredstvo, belilo in antioksidanti. Delujejo kot inhibitorji PPO, dodatno pa reagirajo z intermediati, ki so potrebni za tvorbo melaninov (Sapers, 1993). Ameriška agencija Food and Drug Administration (FDA) predlaga, da naj maksimalni ostanki sulfidov v suhem krompirju ne presegajo 500 ppm. Leta 1984 je FDA naročila preiskavo učinka sulfidov v prehrani človeka na njegovo zdravje, ki je pokazala da sulfidi niso teratogeni, mutageni in kancerogeni (Grotheer in sod., 2004). Sulfidi pa lahko pri nekaterih astmatikih izzovejo astmatske napade (Taylor in sod., 1986). Leta 1986 je FDA prepovedala uporabo sulfidov za sadje in zelenjavo, ki je namenjena surovemu uživanju. Pravilnik FDA iz leta 1988 določa, da morajo biti živila, ki vsebujejo več kot 10 ppm sulfidov, označena. V živilski industriji se zato išče alternativne snovi, ki bi preprečevale porjavenje. Zaradi večfunkcijskega delovanja sulfidov pa jim težko najdemo alternativno snov, ki bi njihovo delovanje lahko popolnoma nadomestila (Sapers, 1993).

2.2.4.2 Askorbinska kislina

Askorbinska kislina, poznana tudi kot vitamin C, je v vodi topna in je verjetno najboljša alternativa uporabi sulfidov. Spojina je zelo učinkovit inhibitor encimskega porjavenja, predvsem zato, ker reducira kinone, ki nastajajo zaradi delovanja PPO, preden se ti spremenijo v rjavo obarvane polimerne pigmente. Šele, ko se vsa askorbinska kislina oksidira v dehidroaskorbinsko kislino (DHAA), se lahko kinoni spet začnejo akumulirati in tako povzročati porjavenje. Dodatno lahko DHAA povzroči tudi neencimsko porjavenje. Askorbinska kislina lahko (v velikih koncentracijah) tudi direktno inhibira delovanje encima PPO (Sapers, 1993).

V splošnem je askorbinska kislina slabši inhibitor porjavenja kot sulfiti zato, ker so slednji bolj stabilni in boljše prodirajo v živilo. Za izboljšanje njenega učinkovanja uporabljamo različne derivate askorbinske kisline (2-fosfate askorbinske kisline, askorbil palmitat ter druge estre askorbinske kisline in maščobnih kislin), katerih uporaba pa z izjemo askorbil palmitata, še ni potrjena s strani FDA. Delovanje inhibitorjev lahko povečamo tudi s podali nadtlakom, kar izboljša njihovo penetracijo v živilo (Sapers, 1993). Za naše poskuse smo pripravili raztopino 0,5 g/l askorbinske kisline, ker se takšna koncentracija antioksidanta uporablja pri dodajanju sadnim sokovom.

2.2.4.3 Citronska kislina

Citronska kislina je, tako kot askorbinska, topna v vodi. Deluje zaviralno na encimsko porjavenje krompirjevih gomoljev, zaradi kelatnih lastnosti. Ta kislina veže Cu^{2+} ion iz aktivnega mesta PPO, kakor tudi zniža pH, ki za delovanje PPO ni optimalen (Santerre in sod., 1988; Sapers, 1993). Citronska kislina se med drugim uporablja kot dodatek za zaščito instant krompirja pred spremembo senzoričnih lastnosti, ki so lahko posledica oksidacijskih procesov (Cooperative extension, 2004).

2.2.4.4 Rožmarinov ekstrakt

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) je zimzelen sredozemski grm, ki najbolje uspeva na kamnitih tleh z veliko kalcija in je najpomembnejši vir za pridobivanje naravnih izvlečkov antioksidantov. Iz rožmarinovega olja odstranijo eterična olja zaradi vonja in okusa. Ekstrakt olja je v maščobah topen antioksidant, ki ima veliko aktivnih spojin in je zato učinkovit že v majhnih koncentracijah, poleg tega pa ne spreminja senzoričnih lastnosti ter je brez vonja in okusa (Krajnc, 2003).

Ekstrakt rožmarina prištevamo med naravne antioksidante, katerih uporaba ni omejena s predpisi (deklariramo jih kot začimbe), poleg tega so sprejemljivejši s strani potrošnika. Glavne spojine, ki sestavljajo ekstrakt so fenolni diterpeni, fenolne kisline in flavonoidi. Aktivne spojine, ki so jim dokazali antioksidativno učinkovitost so fenolnega tipa. Glavna fenolna komponenta v svežem rožmarinu je karnozolna kislina, ki se zaradi *o*-difenolnih

-OH skupin zlahka oksidira (Krajnc, 2003; Masuda in sod., 2001). Izvlečki rožmarina se dodajajo v izdelke prehrabene, kozmetične in farmacevtske industrije.

2.3. NAMEN DELA

V diplomski nalogi smo preučevali encimsko porjavenje rezin krompirja, do katerega prihaja po mehanskih poškodbah, zaradi oksidacije fenololnih spojin v kinone, ki se nato vežejo v različne produkte in dajo značilno temnejšo barvo. Za encimsko porjavenje so najbolj odgovorne PPO. Hitrost porjavenja smo spremljali na rezinah dveh sort krompirja, Kennebec in Désirée, z določanjem specifične aktivnosti treh encimov: PPO, POD in PAL. Ugotavljali smo vpliv uporabe različnih antioksidantov (askorbinska kislina, citronska kislina, kalijev metabisulfit in ekstrakt rožmarina), vpliv prisotnosti kisika ter načinov hranjenja krompirja na hitrost porjavenja in aktivnosti izbranih encimov. Za eksperimente z antioksidanti smo uporabili samo gomolje sorte Kennebec, za vpliv načina hranjenja rezin pa obe sorti, tako Kennebec kot Désirée. Prvi smo uporabili vodotopni ekstrakt kot vir antioksidantov za te poskuse in njegov učinek primerjali z nekaterimi znanimi antioksidanti. Stopnjo porjavenja krompirjevih rezin smo določali tudi s kromometrom.

2.4. DELOVNA HIPOTEZA

Pri pregledu dosedaj objavljenih rezultatov raziskav encimskega porjavenja smo pričakovali, da bodo vsi antioksidanti zavrli encimsko porjavenje. Uporabili smo takšne koncentracije antioksidantov, kot se že uporabljajo v živilski industriji pri predelavi sokov in zelenjave. Velika koncentracija kisika v atmosferi naj bi povečala aktivnost PPO, ne bi pa imela učinka na POD ali PAL in zaradi tega tudi nismo pričakovali, da bi se povečala biosinteza fenolnih spojin v rezinah.

3 MATERIALI IN METODE

Krompir, ki smo ga uporabljali v naših raziskavah, smo dobili januarja 2004 od podjetja Engrotuš Celje in je bil do uporabe skladiščen na Katedri za tehnologijo rastlinskih živil Oddelka za živilstvo v hladilnici pri 4 °C.

Vse spektrofotometrične meritve smo opravili na spektrofotometru z diodno matriko Hewlett-Packard, model HP-8453.

3.1 KROMPIRJEV EKSTRAKT

3.1.1 Priprava ekstrakta

Vzeli smo tri gomolje krompirja bele sorte Kennebec, jih umili, olupili ter narezali na rezine premera 4 cm in debeline 1 cm in jih takoj potopili v raztopino antioksidanta za 20 minut (v poizkusih smo uporabili štiri različne raztopine antioksidantov). Kontrolni vzorec rezin smo pustili netretiran na zraku. Po dvajsetih minutah smo rezine krompirja vzeli iz raztopine, jih narahlo osušili s papirnato brisačo ter iz polovice rezin pripravili homogenizat, ki smo ga takoj uporabili za določanje encimskih aktivnosti. Tako pripravljen homogenizat smo v nalogi označevali s časom 0. Ostalo polovico rezin pa smo pustili na zraku 2,5 ure in po tem času smo po enakem postopku pripravili homogenizat in določili aktivnosti (čas 2,5 ure). Prav tako smo pripravili homogenizat tudi iz netretiranega vzorca. Homogenizat pa smo v vseh primerih pripravili po sledečem postopku: Rezine smo narezali na koščke in k 15 g koščkov dodali 30 ml pufra I. Nato smo krompir homogenizirali s sekljalnikom eno minuto pri temperaturi 4 °C, homogenizat prefiltrirali preko gaze in filtrat centrifugirali v centrifugi Janetzki 10 min pri 10000 min⁻¹ in pri temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant razredčili s pufrom II v razmerju 1:1.

3.1.2 Priprava pufra I in II

Pufer I je bil pripravljen iz 0,1 M raztopine Na₂HPO₄ in 0,1 M raztopine NaF. Pufer je imel pH 6,8.

Pufer II je bila 0,1 M raztopina Na_2HPO_4 s pH 6,8.

3.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

3.2.1 Princip

Koncentracijo beljakovin smo določali z metodo po Bradfordu (Bradford, 1976). Metoda temelji na reakciji beljakovin z barvilom Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD). Pri tej reakciji nastane obarvan produkt, ki ima absorpcijski maksimum pri 595 nm (Bradford, 1976). Za standard uporabimo tak protein, ki da čim bolj podobno barvo z omenjenim barvilom. Največkrat pa uporabimo goveji serumski albumin. Koncentracijo proučevanega proteina odčitamo iz umeritvene krivulje narejene iz raztopin govejega serumskega albumina, pri čemer je absorbanca obarvane raztopine proporcionalna koncentraciji beljakovin v vzorcu.

REAGENTI:

- Coomassie Brilliant Blue (CBB) reagent (Bio-Rad, Nemčija),
- goveji serumski albumin (Sigma, GmbH., Nemčija),
- 100 mM Tris-HCl pufer, pH 7,0.

3.2.2 Izvedba

Uporabili smo BIO-RAD-ovo standardno metodo za določanje proteinov v območju koncentracije od 10-100 μg proteinov. Metodo smo le toliko spremenili, da smo razredčili BIO-RAD-ovo barvilo v razmerju 1:4 z destilirano vodo in ga takoj filtrirali skozi Whatmanov N^o1 filter.

Najprej smo pripravili izhodno raztopino govejega albumina (BSA), ki je vsebovala 1 mg BSA/ ml. Nato smo raztopino razredčili tako, da smo dobili v vzorcih od 10 do 100 μg BSA (preglednica 2). Standardni raztopini smo dodali po 5 ml 1:4 razredčenega in

prefiltriranega BIO-RAD barvila, dobro premešali in po 10 minutah izmerili absorbanco pri 595 nm. Meritve smo izvedli v treh paralelkah.

Za določanje proteinov v ekstraktu smo vzeli 50 μ l ekstrakta in 50 μ l Tris-HCl, pH 7,0 pufra, temu smo dodali 5 ml 1:4 razredčenega in prefiltriranega BIO-RAD barvila in vse dobro premešali. Vzorce smo pripravili v dveh paralelkah. Slep vzorec smo pripravili tako, da smo 100 μ l Tris-HCl pufra, pH 7,0, dodali 5 ml 1:4 razredčenega in prefiltriranega BIO-RAD barvila. Po desetih minutah smo vzorce ponovno premešali, prelili v plastično kiveto in izmerili absorbanco pri 595 nm.

Preglednica 2: Priprava vzorcev za umeritveno krivuljo za določanje koncentracije proteinov

	V_{BSA} (μ l)	m_{BSA} (μ g)	V_{pufra} (μ l)	$V_{BIO-RAD}$ barvilo razredčeno in prefiltrirano (ml)
1	10	10	90	5
2	20	20	80	5
3	40	40	60	5
4	50	50	50	5
5	70	70	30	5
6	90	90	10	5
7	100	100	0	5

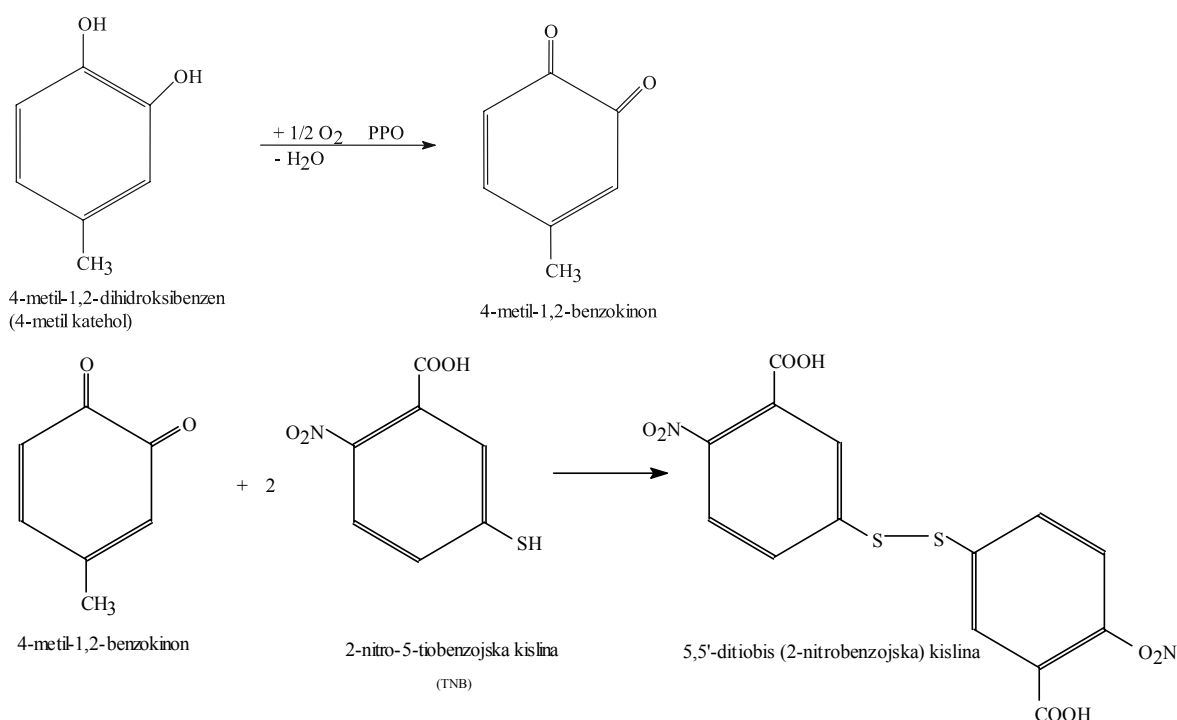
3.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI ENCIMOV IN SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

V supernatantu dobljenem po centrifugiranju krompirjevega ekstrakta smo določali tudi aktivnost naslednjih encimov: PPO, POD, PAL ter koncentracijo fenolnih spojin (Fukumoto in sod., 2002).

