

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Marko GORGIEV

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV FENOLNIH  
SPOJIN IZ POGAČ OLJNE OGRŠČICE IN LANU**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM  
RAPESEED AND FLAXSEED PRESS CAKES**

GRADUATION THESIS  
University studies

**Ljubljana, 2009**

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 doc. dr. Heleno Abramovič in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marko Gorgiev

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 547.56+577.1:633.85.(043)=163.6  
KG oljne pogače/oljna ogrščica/*Brassica napus*/lan/*Linum usitatissimum*/ekstrakti oljnih pogač/fenolne spojine/antioksidativna aktivnost  
AV GORGIEV, Marko  
SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2009  
IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV FENOLNIH SPOJIN IZ POGAČ OLJNE OGRŠČICE IN LANU  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 53 str., 6 pregl., 17 sl., 36 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V sklopu diplomske naloge smo ekstrahirali fenolne spojine iz pogač oljne ogrščice in lanu. Za ekstrakcijo smo uporabili dvoje različnih topil, bolj polarno zmes metanol/voda (70:30 v/v) in manj polarno zmes etanol/voda (96:4 v/v). Nato smo določili koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktih (Folin – Ciocalteu metoda) ter njihovo antioksidativno učinkovitost. Izkazalo se je, da je bila ekstrakcija z metanolom bolj učinkovita od ekstrakcije z etanolom. Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo raziskali s štirimi različnimi metodami (analiza sposobnosti redukcije kovinskih ionov, analiza sposobnosti lovljenja radikalov-DPPH• metoda, določitev antioksidativne učinkovitosti v vodni emulziji linolne kisline in analiza sposobnosti keliranja kovinskih ionov). Vsi ekstrakti so pokazali antioksidativno učinkovitost. V primerjavi s komercialnima antioksidantoma (askorbinsko kislino in butiliranem hidroksitoluenom) so v modelnih testih preiskovani ekstrakti pokazali boljšo sposobnost redukcije in lovljenja prostih radikalov. V emulziji pa so pokazali slabšo antioksidativno učinkovitost kot butilirani hidroksi toluen. Ugotovili smo tudi, da imajo boljšo antioksidativno učinkovitost metanolni ekstrakti.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 547.56+577.1:633.85.(043)=163.6  
CX press cakes/rapeseed/*Brassica napus*/flaxseed/*Linum usitatissimum*/press cakes  
extracts/phenolic compounds/antioxidant activity  
AU GORGIEV, Marko  
AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and  
Technology  
PY 2009  
TI ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM RAPESEED  
AND FLAXSEED PRESS CAKES  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO X, 53 p., 6 tab., 17 fig., 36 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In our graduation work we have extracted phenolic compounds from the press cakes  
of rapeseed and flaxseed. We used solvents of different polarity mixture  
methanol/water (70:30 v/v) and mixture ethanol/water (96:4 v/v). Then we  
determined the concentration of phenolic compounds and their antioxidant  
efficiency. We determined the concentration of phenolic compounds with Folin -  
Ciocalteu method and found that the rapeseed cake contains more phenolic  
compounds and that more phenolic compounds were extracted with mixture  
methanol/water than mixture ethanol/water. We determined the antioxidant activity  
of extracts using four different methods; reducing power, DPPH• assay, antioxidant  
activity in emulsified linoleic acid and chelating activity of Fe<sup>2+</sup>. As determined in  
model tests investigated extracts showed higher reducing power and radical  
scavenging efficiency comparing to the commercial antioxidants (ascorbic acid and  
butylated hydroxytoluene). In emulsion the antioxidant activity of the investigated  
extracts was poorer than that of butylated hydroxytoluene. We have also found that  
methanol extracts had better antioxidant activity than ethanol extracts.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE.....	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	3
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 OLJNA OGRŠČICA .....	4
2.2 LAN.....	5
2.3 AVTOOKSIDACIJA .....	7
2.4 FENOLNE SPOJINE .....	9
<b>2.4.1 Flavonoidi.....</b>	<b>11</b>
2.5 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST FENOLNIH SPOJIN .....	12
<b>2.5.1 Analiza sposobnosti redukcije.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5.2 Analiza DPPH• .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5.3 Beljenje β-karotena .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5.4 Sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni.....</b>	<b>15</b>
2.6 STRANSKI PROIZVODI.....	15
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 MATERIALI.....	17
<b>3.1.1 Ostanki semen po stiskanju (pogače) .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2 Reagenti in pribor .....</b>	<b>18</b>
3.2 METODE .....	20
<b>3.2.1 Določanje skupnih fenolnih spojin v pogači semen.....</b>	<b>20</b>
3.2.1.1 Ekstrakcija.....	20
3.2.1.2 Folin – Ciocalteu metoda .....	21
3.2.1.3 Priprava umeritvene krivulje.....	22

3.2.2	Analiza sposobnosti redukcije.....	24
3.2.3	Analiza DPPH• .....	24
3.2.4	Beljenje $\beta$ -karotena .....	25
3.2.5	Sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni.....	26
3.2.6	Statistična analiza.....	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>27</b>
4.1	VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN .....	27
4.2	SPOSOBNOST REDUKCIJE.....	30
4.3	ANALIZA DPPH•.....	32
4.4	BELJENJE $\beta$ -KAROTENA .....	36
4.5	SPOSOBNOST TVORBE KOMPLEKSOV S KOVINSKIMI IONI .....	38
<b>5</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>48</b>