3.3.1 Določanje PPO aktivnosti

3.3.1.1 Princip

PPO katalizira reakcijo, ki je prikazana na sliki 6. Pod vplivom PPO in kisika se substrat 4-metilcatehol (4-metil-1,2-dihidroksibenzen) oksidira v 4-metil-1,2-benzokinon (Esterbauer in sod., 1977). Nastali produkt oksidira 2-nitro-5-tiobenzojsko kislino (TNB) v 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojsko) kislino, zaradi česar pride do prehoda iz intenzivno rumene barve raztopine v brezbarvno. Absorbanco reakcijske zmesi smo spremljali 3 minute pri 412 nm (A_{412}) vsake pol sekunde.



Slika 6: Potek reakcije, ki jo katalizira (PPO) in poteka pri določanju njene aktivnosti (Esterbauer in sod., 1977)

Delovanje peroksidaze v vzorcih smo preprečili z dodatkom katalaze v raztopino substrata, zaradi česar se je razgradil ves vodikov peroksid. Tako smo spremembo v razbarvanju raztopine substrata lahko pripisali le katalitski aktivnosti PPO. Dodali smo toliko raztopine katalaze, da je bila končna aktivnost tega encima v kivetu 244 U/ml. Iz naklona tangente na najstrmejši del krivulje odvisnosti absorbance reakcijske zmesi od časa reakcije smo med 80 in 110 s določili k in izračunali specifično aktivnost PPO kot spremembo absorbance raztopine na časovno enoto (s) in maso proteinov v reakcijski mešanici ($\Delta A / (s \times \text{mg proteina})$).

REAGENTI:

- 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojska) kislina (Sigma, Nemčija),
- natrijev borohidrid, NaBH₄ (Sigma, Nemčija),
- katalaza z aktivnostjo 8000 U/ml (Sigma, Nemčija),
- 4- metilkatehol (Sigma, Nemčija),
- Tris-HCl (Sigma, Nemčija) pufer, pH 7,0 (12,114 g Tris-HCl in destilirana voda do 1000 ml).

3.3.1.2 Priprava raztopine TNB

V 10 ml merilno bučko smo zatehtali 30 mg NaHB₄ ter 19 mg 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojske kisline) in dodali destilirano vodo do oznake. Po 1 uri mešanja se je disulfidna spojina kvantitativno reducirala v intenzivno rumeno obarvani vodotopni tiol (2-nitro-5-tiobenzojsko kislino) ali krajše TNB in to raztopino smo uporabili za določanje PPO aktivnosti.

3.3.1.3 Raztopina substrata za določanje PPO aktivnosti

V merilno bučko smo pipetirali 789 µl katalaze (8000 U/ml), 269 µl raztopine TNB, 6,4 mg 4-metilkatehola in vse skupaj razredčili do 25 ml s 100 mM Tris-HCl pufrom pH 7.

Tako pripravljeno raztopino substrata za določanje aktivnosti PPO smo lahko uporabljali le 20 minut. Začetna absorbanca raztopine substata je bila običajno okrog 1,7, ko pa je padla pod 0,8, smo pripravili svežo raztopino.

3.3.1.4 Izvedba

Supernatant krompirjevega ekstrakta, ki smo ga pripravili po metodi 3.1.1 smo še razredčili v razmerju 1:4 s 100 mM raztopino Tris-HCl pufera, pH 7,0. Polifenol-oksidadno aktivnost posameznega ekstrakta smo določali v treh paralelkah. V kiveto smo pipetirali 2,9 ml substrata in po 60 s dodali 0,1 ml razredčenega supernatanta krompirjevega ekstrakta, dobro premešali s parafilmom zaprto kiveto in jo vstavili nazaj v

spektrofotometer. Encimsko reakcijo smo pustili teči 3 min pri 25 °C. Absorbanco reakcijske zmesi je vsake pol sekunde avtomatsko zabeležil program kinetika encimske reakcije v spektrofotometru Hewlett-Packard HP-8453. Tako smo dobili krivuljo odvisnosti absorbance reakcijske zmesi od časa. Za slepi vzorec smo vzeli naklon v intervalu 20-40 s. V vzorcih smo aktivnost PPO določili z določitvijo naklona v najstrmejšem delu krivulje v intervalu 80-110 s. Specifično aktivnost encima PPO smo izračunali s

$$((k_{sl}-k_{vz})\times 5\times 2) / (c_{prot}\times 0,1)$$

in jo izrazili kot $\Delta A \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

3.3.2 Določanje POD aktivnosti

3.3.2.1 Princip

Določanje POD aktivnosti temelji na katalizi oksidacije (slika 7) fenolnega substrata (gvajakola) v prisotnosti vodikovega peroksida (H_2O_2) (Stout in sod.,1996). Zaradi oksidacije nastane temno obarvan produkt, preko katerega smo z merjenjem absorbance pri 470 nm (A_{470}) določili aktivnost POD.

REAGENTI:

- gvajakol (Sigma, Nemčija),
- vodikov peroksid (Merck, Nemčija),
- Tris-HCl pufer, pH 7,0 (12,114 g Tris-HCl in destilirana voda do 1000 ml) (Sigma, Nemčija).

3.3.2.2 Raztopina substrata

V merilno bučko smo dodali 29 μl gvajakola, 117 μl 30 % raztopine vodikovega peroksida in s 100 mM Tris-HCl pufrom pH 7,0 razredčili raztopino do 50 ml.

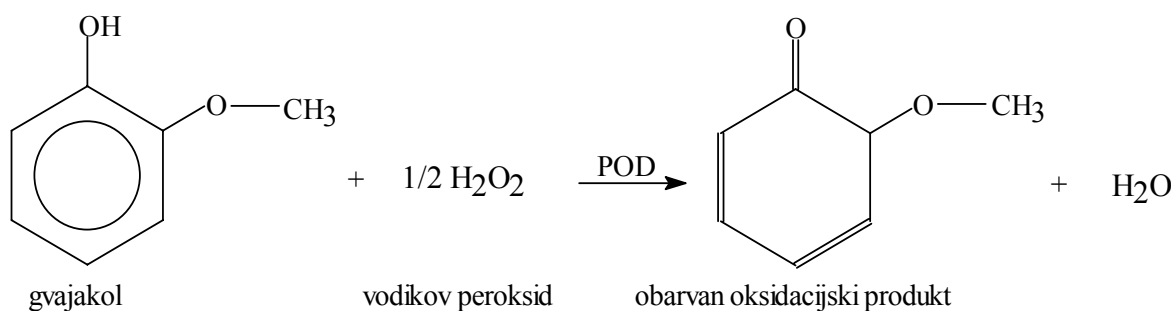
Raztopina substrata za določanje aktivnosti POD aktivnosti je bolj stabilna od raztopine substrata za določanje PPO aktivnosti in smo jo zato lahko uporabljali dalj časa (en dan).

3.3.2.3 Izvedba

Supernatant krompirjevega ekstrakta, ki smo ga pripravili po metodi 3.1.1 smo še razredčili v razmerju 1:4 s 100 mM raztopino Tris-HCl pufra, pH 7,0. Peroksidazno aktivnost smo določali v treh paralelkah. V kiveto smo pipetirali 2,9 ml raztopine substrata in po 60 s dodali 0,1 ml razredčenega supernatanta krompirjevega ekstrakta, dobro premešali s parafilmom zaprto kiveto in jo vstavili nazaj v spektrofotometer. Encimsko reakcijo smo pustili teči 3 min pri 25 °C. Absorbanco reakcijske zmesi je vsake pol sekunde avtomatsko zabeležil program kinetika encimske reakcije v spektrofotometru Hewlett-Packard HP-8453. Tako smo dobili krivuljo odvisnosti absorbance reakcijske zmesi od časa. Za slepi vzorec smo vzeli naklon v intervalu 20-40 s. V vzorcih smo aktivnost POD določili z določitvijo naklona v najstrmejšem delu krivulje v intervalu 80-110 s. Specifično aktivnost encima smo izračunali kot

$$((k_{vz}-k_{sl}) \times 5 \times 2) / (c_{prot} \times 0,1)$$

in jo izrazili kot $\Delta A \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.



Slika 7: Potek reakcije za določanje aktivnosti POD z gvajakolom (Stout in sod., 1996)

3.3.3 Določanje PAL aktivnosti

3.3.3.1 Princip

Fenilalanin je aromatska aminokislina, iz katere nastajajo po številnih reakcijah fenolne spojine. Prvo reakcijo, v kateri nastane iz fenilalanina *trans*-cinamat, katalizira encim fenilalanin-deaminaza (slika 5). Aktivnost PAL smo določili z merjenjem absorbance nastalega produkta pri valovni dolžini 295 nm (A_{295}).

REAGENTI:

- fenilalanin,
- natrijev borohidrid, NaBH₄ (Sigma, Nemčija),
- Tris-HCl pufer, pH 7,0 (12,114 g Tris-HCl in destilirana voda do 1000 ml) (Sigma, Nemčija).

3.3.3.2 Izvedba

Supernatant krompirjevega ekstrakta, ki smo ga pripravili po metodi 3.1.1 smo še razredčili v razmerju 1:4 s 100 mM raztopino Tris-HCl pufera, pH 7,0. Reakcijska zmes je vsebovala 1,5 ml tako razredčenega supernatanta krompirjevega ekstrakta in 1,5 ml 20 mM raztopine fenilalanina v 50 mM boratnem pufru, pH 8,5. Encimsko aktivnost smo določali v treh paralelkah. Meritev smo izvedli pri 40 °C, trajala pa je 800 s. Absorbanco reakcijske zmesi je vsako sekundo avtomatsko zabeležil program kinetika encimske reakcije v spektrofotometru Hewlett-Packard HP-8453. Prvih 200 s je bilo namenjenih vzpostavitvi temperature pripravljene mešanice ter za določitev naklona za slepi vzorec. Iz absorbanc med 400 in 600 s smo določili naklon, iz katerega smo lahko izračunali specifično aktivnost PAL kot

$$((k_{vz}-k_{sl}) \times 5 \times 2) / (c_{prot} \times 1,5)$$

in jo izrazili kot $\Delta A \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteina.

3.3.3.3 Priprava raztopine substrata

Za 50 ml 20 mM raztopine fenilalanina smo raztopili 0,165 g fenilalanina v 50 mM raztopini boratnega pufera, pH 8,5.

Priprava boratnega puфра: za 50 mM raztopino boratnega puфра smo v destilirani vodi raztopili 3,09 g Na-borata, pH uravnali z raztopino NaOH na 8,5 ter nato še razredčili do 1 l z destilirano vodo.

3.3.4 Skupne fenolne spojine

Določitev skupnih fenolnih spojin temelji na spektrofotometrični metodi (Waterman in Mole, 1994) z uporabo Folin-Ciocalteau-jevega (F-C) reagenta. V alkalni raztopini se fenolne spojine oksidirajo s F-C reagentom v modro obarvane spojine. Absorbanco obarvane raztopine smo merili pri valovni dolžini 746 nm (A_{746}).

Skupne fenolne spojine smo izrazili s koncentracijo klorogenske kisline (KK). Zato smo za pripravo umeritvene krivulje uporabili to kislino.

REAGENTI:

- Folin-Ciocalteau-jev reagent (Sigma, Nemčija),
- Na_2CO_3 , 20 % raztopina,
- klorogenska kislina ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$, $M_w=354,3$ g/mol) (Sigma, Nemčija),
- destilirana voda.

3.3.4.1 Umeritvena krivulja

3,54 mg klorogenske kisline (molska masa klorogenske kisline je 354,3 g/mol) smo raztopili v 100 ml 10 % metanola (v/v). Iz te raztopine smo pripravili standardne raztopine, ki so vsebovale od 0-250 μl klorogenske kisline. Vsem standardnim raztopinam smo dodali destilirano vodo do končnega volumna 725 μl , pemešali in dodali 125 μl razredčenega F-C reagenta (1:2), ter po 5 minutah še 125 μl 20 % raztopine Na_2CO_3 . Koncentracija klorogenske kisline v tako pripravljenih mešanicah je bila v območju od 2,6 do 26 μM (preglednica 3). Raztopine smo dobro premešali in pustili stati 60 minut. Vse meritve za umeritveno krivuljo smo izvedli v treh paralelkah. Absorbanco obarvanih raztopin smo merili pri 746 nm. Slep vzorec smo pripravili tako, da smo namesto vzorca dodali le destilirano vodo.

Preglednica 3: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino za določanje skupnih fenolnih spojin

volumen _{KK} (μ l)	volumen H ₂ O (μ l)	volumen 20% Na ₂ CO ₃ (μ l)	volumen 1:2 razredčenega F-C reagenta (μ l)	c _{KK} (μ M)
250	475	125	125	26,1
225	500	125	125	23,5
200	525	125	125	20,8
175	550	125	125	18,2
150	575	125	125	15,6
125	600	125	125	13,0
100	625	125	125	10,4
75	650	125	125	7,82
50	675	125	125	5,31
25	700	125	125	2,61

3.3.4.2 Določanje skupnih fenolnih spojin

50 μ l supernatanta krompirjevega ekstrakta pripravljenega z metodo 3.1.1 smo razredčili z destilirano vodo na 725 μ l, premešali in dodali 125 μ l 3x razredčenega F-C reagenta. Spet hitro premešali in po 5 minutah dodali še 125 μ l 20 % reztopine Na₂CO₃. Reakcijsko zmes smo dobro premešali in pustili stati na sobni temperaturi 60 minut. Za vsak vzorec smo pripravili in izmerili tri paralelke in iz njih izračunali povprečno absorbanco. Iz dobljene povprečne absorbance obarvanih raztopin pri 746 nm smo s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo skupnih fenolnih spojin. Vsebnost fenolnih spojin smo izrazili kot množino (mmol) klorogenske kisline na 100 g krompirja in kot maso (mg) klorogenske kisline na maso (mg) proteinov (preglednica 6).

3.4 MERJENJE BARVE KROMPIRJEVIH REZIN

3.4.1 Princip

Za merjenje barve krompirjevih rezin smo uporabili kromometer Minolta CR-20b. Merilni sistem temelji na CIE (Commission Internationale l'Eclairage) standardu, ki vključuje 3 parametre; L, a in b. Sistem vsako barvo zaznava kot kombinacijo modre, zelene, rumene

in rdeče barve. Instrument osvetli merjeni objekt z belo svetlobo. Odbito barvo vzorca s senzorji razdeli na tri vrednosti, ki jih lahko predstavimo v tridimenzionalnem koordinatnem sistemu (slika 8). Parameter a določa razpon barve od zelene do rdeče, parameter b od modre do rumene, parameter L pa opiše temnost oz. intenziteto odbite svetlobe (Simčič, 1995).

Na rezinah smo spremljali spremembo barve 35 minut. Pri ovrednotenju spremembe barve smo se zaradi lažje primerljivosti ter ovrednotenja rezultatov osredotočili le na parameter L, ki določa svetlost oz. temnost krompirjeve rezine. Rezine smo premazali z raztopino substrata 3, 4- dihidroksifenilalanina (DOPA), zato da smo proces encimskega porjavenja lahko hitreje spremljali.

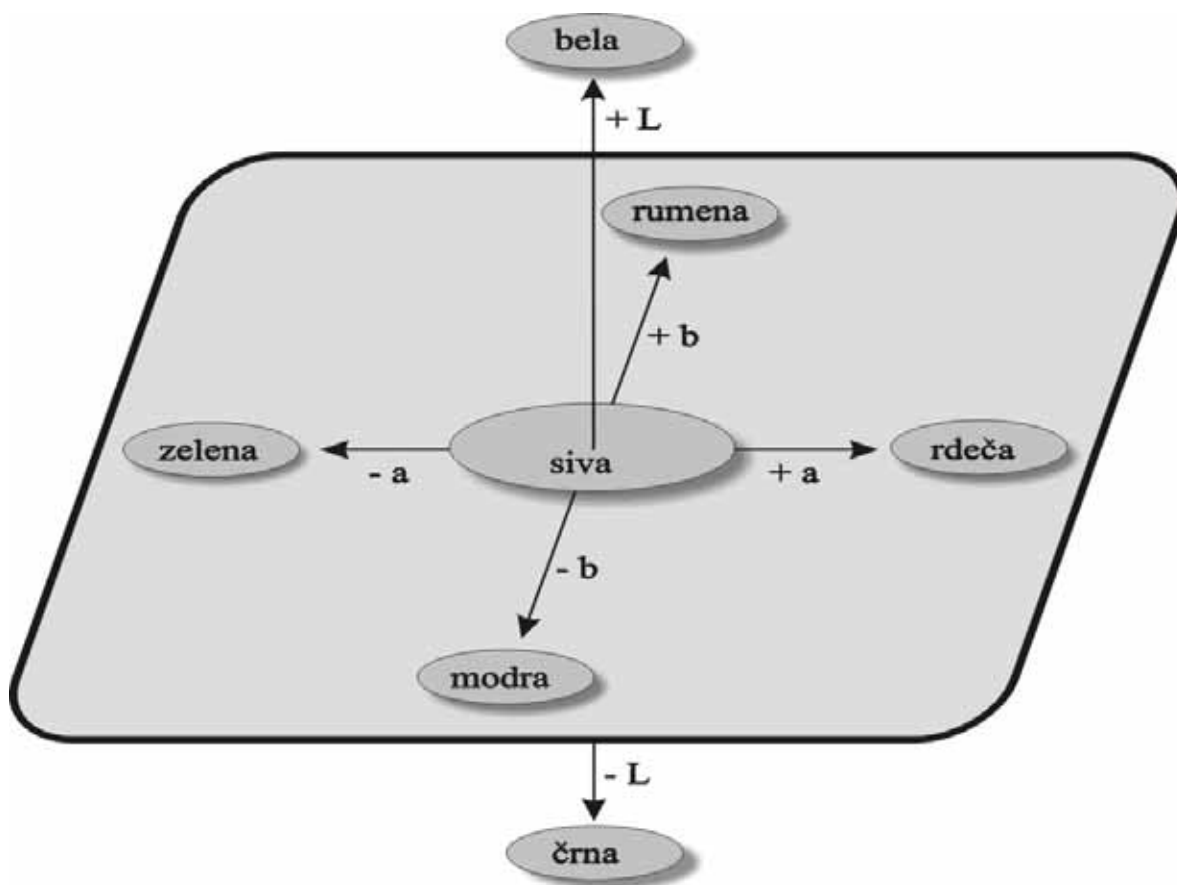
3.4.2 Izvedba

Dva gomolja krompirja smo umili, olupili, vzdolžno prerezali in jih potopili v različne raztopine antioksidantov (netretiran vzorec smo pustili na zraku). Po 20 minutah smo jih vzeli iz raztopin, na hitro osušili s papirnato brisačo. Rezine smo na tanko premazali z raztopino DOPA, koncentracije 2,67 mg/ml. Barvo smo merili na sredini rezine v treh točkah. Točke smo izbrali ob žilah in stran od zunanjih robov, da je bila struktura in barva čimbolj enotna. Spremembe barve smo spremljali 35 minut po 5 minutnih intervalih.

3.5 PREPREČITEV PORJAVENJA

3.5.1 S pomočjo antioksidantov

Bele gomolje krompirja sorte Kennebec smo oprali, olupili ter narezali na rezine premera približno 4 cm in debeline 1 cm. Več rezin smo nato potopili v različne raztopine za preprečitev porjavenja, kontrolni vzorec rezin pa smo netretiran pustili na zraku. Rezine smo v raztopinah pustili 20 minut, jih nato osušili s papirnato brisačo ter iz polovice rezin pripravili homogenizat, ki smo ga takoj uporabili za določanje encimskih aktivnosti (čas 0). Ostalo polovico rezin pa smo pustili na zraku 2,5 ure in po tem času smo po enakem postopku pripravili homogenizat in določili aktivnosti (čas po 2,5 urah).



Slika 8: Grafični prikaz vrednosti posameznih parametrov pri kromametri (sistem CIE 1976) (Plestenjak 1990; Simčič 1995)

3.5.2 Vpliv načina pakiranja

Vzporedno smo bele sorte gomoljev krompirja Kennebec in rdeče sorte gomoljev Désirée oprali, olupili ter narezali na približno 4 cm rezine, debeline 1 cm in shranili vzorce v vrečke iz troslojnega laminata z aluminjasto folijo PE/AI/PET (Amba d.o.o., Ljubljana) v normalni ter kisikovi atmosferi v hladilniku pri temperaturi 4 °C (Kaaber in sod., 2002; Marri in sod., 2003). Vrečke smo zaprli po postopku termičnega lepljenja z varilnim strojem VIRO (Pakirni stroji, Vrhnika) (Plestenjak, 1990).

Iz vrečk, ki smo jih hranili na 4 °C, smo po 3 ter 7 dnevih vzeli rezine in pripravili ekstrakte po metodi 3.1.1 ter le tem določili PPO, POD, PAL aktivnost in skupne fenole.

Uporabili smo naslednje raztopine antioksidantov:

- raztopina askorbinske kisline (Kemika, Zagreb) (0,5 g/l),
- raztopina citronske kisline (Merck, Nemčija) (2 g/l),
- K-metabisulfit (Kemika, Zagreb) (0,5 %),
- vodotopni ekstrakt rožmarina (Vitiva, Markovci) (15 g/l).

4 REZULTATI

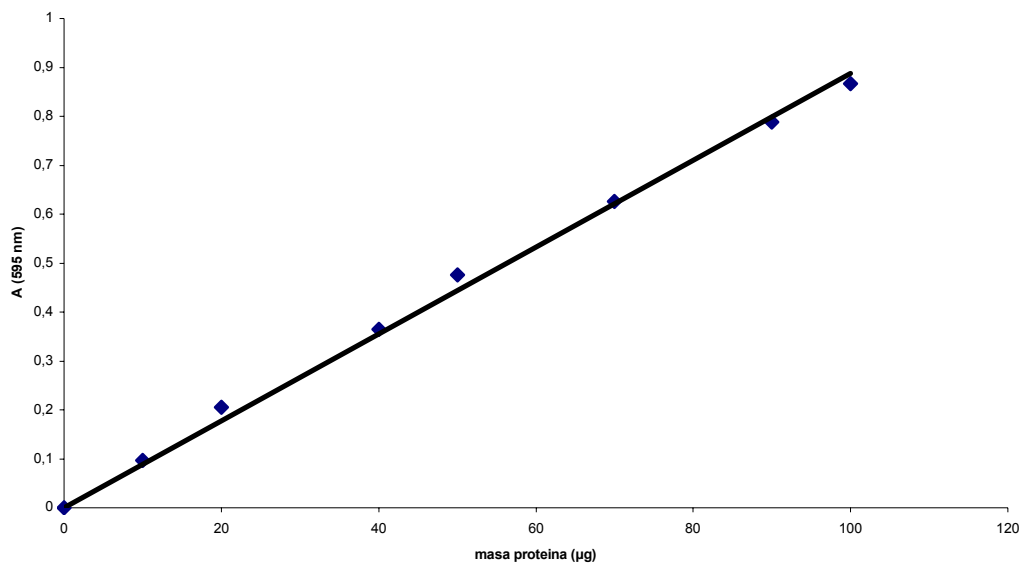
Z izbranimi sortama (Kennebec in Désirée) krompirja smo na rezinah preučevali vpliv različnih antioksidantov, prisotnosti kisika in načina hranjenja gomoljev krompirja v različnih atmosferah na hitrost encimskega porjavenja.

Kadar smo spremljali vpliv antioksidantov in prisotnosti kisika, smo iz rezin gomoljev sorte Kennebec pripravili homogenizat in po centrifugiranju dobljeni supernatant uporabili za določanje proteinov in aktivnosti nekaterih encimov, ki so ali vključeni v encimsko porjavenje (PPO in POD) ali pa so ključni za nastanek fenolnih spojin (PAL).

Pri ugotavljanju vpliva načina hranjenja krompirjevih rezin (v hladilniku pri 4 °C, v kisikovi atmosferi in na zraku) na hitrost encimskega porjavenja, smo uporabili krompirjeve rezine gomoljev bele sorte Kennebec in rdeče sorte Désirée. Iz rezin gomoljev smo na enak način pripravili supernatant in ga uporabili za določanje proteinov in aktivnosti encimov PPO, POD in PAL.

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V VZORCU

Koncentracijo proteinov smo določali z metodo po Bradfordu. Pri tej reakciji nastane obarvan produkt, ki ima absorpcijski vrh pri 595 nm. Koncentracijo proteinov smo izračunali iz enačbe premice, ki smo jo dobili s pomočjo umeritvene krivulje na sliki 9 in volumna vzorca. Enačba premice je $A_{595} = 0,0089 \times m_{\text{prot}}$. V enačbi m_{prot} pomeni maso proteinov v μg . Koncentracije proteinov v supernatantih iz gomoljev so vse zbrane v preglednici 4.



Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradfordu (1976); enačba premice je $A_{595} = 0,0089 \times m_{\text{prot}}$.

Preglednica 4: Absorbanca raztopin in koncentracija proteinov v vseh supernatantih iz krompirjevih gomoljev. 1: Kennebec, netretiran, čas 0h, 2: Kennebec, netretiran, čas 2,5 h, 3: Kennebec, askorbinska kislina, čas 0h, 4: Kennebec, askorbinska kislina, čas 2,5 h, 5: Kennebec, citronska kislina, čas 0h, 6: Kennebec, citronska kislina, čas 2,5 h, 7: Kennebec, K-metabisulfit, čas 0h, 8: Kennebec, K-metabisulfit, čas 2,5 h, 9: Kennebec, rožmarinov ekstrakt, čas 0h, 10: Kennebec, rožmarinov ekstrakt, čas 2,5 h, 11: Kennebec, zrak, 3 dni, 12: Kennebec, zrak, 7 dni, 13: Désirée, zrak, 3 dni, 14: Désirée, zrak, 7 dni, 15: Kennebec, kisik, 3 dni, 16: Kennebec, kisik, 7 dni, 17: Désirée, kisik, 3 dni, 18: Désirée, kisik, 7 dni

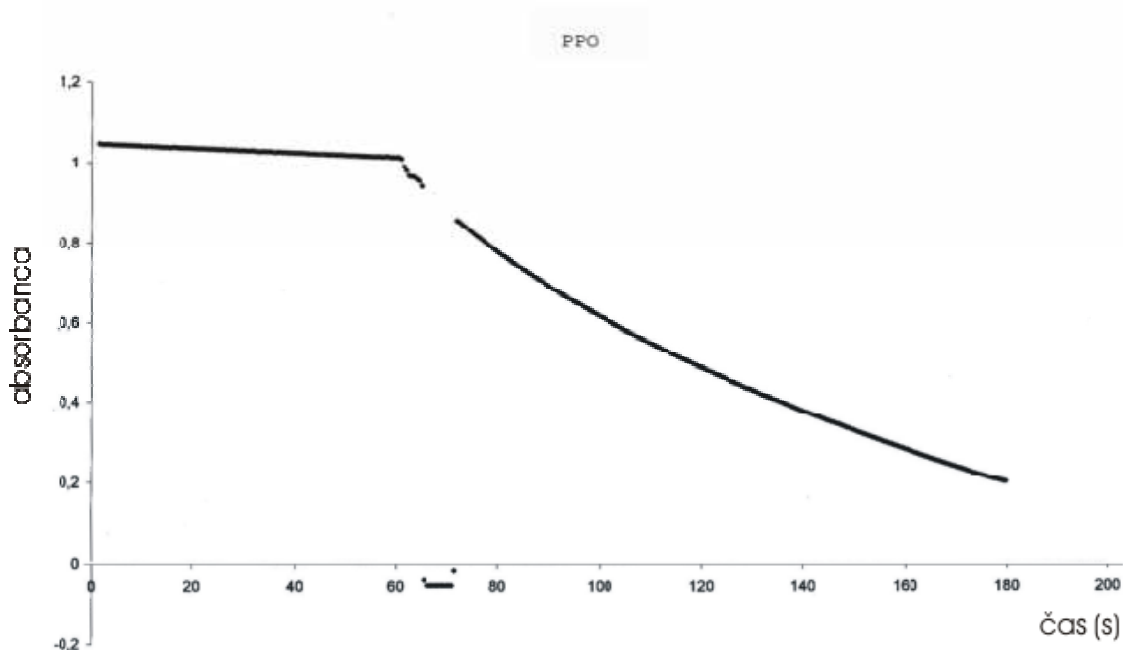
	A₅₉₅	koncentracija proteina (mg/ml)
1	0,543	1,22
2	0,765	1,72
3	0,854	1,92
4	0,659	1,48
5	0,703	1,58
6	0,605	1,36
7	0,552	1,24
8	0,797	1,79
9	0,360	0,81
10	0,441	0,99
11	0,449	1,01
12	0,663	1,49
13	0,619	1,39
14	0,552	1,24
15	0,739	1,66
16	0,614	1,38
17	0,561	1,26
18	0,596	1,34

4.2 DOLOČANJE PPO AKTIVNOSTI

4.2.1 Vpliv antioksidantov

Aktivnost PPO smo določili v supernatantih krompirjevega ekstrakta, ki smo ga pripravili z metodo opisano v točki 3.1.1. Absorbanco pri 412 nm (A_{412}) smo merili v enakih časovnih intervalih in tako smo dobili krivuljo odvisnosti absorbance od časa. Iz izrisane krivulje smo v najbolj strmem delu med 80 in 110 s izračunali naklon k_{vz} , ter nato izračunali specifično aktivnost PPO po formuli:

$$((k_{sl.} - k_{vz.}) \times 5 \times 2) / (c_{prot.} \times 0,1).$$



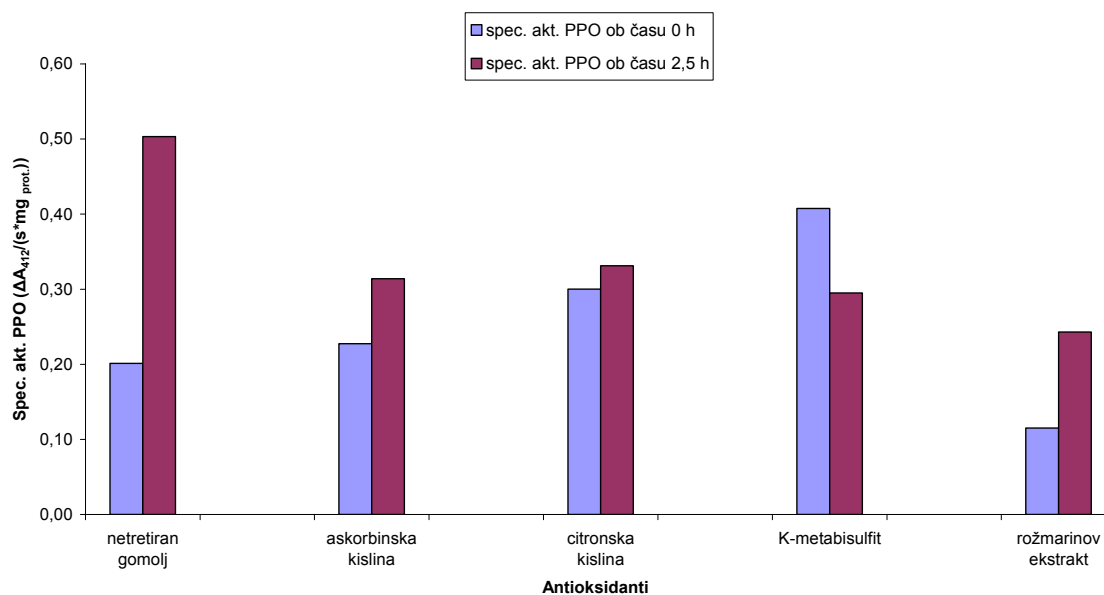
Slika 10: Odvisnost absorbance pri 420 nm od časa poteka encimsko katalizirane reakcije za določanje aktivnosti PPO

V preglednici 5 so zbrane vse vrednosti naklonov k ($k_{vz.}$ vzorca je odštet od $k_{sl.}$) za PPO. Poleg teh vrednosti so v preglednici 5 zbrani k za POD in PAL ($k_{sl.}$ vzorca je odštet od $k_{vz.}$).

Preglednica 5: Zbrane povprečne vrednosti meritev naklonov k. 1: Kennebec, netretiran, čas 0h, 2: Kennebec, netretiran, čas 2,5 h, 3: Kennebec, askorbinska kislina, čas 0h, 4: Kennebec, askorbinska kislina, čas 2,5 h, 5: Kennebec, citronska kislina, čas 0h, 6: Kennebec, citronska kislina, čas 2,5 h, 7: Kennebec, K-metabisulfit, čas 0h, 8: Kennebec, K-metabisulfit, čas 2,5 h, 9: Kennebec, rožmarinov ekstrakt, čas 0h, 10: Kennebec, rožmarinov ekstrakt, čas 2,5 h, 11: Kennebec, zrak, 3 dni, 12: Kennebec, zrak, 7 dni, 13: Désirée, zrak, 3 dni, 14: Désirée, zrak, 7 dni, 15: Kennebec, kisik, 3 dni, 16: Kennebec, kisik, 7 dni, 17: Désirée, kisik, 3 dni, 18: Désirée, kisik, 7 dni

Vzorec	PPO $\Delta A/\Delta t=k_{PPO}$	POD $\Delta A/\Delta t=k_{POD}$	PAL $\Delta A/\Delta t=k_{PAL}$
1	2,45E-03	5,00E-04	9,80E-06
2	8,66E-03	8,15E-04	9,26E-06
3	4,37E-03	5,10E-04	1,23E-05
4	4,66E-03	6,18E-04	4,49E-06
5	4,75E-03	1,56E-03	7,98E-06
6	4,50E-03	6,72E-04	1,23E-05
7	5,05E-03	8,53E-04	-6,20E-06
8	5,27E-03	9,01E-04	6,48E-06
9	9,27E-04	3,10E-04	-1,70E-05
10	2,40E-03	2,61E-04	-8,40E-06
11	1,49E-03	3,92E-04	8,67E-06
12	2,36E-03	6,27E-04	1,37E-05
13	1,46E-03	5,54E-04	9,71E-06
14	1,81E-03	5,57E-04	9,32E-06
15	7,43E-03	6,32E-04	1,32E-05
16	3,02E-03	4,68E-04	1,16E-05
17	4,00E-03	4,17E-04	2,18E-05
18	1,73E-03	3,93E-04	1,03E-05

Na sliki 11 so rezultati poskusa, v katerem smo rezine krompirja sorte Kennebec pomočili v raztopine različnih antioksidantov za 20 minut in nekatere takoj uporabili za pripravo homogenizata (čas 0), druge pa smo pustili na zraku še 2,5 ure in potem pripravili homogenizat (čas 2,5 ure). Aktivnost PPO smo izrazili kot specifično aktivnost encima, ki smo jo izračunali kot aktivnost encima na maso mg proteinov.

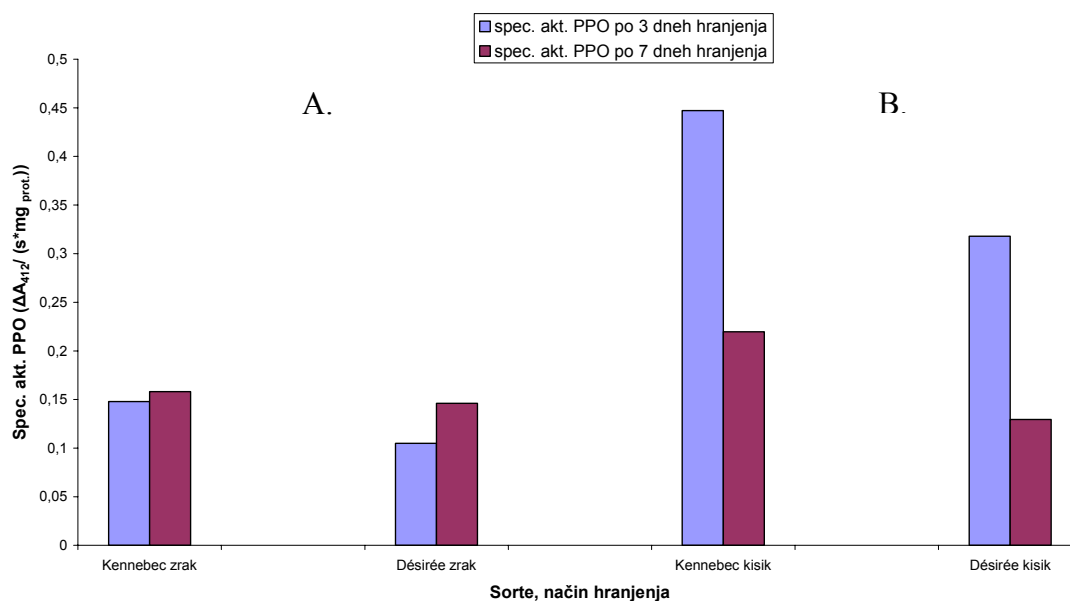


Slika 11: Specifična aktivnost PPO v rezinah bele sorte krompirja Kennebec ob času 0 in po 2,5 ure od začetka tretiranja z raztopinami antioksidantov

S slike 11 je razvidno, da je K-metabisulfit edini uspešno zavrl delovanje PPO v rezinah krompirja sorte Kennebec. Gre za relativno zmanjšanje specifične aktivnosti PPO, saj so bili poizkusi narejeni na različnih gomoljih. Za vsako tretiranje smo vzeli 3 gomolje, iz katerih smo dobili povprečen vzorec.

4.2.2 Vpliv različnega načina hranjenja

Rezine gomoljev dveh sort smo neprodušno zaprli v vrečke in jih enkrat napolnili z zrakom, enkrat pa s kisikom. Vzorce smo vzeli ven po treh in po sedmih dneh ter pripravili homogenizat po postopku 3.1.1. Rezultati meritev so zbrani v preglednici 5. Vpliv različnega načina hranjenja na specifično aktivnost PPO prikazuje slika 12.



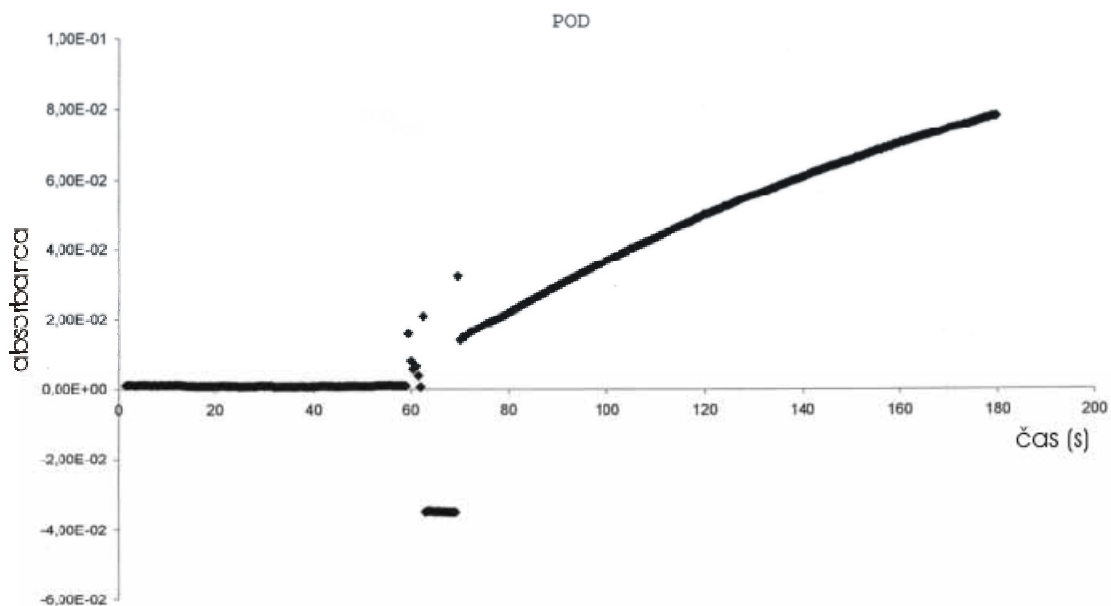
Slika 12: Specifična aktivnost PPO v rezinah gomoljev hranjenih pri 4°C v različnih atmosferah (A-zrak, B-kisikova atmosfera)

S slike 12 je razvidno, da je pri obeh sortah hranjenje v kisikovi atmosferi močno zmanjšalo aktivnost PPO po 7 dneh skladiščenja, sicer pa je bila večja od tiste v gomoljih, ki so bili hranjeni v normalni atmosferi.

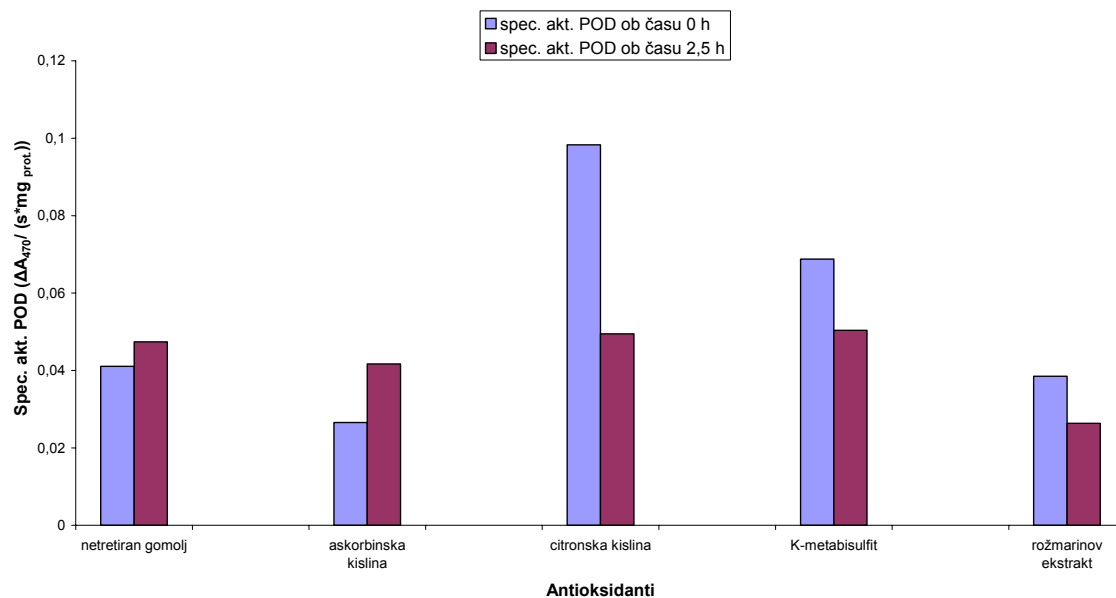
4.3 DOLOČANJE POD AKTIVNOSTI

4.3.1 Vpliv antioksidantov

Ovisnost absorbance od časa poteka encimsko katalizirane reakcije prikazuje slika 13. Naklone k za POD so zbrani v preglednici 5. Iz teh vrednosti smo izračunali specifično aktivnost POD po formuli $((k_{vz.} - k_{sl.}) \times 5 \times 2) / (c_{prot.} \times 0,1)$. Aktivnost POD smo izrazili kot specifično aktivnost encima, kar pomeni aktivnost na maso proteinov. Na sliki 14 so zbrani rezultati specifične aktivnosti POD v rezinah gomoljev, ki so bili tretirani z raztopinami različnih antioksidantov. Z nje je razvidno, da je citronska kislina najbolj učinkovito zmanjšala aktivnost POD. Tretiranje z askorbinsko kislino pa sodeč po naših rezultatih ni zmanjšalo aktivnosti POD, saj je bila specifična aktivnost POD po tretiranju celo večja.



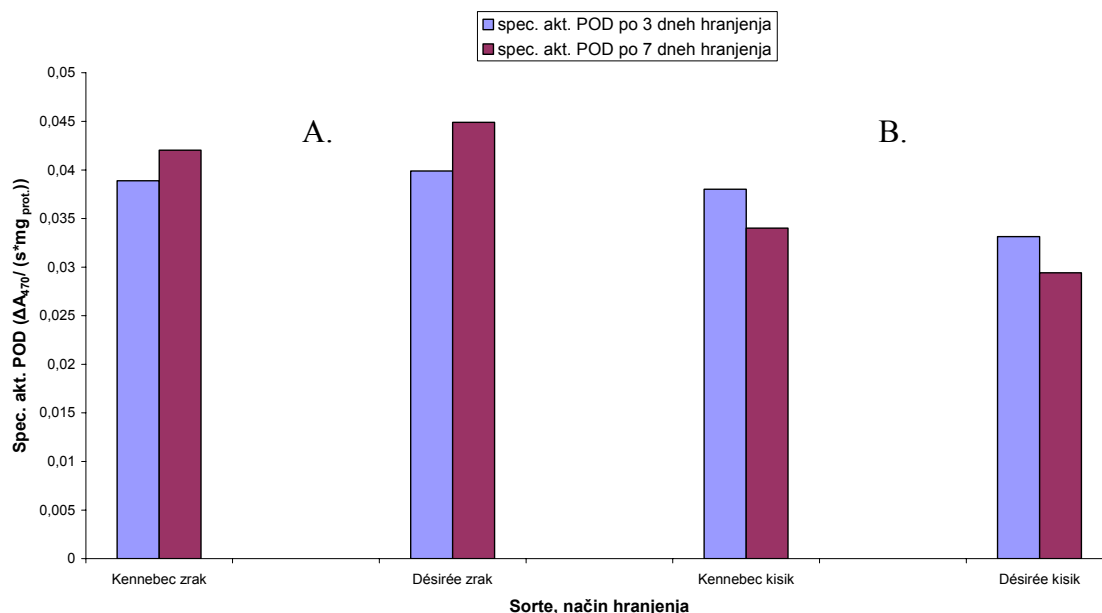
Slika 13 : Odvisnost absorbance pri 470 nm od časa poteka encimsko katalizirane reakcije za POD



Slika 14: Specifična aktivnost POD v rezinah bele sorte krompirja Kennebec ob času 0 in po 2,5 ure po začetku tretiranja z raztopinami antioksidantov

4.3.2 Vpliv različnega načina hranjenja

Tudi za te poskuse so zbrane vrednosti naklonov tangent v preglednici 5, iz slike 15 pa je razvidno, kako je način hranjenja vplival na aktivnost POD.



Slika 15: Specifična aktivnost POD v rezinah gomoljev hranjenih pri 4°C v različnih atmosferah (A-zrak, B-kisikova atmosfera)

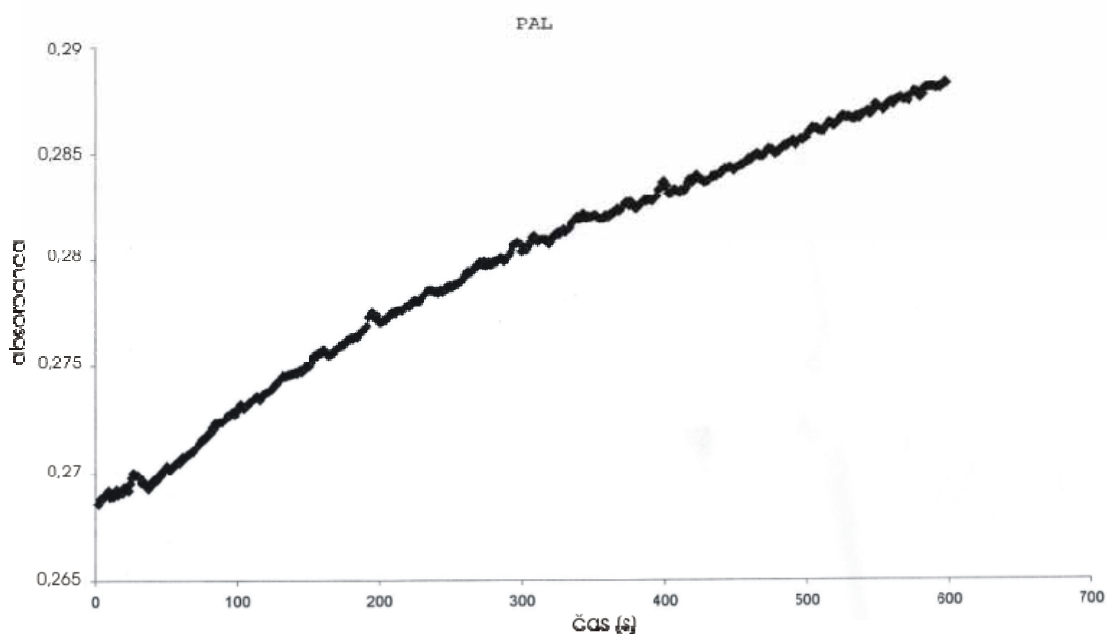
Očitno je, da na aktivnost POD način hranjenja ni imel posebno velikega učinka. V kisikovi atmosferi se je specifična aktivnost POD sicer zmanjšala tako v rezinah iz gomoljev Kennebec kot Désirée.

4.4 DOLOČANJE PAL AKTIVNOSTI

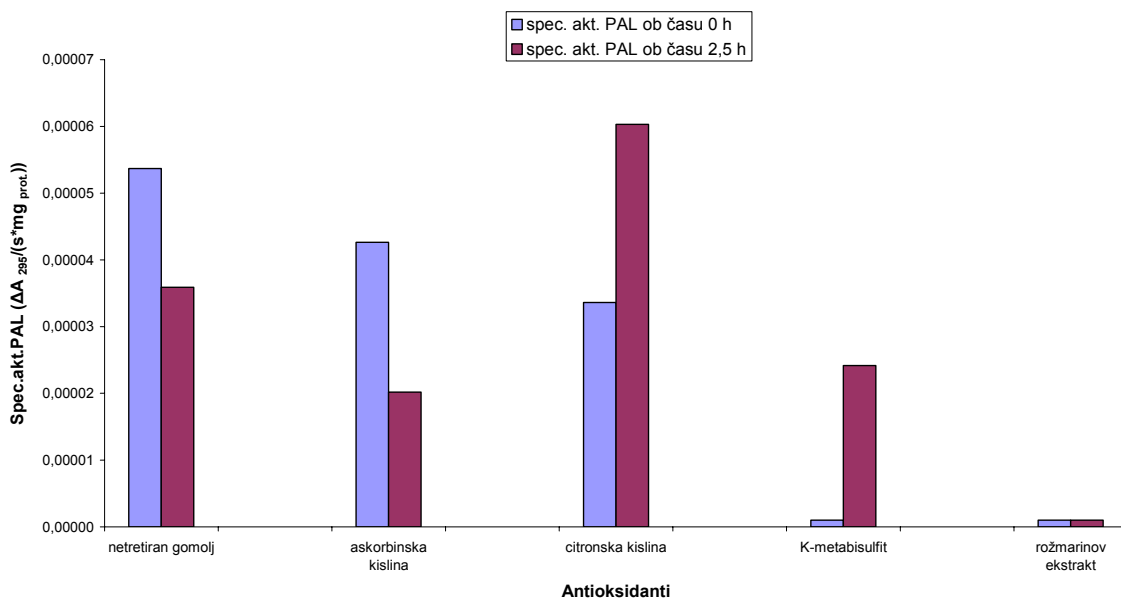
4.4.1 Vpliv antioksidantov

Odvisnost absorbance pri 295 nm od časa poteka encimsko katalizirane reakcije za PAL je prikazana na sliki 16. Tudi za PAL so nakloni k zbrani v preglednici 5. Specifično aktivnost PAL smo izračunali z $((k_{vz.} - k_{sl.}) \times 5 \times 2) / (c_{prot.} \times 1,5)$. Na sliki 17 so prikazani rezultati specifične aktivnosti PAL. Takoj lahko opazimo, da je bila askorbinska kislina tista, ki je najbolj zmanjšala aktivnost PAL. Citronska kislina in K-metabisulfit pa sta

močno povečala PAL aktivnost. Pri tretiranju gomoljev z rožmarinovim ekstraktom smo dobili pri merjenju negativne vrednosti naklonov k , najverjetneje zaradi obarvanosti samega ekstrakta. Menimo, da rožmarinov ekstrakt sam absorbira pri A_{295} , zato nismo dobili realnih rezultatov.



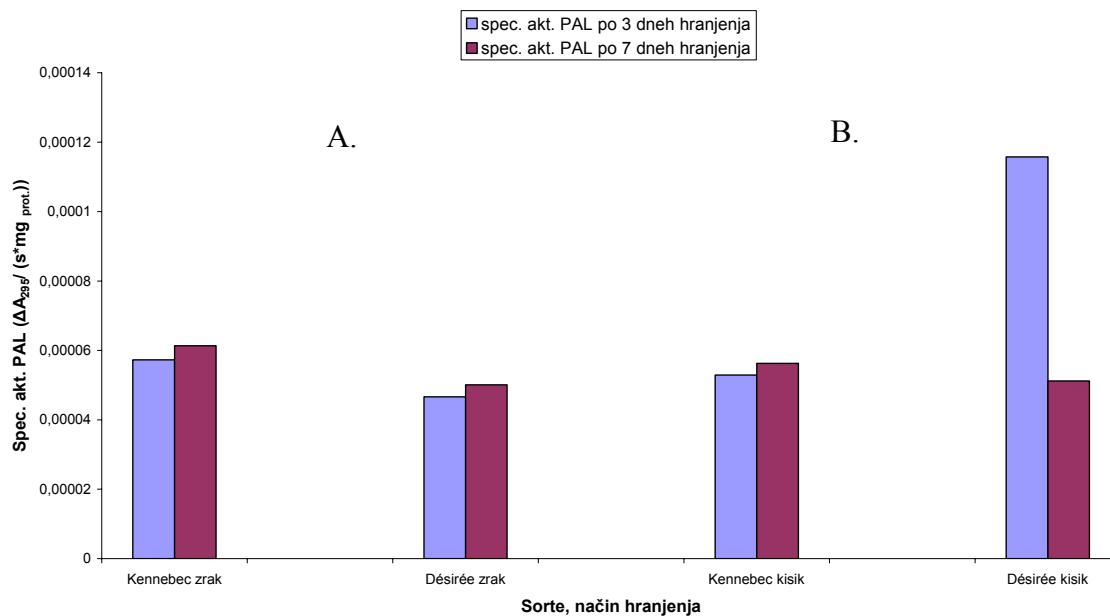
Slika 16: Odvisnost absorbance pri 295 nm od časa poteka encimsko katalizirane reakcije za PAL



Slika 17: Specifična aktivnost PAL ob času 0 in po 2,5 ure po začetku tretiranja z raztopinami antioksidantov

4.4.2 Vpliv načina hranjenja

Specifična aktivnost PAL v odvisnosti od načina hranjenja, ki jo prikazuje slika 18, se je najbolj zmanjšala pri sorti Désirée po 7-dnevem hranjenju rezin v kisikovi atmosferi.

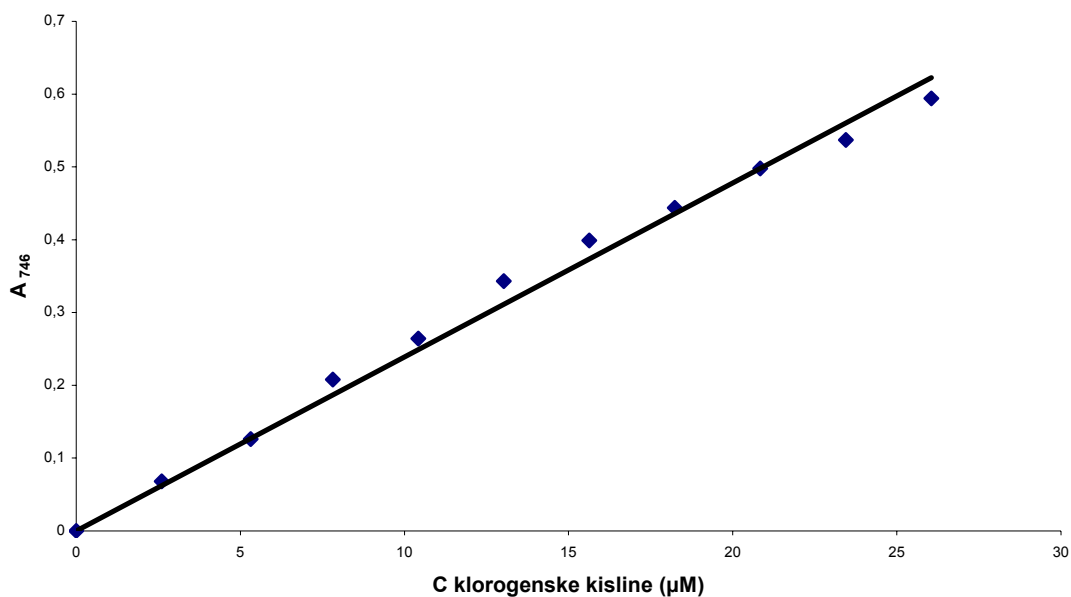


Slika 18: Specifična aktivnost PAL v rezinah gomoljev hranjenih pri 4°C v različnih atmosferah (A-zrak, B-kisikova atmosfera)

4.5 DOLOČANJE SKUPNIH FENOLOV

4.5.1 Umeritvena krivulja

Skupne fenolne spojine smo določili s spektrofotometrično metodo po Waterman in Mole (1994). Iz umeritvene krivulje na sliki 19 smo izračunali enačbo: $A_{746} = 0,0239 \times c$, v kateri pomeni c koncentracijo klorogenske kisline (μM).



Slika 19: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino za določanje skupnih fenolnih spojin; enačba premice je $A_{746} = 0,0239 \times c$

Vse koncentracije fenolnih spojin v supernatantih iz gomoljev so zbrane v preglednici 6. Povprečna vrednost absorbance pri 746 nm je bila izračunana iz meritev treh paralelk.

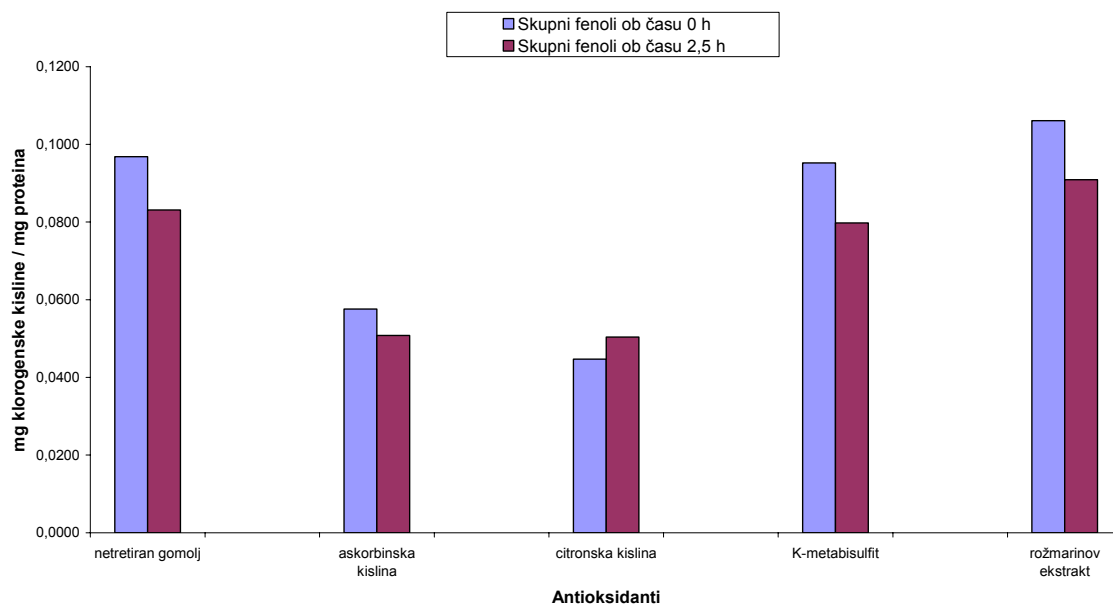
Preglednica 6: Absorbanca raztopin in koncentracija fenolnih spojin v vseh supernatantih iz krompirjevih gomoljev. 1: Kennebec, netretiran, čas 0h, 2: Kennebec, netretiran, čas 2,5 h, 3: Kennebec, askorbinska kislina, čas 0h, 4: Kennebec, askorbinska kislina, čas 2,5 h, 5: Kennebec, citronska kislina, čas 0h, 6: Kennebec, citronska kislina, čas 2,5 h, 7: Kennebec, K-metabisulfit, čas 0h, 8: Kennebec, K-metabisulfit, čas 2,5 h, 9: Kennebec, rožmarinov ekstrakt, čas 0h, 10: Kennebec, rožmarinov ekstrakt, čas 2,5 h, 11: Kennebec, zrak, 3 dni, 12: Kennebec, zrak, 7 dni, 13: Désirée, zrak, 3 dni, 14: Désirée, zrak, 7 dni, 15: Kennebec, kisik, 3 dni, 16: Kennebec, kisik, 7 dni, 17: Désirée, kisik, 3 dni, 18: Désirée, kisik, 7 dni

Vzorec	Povprečna A_{746}	skupni fenoli KK ($\mu\text{mol/l}$)	Fenoli KK (mg) / 100g krompirja	mg KK / mg proteina
1	0,408	17,07	70,83	0,10
2	0,494	20,67	85,75	0,08
3	0,382	15,98	66,31	0,06
4	0,26	10,88	45,13	0,05
5	0,244	10,21	42,36	0,04
6	0,237	9,92	41,14	0,05
7	0,408	17,07	70,83	0,10
8	0,494	20,67	85,75	0,08
9	0,297	12,43	51,56	0,11
10	0,311	13,01	53,99	0,09
11	0,246	10,29	42,7	0,07
12	0,367	15,36	63,71	0,07
13	0,323	13,51	56,07	0,07
14	0,318	13,31	55,2	0,07
15	0,337	14,1	58,5	0,06
16	0,28	11,72	48,61	0,06
17	0,267	11,17	46,35	0,06
18	0,259	10,84	44,96	0,06

4.5.2 Določanje skupnih fenolnih spojin

4.5.2.1 Vpliv antioksidantov

V rezinah, ki smo jih pomočili v različne raztopine antioksidantov, smo določili fenolne spojine. Koncentracije fenolnih spojin smo izračunali s pomočjo enačbe premice v 4.5.1. in so zbrane v preglednici 6. Skupne fenolne spojine v rezinah smo izrazili kot maso klorogenske kisline v mg na mg proteinov v 100 g krompirja za netretirane gomolje sorte Kennebec ter za gomolje, tretirane z raztopinami različnih antioksidantov. Posamezne vrednosti prikazuje slika 20.

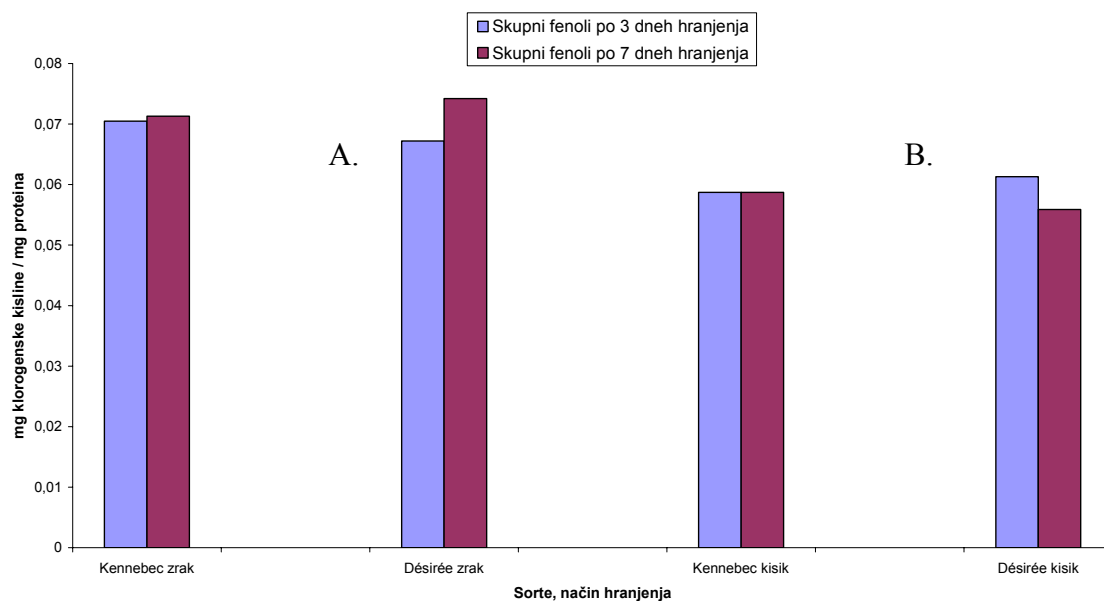


Slika 20: Skupne fenolne spojine ob času 0 in po 2,5 h od začetka tretiranja z raztopinami antioksidantov

Na sliki 20 lahko vidimo, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin ni bistveno zmanjšala po tretiranju z antioksidanti, glede na netretiran vzorec.

4.5.2.2 Vpliv načina hranjenja

Ugotavljali smo, kako različni pogoji hranjenja vplivajo na količino skupnih fenolnih spojin. Rezone gomoljev smo hranili pri temperaturi 4 °C na zraku in v kisikovi atmosferi. Gomolje smo vzeli ven po treh in po sedmih dneh, ter pripravili homogenizate za poskus. Količino skupnih fenolnih spojin pri različnih pogojih hranjenja (zrak, temperatura) smo določili kot množino klorogenske kisline v mg na mg proteinov v 100 g krompirja sort Kennebec in Désirée (slika 21).



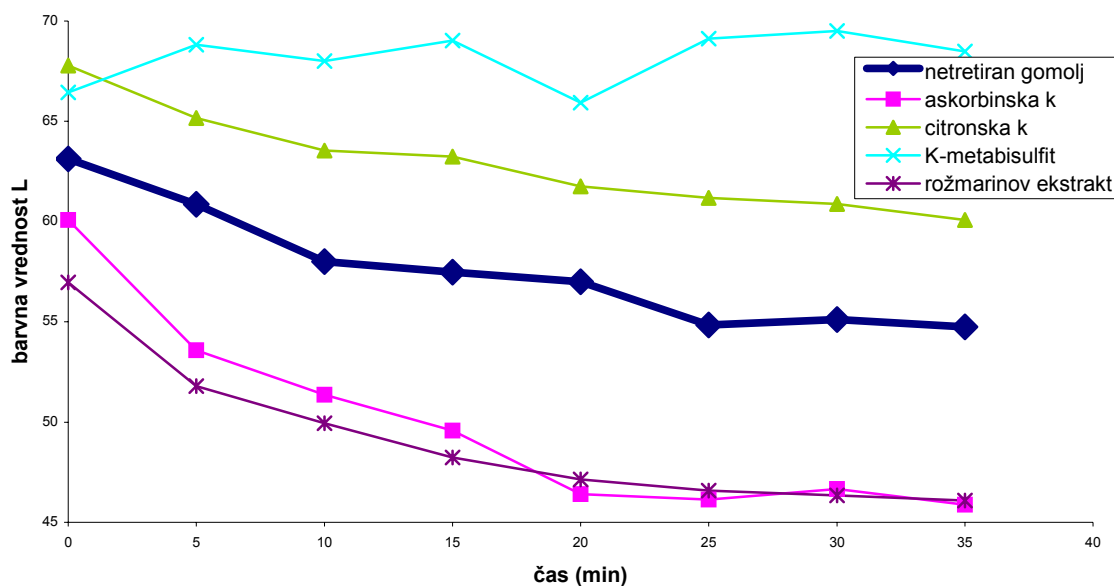
Slika 21: Skupne fenolne spojine v rezinah gomoljev hranjenih pri 4 °C v različnih atmosferah (A-zrak, B-kisikova atmosfera)

S slike 21 je razvidno, da je padla vsebnost skupnih fenolnih spojin le pri sorti Désirée v kisikovi atmosferi.

4.6 BARVA KROMPIRJEVIH REZIN

Ko smo rezine gomoljev vzeli iz raztopin antioksidantov, smo jih premazali s substratom DOPA ter v 5 minutnih presledkih (do 35 minut) merili vrednost parametra L. Netretiran vzorec ni bil potopljen v raztopine antioksidantov, ampak smo ga samo premazali z DOPO in z njim opravili meritve na enak način kot z ostalimi vzorci.

Zaradi lažje primerljivosti ter ovrednotenja rezultatov spremembe barve rezin gomoljev krompirja smo se osredotočili le na parameter L, ki določa svetlost oz. temnost krompirjeve rezine. Rezultate prikazuje slika 22.



Slika 22: Vrednosti L izmerjene na rezinah gomoljev sorte Kennebec določene s kromometrom Minolta CR-20b

S slike 22 je razvidno, da je K-metabisulfit v prvih 5 minutah nekoliko posvetlil začetno barvo, potem pa je najuspešneje ohranjal začetno barvo oziroma preprečeval porjavitve gomolja še v nadaljnjih 30 minutah. Iz grafa je razvidno, da je hitrost porjavenja pri tretiranju s citronsko kislino zelo podobna hitrosti porjavenja netretiranega vzorca. Citronska kislina je uspešno zavirala proces porjavenja že pri prvih meritvah (čas 0), ki smo jih naredili takoj, ko smo vzeli rezine gomoljev iz raztopin in jih premazali z DOPO. Askorbinska kislina je še pospešila temnenje gomoljev. Ker je ekstrakt rožmarina že sam temnejše obarvan, lahko vpliva že na začetno temnejšo barvo gomoljev. Ugotovili smo tudi, da pride do najhitrejšega temnenja v prvih 20 minutah, potem se pa proces upočasni.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 DOLOČANJE PPO AKTIVNOSTI

Prirast aktivnosti PPO po 2,5 urah so v naših poskusih, glede na aktivnost PPO v netretiranem gomolju, zmanjšale vse raztopine antioksidantov (slika 11). Kot najučinkovitejša se je izkazala raztopina K-metabisulfita, saj je tu po 2,5 urah prišlo celo do zmanjšanja aktivnosti PPO. Od ostalih raztopin antioksidantov pa so bile pri zmanjševanju aktivnosti PPO učinkovite tudi askorbinska kislina, manj citronska kislina ter najmanj rožmarinov ekstrakt. Tudi drugi raziskovalci so ugotovili, da je askorbinska kislina učinkovit inhibitor aktivnosti PPO. Za najbolj učinkovitega pa se je izkazal prav tako kot v diplomski nalogi K-metabisulfit (Duangmal in sod., 1999).

Pri hranjenju gomoljev na 4 °C med sortama ni bilo večjih razlik (slika 12A in B). Aktivnost PPO pri hranjenju v normalni atmosferi je bila manjša kot aktivnost le teh v kisikovi atmosferi in se s časom ni bistveno spreminjala. Aktivnost PPO iz gomoljev, ki so bili hranjeni v kisikovi atmosferi (na 4 °C) pa je bila po 3 dneh bistveno večja, po 7 dneh pa se je ustalila na raven, ki je bila primerljiva z ravnijo aktivnosti PPO gomoljev, ki smo jih hranili v normalni atmosferi. Takšno povečanje aktivnosti PPO lahko pojasnimo z afiniteto PPO do kisika, saj je ta potreben za reakcijo hidroksiliranja substratov.

5.2 DOLOČANJE POD AKTIVNOSTI

Glede na aktivnost POD v netretiranem gomolju je bila aktivnost POD ob času 0 (takoj po tretiranju z raztopinami) zmanjšana pri gomoljih, ki smo jih tretirali z raztopino askorbinske kisline ter z rožmarinovim ekstraktom (slika 14). Aktivnost POD iz gomoljev tretiranih s citronsko kislino in K-metabisulfitom je bila ob času 0 veliko večja kot pri kontrolnem gomolju, po 2,5 h se je zmanjšala ter ustalila na približno enaki aktivnosti kot smo jo opazili pri kontroli. Najbolj pogost postopek za inaktivacijo encimov in podaljševanje kakovosti zelenjave pri shranjevanju za nadaljno predelavo je blanširanje. Ugotovili pa so, da so POD med najbolj termostabilnimi encimi in da so celo sposobne obnoviti aktivnost po toplotni obdelavi. Tako so opazili, da blanširanje krompirja pri 75 °C

ni bilo uspešno za popolno inaktivacijo POD (Boucoiranin in sod., 2000). Takšna termostabilnost pogojuje večkratno blanširanje, kar pa zelo zmanjša organoleptično kakovost krompirja. Zasledila sem, da je druga skupina raziskovalcev ugotovila, da 10 minutno segrevanje pri 70 °C popolnoma inaktivira PPO (Duangmal in sod., 1999).

Sorti se v aktivnosti POD pri hranjenju na 4 °C bistveno ne razlikujeta (slika 15). Zasledili smo, da je bila aktivnost POD malo manjša v primeru, ko smo gomolje hranili na 4 °C ter v kisikovi atmosferi hkrati, kjer je aktivnost encima (za razliko od shranjevanja gomoljev v normalni atmosferi) s časom tudi padala. Pri zmrzovanju pod velikim tlakom so ugotovili, da je aktivnost PPO in POD še vedno prisotna. Aktivnost POD je večja kot PPO. Vsebnost proteinov pa se je zmanjšala za približno 50 % po zmrzovanju pod visokim tlakom pri 210 Mpa in -20 °C (Prestamo in sod., 2005).

5.3 DOLOČANJE PAL AKTIVNOSTI

Aktivnost PAL, ki je eden od ključnih encimov pri biosintezi fenolnih spojin, je pri kontrolnem gomolju s časom padala (slika 17), kar smo opazili tudi pri tretiranju z askorbinsko kislino (malo manjša aktivnost). Tretiranje s citronsko kislino je zmanjšalo aktivnost PAL, ki pa se je po 2,5 h spet dvignila. Enako smo opazili pri tretiranju s K-metabisulfitom, kjer je aktivnost PAL padla na 0 ter se po 2,5 h spet rahlo dvignila. Rožmarinov ekstrakt je s svojo obarvanostjo motil meritve absorbance pri 295 nm, zato nismo dobili realnih rezultatov.

Pri sorti Kennebec hranjenje pri 4 °C v normalni ali kisikovi atmosferi (slika 18) ni bistveno vplivalo na aktivnost PAL. Aktivnost PAL pri sorti krompirja Désirée, ki smo ga hranili v normalni atmosferi je bila bistveno manjša od aktivnosti PAL krompirja hranjenega v kisikovi atmosferi pri vzorcih, ki smo jih vzeli iz hladilnika po 3 dneh. V kolikor smo gomolje hranili v kisikovi atmosferi je bila aktivnost PAL več kot enkrat višja, a se je po 7 dneh spet ustalila na raven aktivnosti, ki smo jo zasledili v gomoljih hranjenih v normalni atmosferi.

5.4 DOLOČANJE SKUPNIH FENOLOV

Rezine gomoljev tretirane z askorbinsko kislino, K-metabisulfitom in rožmarinovim ekstraktom (slika 20) so vsebovale manj skupnih fenolov po 2 urah in pol, kot ob času 0, kar kaže da so raztopine delovale tudi na kopičenje skupnih fenolnih spojin. Delovanje je bilo verjetno posledica inhibicije aktivnosti nekaterih encimov, ki so udeleženi v sintezi fenolnih spojin.

Pričakovali smo, da bo imela najmočnejše zaviralno delovanje na skupne fenolne spojine ravno tako raztopina K-metabisulfita, čemur pa ni bilo tako. Najuspešneje je zmanjšalo skupne fenolne spojine tretiranje s citronsko in askorbinsko kislino glede na netretiran vzorec.

Iz rezultatov lahko tudi sklepamo, da je vpliv hranjenja v kisikovi atmosferi zmanjšal skupne fenolne spojine predvsem pri sorti Désirée, medtem, ko na vsebnost skupnih fenolnih spojin pri sorti Kennebec atmosfera ni imela večjega vpliva (slika 21). Na splošno lahko rečemo, da hranjenje krompirjevih gomoljev v kisikovi atmosferi pri 4 °C najmanj spodbudi tvorbo skupnih fenolov.

5.5 DOLOČANJE BARVE KROMPIRJEVIH REZIN

Kromometer nam je omogočal spremljanje hitrosti porjavenja na površini reza krompirja, kjer tudi pretežno v praksi prihaja do porjavenja. Zaradi poškodbe vakuol, v katerih so PPO lokalizirane, pridejo le te do svojega substrata - fenolnih spojin, ki jih nato oksidirajo v kinone, ki posledično povzročijo porjavenje.

Netretiran gomolj je po premazu z DOPA (slika 22) postajal vse temnejši (parameter L se je zmanjšal). Enako je veljalo za gomolje tretirane z rožmarinovim ekstraktom in askorbinsko kislino. Askorbinska kislina zmanjšuje encimsko porjavenje, predvsem zaradi sposobnosti redukcije kinonov v fenolne spojine, predno bi lahko vstopili v reakcije za tvorbo obarvanih produktov (Ilyengar in McEvil, 1992). Pri tretiranju z rožmarinovim ekstraktom je bila lahko nižja začetna vrednost parametra L (navidezno večja aktivnost

PPO) posledica temnega obarvanja gomolja zaradi naravne obarvanosti rožmarinovega ekstrakta.

Parameter L, ki smo ga določili pri gomoljih tretiranih s citronsko kislino je imel večjo začetno vrednost in je počasneje padal, kar nam govori o tem, da je od testiranih antioksidantov (razen K-metabisulfita) najbolje zavirala delovanje oksidativnih encimov citronska kislina, vendar je tudi njeno učinkovanje s časom pojemalo.

Barva gomoljev, ki smo jih tretirali s K-metabisulfitom je bila najsvetlejša, kar kaže na najuspešnejše delovanje antioksidanta od preizkušenih. Dodatno se je zaviralni učinek na oksidativne encime ohranjal vsaj prvih 35 minut, za razliko od ostalih, kjer je učinek s časom padal.

SKLEPI

Poskusi, ki smo jih izvedli so preliminarni. V njih se je kot najboljši antioksidant po pričakovanjih izkazal K-metabisulfit, saj je najboljše zaviral delovanje PPO in POD, kar smo posredno pokazali tudi s kromometrom.

V kolikor bi želeli dati prednost raztopinam drugih antioksidantov za inhibiranje PPO in POD, bi se odločili za uporabo citronske kisline ter za hranjenje v kisikovi atmosferi. Za inhibiranje PAL, s čimer bi zmanjšali koncentracijo substrata za oksidacijo, pa bi se bilo, med alternativnimi antioksidanti smotrno odločiti za tretiranje z askorbinsko kislino.

Najuspešneje je zmanjšalo skupne fenolne spojine tretiranje s citronsko in askorbinsko kislino.

Pri interpretaciji rezultatov in določanju encimskih aktivnosti v ekstraktu moramo biti pazljivi. Rezultati nas lahko delno zavedejo, saj do porjavenja prihaja predvsem na mestu poškodb na površini in je potemtakem boljši pokazatelj reakcije gomoljev ob poškodbah merjenje s kromometrom in ne določanje aktivnosti encimov v raztopinah ekstraktov. Pri uporabi kromometra namreč spremljamo delovanje encimov le na površini, kjer je do

poškodbe prišlo, za razliko od merjenja aktivnosti encimov v ekstraktu iz homogenizata, kjer se delovanje encima »razredči«. Delo je le uvod za nadaljne raziskovanje, kjer bo potrebno zaradi velike biološke raznovrstnosti in s tem možnosti napak, narediti ustrezno večje število ponovitev.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo preučevali encimsko porjavenje rezin krompirja, do katerega prihaja po mehanskih poškodbah zaradi oksidacije fenolnih spojin v kinone, ki se nato vežejo v različne produkte in dajo značilno temnejšo barvo.

Vpletenost encimov povezanih v metabolizem polifenolov pri rezinah dveh sort krompirja, Kennebec in Désirée, smo ugotavljali z določanjem specifične aktivnosti treh encimov: PPO, POD in PAL. Ugotavljali smo tudi vpliv uporabe različnih antioksidantov (askorbinska kislina, citronska kislina, kalijev metabisulfit in rožmarinov ekstrakt) na aktivnost encimov porjavenja. Pri pregledu dosedaj objavljenih rezultatov raziskav encimskega porjavenja smo pričakovali, da bodo vsi antioksidanti zavirali encimsko porjavenje. Izbrali smo takšne koncentracije antioksidantov, kot se že uporabljajo v živilski industriji pri predelavi sokov in zelenjave. Za eksperimente z antioksidanti smo uporabili samo gomolje sorte Kennebec. Prvi smo uporabili rožmarinov ekstrakt kot vir antioksidantov za te poskuse in njegov učinek primerjali z nekaterimi znanimi antioksidanti. Ugotovili smo, da se ni izkazal za najbolj uspešnega zaviralca in da že sam ekstrakt doprinese k temnejši barvi krompirja, česar si pa v proizvodnji ne želimo.

Zanimalo nas je, kako vpliva prisotnost kisika ter način hranjenja krompirja na hitrost porjavenja. Za vpliv načina hranjenja rezin smo uporabili obe sorti, Kennebec in Désirée. Velika koncentracija kisika v atmosferi je povečala aktivnost PPO najbolj v prvih 3 dneh, po 7 dneh pa se je zmanjšala, vendar je bila še vedno višja kot pri gomoljih hranjenih v normalni atmosferi (velja za obe sorti). Aktivnost POD je bila približno enaka v normalni in v kisikovi atmosferi pri vzorcih, ki smo jih vzeli iz hladilnika po 3 dneh. Pri vzorcih, ki smo jih vzeli iz hladilnika po 7 dneh, pa je razlika: aktivnost POD je narastla v normalni atmosferi, pri gomoljih hranjenih v kisikovi atmosferi pa je padla (velja za obe sorti). Velika koncentracija kisika v atmosferi pa ni imela učinka na PAL.

Stopnjo porjavenja krompirjevih rezin smo določali s kromometrom, kjer smo merili spremembo parametra L^* , ki določa svetlost oz. temnost krompirjeve rezine. Barva gomoljev, ki smo jih tretirali s K-metabisulfitom je bila najsvetlejša, kar kaže na

najuspešnejše delovanje antioksidanta od preizkušenih. Zaviralni učinek na oksidativne encime se je ohranjal vseh prvih 35 minut, za razliko od ostalih, kjer je učinek s časom padal.

7 VIRI

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

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

BIO-RAD protein assay. 1976. Vienna, Amex: 18 str.

Boucoiran C. F. S., Kijne J. W., Recourt K. 2000. Isolation and partial characterization of thermostable isoperoxidases from potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber sprouts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 701-707

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254

Briviba K., Sies H. 1994. Nonenzymatic antioxidant defense systems. V: Natural antioxidants in human health and disease. Frei B. (ed.) San Diego, Academic Press: 107-156

Cantos E., Tudela J.A., Gil M.I., Espin J.C. 2002. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3015-3023

CFIA. 2004 a. Potato section: cv. Desiree. Ottawa, CFIA-Canadian Food Inspection Agency, Plant Products Directorate
<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/potpom/var/desiree/101e.shtml#e> (14.8.2004): 1 str.

CFIA. 2004 b. Potato section: cv. Kennebec. Ottawa, CFIA-Canadian Food Inspection Agency, Plant Products Directorate
<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/potpom/var/kennebec/20e.shtml#e> (14.8.2004): 1 str.

Cilliers J.J.L., Singleton V.L. 1989. Nonenzymatic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37: 890-896

Cooperative Extension Service Kentucky. 2004. Commonly used food additives from A to Z. Kentucky, University of Kentucky, College of Agricultural Chemical Cuisine
<http://www.ca.uky.edu/agcollege/fcs/FACTSHTS/FN-SSB.144.PDF> (12.8.2004): 3 str.

Coppen P.P. 1994. The use of antioxidants. V: Rancidity in foods. 3rd ed. Allen J.C., Hamilton R.J. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 84-103

Donko M. 2001. Indukcija oksidoreduktaz v listih paradižnika z metil jasmonatom. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-21

Duangmal K., Apenten R. K. O. 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). Food Chemistry 64: 351-359

Esterbauer H., Schwarzl E., Hayn M. 1977. A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid. Analytical Biochemistry, 77,2: 486-494

Fukumoto L.R., Toivonen P.M., Delaquis P.J. 2002. Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic and vascular tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50,16: 4503-4511

Gordon M. H. 1993. Natural antioxidants. V: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol 1. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds). London, Academic Press: 212-213

Grotheer P., Marshall M., Simonne A. 2004. Sulfites: Separating fact from fiction. Gainesville, University of Florida, IFAS Extension.
<http://edis.ifas.ufl.edu/FY731> (23.5.2007): 9 str.

Hammer F.E. 1993. Oxidoreductases. V: Enzymes in food processing. 3rd ed. Nagodawithana T., Reed G. (eds.). San Diego, Academic Press: 221-277

Heldt H.W. 1997. Plant biochemistry & molecular biology. 1st ed. New York, Oxford University Press: 352-414

Herrig V., Ferrarese M.L.L., Suzuki L.S., Rodrigues J.D., Ferrarese-Filho O. 2002. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. Biological Research, 35,1: 59-66

Hind G., Marshak D. R., Coughlan S. J. 1995. Spinach thylakoid polyphenol oxidase: Cloning, characterization, and relation to a putative protein kinase. Biochemistry, 34, 25: 8157-8164

Hisaminato H., Murata M., Homma S. 2001. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 65,5: 1016-1021

Hodge J.E. 1953. Dehydrated foods: Chemistry of browning reactions in model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1: 928-943

Ilyengar R., McEvil A. J. 1992. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 3,3: 60-64

Kaaber L., Martinsen B.K., Bråthen E., Shomer I. 2002. Browning inhibition and textural changes of pre-peeled potatoes caused by anaerobic conditions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35,6: 526-531

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

Krajnc P. 2003. Vpliv dodatka rožmarinovega ekstrakta na stabilnost olj za cvrenje. *Diplomsko delo*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 18-28

Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-37

Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 8-19, 215-217

Labuza T.P., Schmidl M.K. 1986. Advances in the control of browning reactions in foods. V: *Role of chemistry in the quality of processed food*. Fennema O.R., Chang W.H., Lii C.Y. (eds.). Westport, Food & Nutrition Press: 65-65

Lee H.S., Nagy S. 1988. Relationship of sugar degradation to detrimental changes in citrus juice quality. *Food Technology*, 42,11: 91-97

Madhavi D.I., Salunkhe D.K. 1995. Antioxidants. V: *Food additive toxicology*. Maga J., Tu A.T. (eds.). New York, Marcel Dekker: 89-178

Marri C., Frazzoli A., Hochkoeppler A., Poggi V. 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*, 63,7: 745-52

Martinez M.V., Whitaker J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 195-200

Masuda T., Inaba Y., Takeda Y. 2001. Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49,11: 5560-5565

Mc Evily A.J., Iyengar R., Otwell W.S. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 32: 253-273

Murata M., Tanaka E., Minoura E., Homma S. 2004. Quality of cut lettuce treated by heat shock: Prevention of enzymatic browning, repression of phenylalanin ammonia-lyase activity, and improvement on sensory evaluation during storage. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68,3: 501-507

Plestenjak A. 1990. Vpliv embalaže na trajnost pripravljenega krompirja. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-15

Prestamo G., Palomares L., Sanz P. 2005. Frozen foods treated by pressure shift freezing: proteins and enzymes. *Journal of Food Science*, 70, 1: 21-26

Rama M. V., Narasimham P. 2003. Potatoes and related crops. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol 7. Caballero B, Trugo L. C., Finglas P. M. (eds). Amsterdam, Academic Press: 46658-4666

Rettig M., Sigrist A., Rétey J. 2000. Mimicking the reaction of phenylalanine ammonia lyase by a synthetic model. *Helvetica Chimica Acta*, 83: 2246-2265

Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436

Salobir K. 2000. Antioksidanti v živilih – vpliv na zdravje. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287-294

Santerre C.R., Cash J.N., Vannorman D.J. 1988. Ascorbic acid/citric acid combinations in the processing of frozen apple slices. *Journal of Food Science*, 53: 1713-1716, 1736

Sapers G.M. 1993. Browning of foods: control by sulfites, antioxidantes, and other means. *Food Technology*, 47,10: 75-84

Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. 2000. *Food composition and nutrition tables*. 6th ed. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers: 639-641

Shahidi F., Naczk M. 1995. *Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications*. Lanchester, Basel, Technomic Publishing Company: 313 str.

Simčič M. 1995. Interaktivnost postopkov skladiščenja in antioksidantov na porjavenje eksokarpa jabolka (*Malus domestica* Borkh.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 28-28

Smith O. 1977. *Potatoes: production, storing, processing*. Westport, The Avi Publishing Company: 628-635

Stout M.J., Workman K.V., Workman J.S., Duffey S.S. 1996. Temporal and ontogenetic aspects of protein induction in foliage of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24,7/8: 611-625

Su V., Hsu B.D. 2003. Isolation and sequencing a genomic DNA encoding for phenylalanine ammonia-lyase from *Phalaenopsis*. *DNA Sequencing*, 14,6: 442-449

Taylor S.L., Higley N.A., Bush R.K. 1986. Sulfites in foods: Uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in Food Research*, 30: 1-76

Waterman P.G., Mole S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford, Blackwell Scientific: 238 str.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in vzpodbudo, skrben pregled, koristne nasvete ter predloge pri izdelavi diplomskega dela in še posebno za veliko potrpežljivost se najlepše zahvaljujem mentorici prof. dr. Veroniki Abram.

Zahvaljujem se somentorju prof. dr. Marjanju Simčiču za nasvete in strokovni pregled naloge.

Za nasvete in popravke pri zaključnem oblikovanju diplomskega dela se najlepše zahvaljujem tudi doc. dr. Blažu Cigiću.

Iskreno se zahvaljujem delovni mentorici univ. dipl. inž. kemije Mateji Vidmar za strokovno pomoč pri laboratorijskem delu in za vse nasvete, ki sem jih koristno uporabila. Za nasvete, podporo in pomoč pri delu se zahvaljujem mag. Tomažu Požrlu.

Za pregled naloge se zahvaljujem univ. dipl. inž. Ivici Hočevnar. Zahvaljujem se tudi univ. dipl. bibl. Barbari Slemenik za pomoč pri iskanju in zbiranju literature.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki so mi pomagali pri uresničitvi izdelave diplomske naloge.

Zahvaljujem se mami, ker mi je omogočila študij in vsem svojim najbližjim za pomoč, podporo in potrpljenje v času izdelave diplomskega dela.