## ZAHVALA

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Skupine fenolnih spojin v rastlinah (Balasundram in sod., 2006) .....	11
Preglednica 2: Volumen ( $V$ ) izhodne raztopine, masne koncentracije klorogenske kisline v mikrocentrifugirki ( $\gamma_{k.k.}$ ) in vrednosti izmerjene absorbance ( $A_{765}$ ) .....	22
Preglednica 3: Vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu (mg klorogenske kisline/ g razmaščene pogače).....	27
Preglednica 4: Sposobnost redukcije ekstraktov iz razmaščenih pogač oljne ogrščice, lanu ter askorbinske kisline in primerjava sposobnosti redukcije ekstraktov iz razmaščenih pogač proti askorbinski kislini.....	31
Preglednica 5: Nakloni linearnega dela krivulj in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH• .....	34
Preglednica 6: Koeficienti antioksidativne učinkovitosti v emulziji ( $C_{AO}$ ) iz ekstraktov razmaščenih pogač in BHT .....	37

## KAZALO SLIK

Slika 1: Polje oljne ogrščice (Koren, 2006) .....	4
Slika 2: Navadni lan (Hassler, 2004) .....	6
Slika 3: Nastanek nekaterih sekundarnih produktov iz šikimske kisline in aromatskih aminokislin (Abram in Simčič; 1997).....	10
Slika 4: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006).....	11
Slika 5: Shema ekstrakcijskega postopka .....	21
Slika 6: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino .....	23
Slika 7: Vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu (mg klorogenske kisline/ g razmaščene pogače) .....	28
Slika 8: Odvisnost absorbance od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi.....	30
Slika 9: Sposobnost redukcije askorbinske kisline ter ekstraktov iz razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu .....	31
Slika 10: Delež DPPH•, ki je preostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi .....	33
Slika 11: Koncentracije fenolnih spojin in koncentracija BHT, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH• ( $ED_{50}$ %) .....	35
Slika 12: Odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti v reakcijski emulziji ( $C_{AO}$ ) od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C za ekstrakte iz razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu ter BHT .....	37
Slika 13: Odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti v emulziji ( $C_{CA}$ ) od masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakte iz razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu .....	39
Slika 14: Odvisnost koeficienta sposobnosti tvorbe kompleksov ( $C_{CA}$ ) od masne koncentracije EDTA v reakcijski zmesi .....	40
Slika 15: Koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov ( $C_{CA}$ ) za ekstrakte razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu pri masni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 10 µg/mL .....	41



Slika 16: Koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov ( $C_{CA}$ ) za ekstrakte razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu pri masni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 30 $\mu\text{g/mL}$ .....	41
Slika 17: Koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov ( $C_{CA}$ ) za ekstrakte razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu pri masni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 50 $\mu\text{g/mL}$ .....	42

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AH – antioksidant

BHA – butilirani hidroksianizol

BHT – butilirani hidroksitoluen

$C_{CA}$  – koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov (chelating activity)

$C_{AO}$  - koeficient antioksidativne učinkovitosti

CRP – ciljni raziskovalni program

DPPH• – 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

FC - Folin – Ciocalteu

IHPS - Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

PG – propil galat

R• – radikal

RH – maščobna kislina

ROO• – peroksilni radikal

ROOH – peroksid

TBHQ – terciarni butil hidrokinon

$\gamma$  – masna koncentracija

## 1 UVOD

Oljna ogrščica in lan sta zelo stari oljarici, saj ju omenjajo že v antiki, danes pa sta pomembni oljarici zmerno toplega območja. Ob omembi oljne ogrščice pomislimo na pridobivanje biodizla, lan pa nas spomni na lanena oblačila. Vendar je v svetu zasejana večina oljnega – in ne predivnega – lanu (skoraj 90 % površin) in tudi olje oljne ogrščice je zelo iskano zaradi svoje ugodne maščobnokislinske sestave. Lan in oljna ogrščica imata veliko pozitivnih učinkov na zdravje, semena lanu se uporabljajo za zunanje obkladke, olje pa lajša težave pri žolčnih kamnih, vnetjih prebavil, sečil, kože in dihal ter znižuje telesno temperaturo. Oljna ogrščica ima visoko vrednost omega-3 maščobnih kislin, ki so v varovalni prehrani zelo cenjene.

Olje oljne ogrščice in lanu pridobivajo tako, da semena zdrobijo, stisnejo in olje nato za prehranske namene prečistijo. Pri pridobivanju olja nastane poleg glavnega produkta olja tudi pogača kot stranski produkt, v kateri je vsebnost biološko pomembnih spojin zelo visoka. Če te stranske produkte zavržemo, je velika količina teh spojin izgubljena. Pogača se je v preteklosti pogosto uporabljala kot gnojilo oziroma krma zaradi visoke vsebnosti proteinov. Zaradi visoke vsebnosti biološko pomembnih spojin se stranskim proizvodom pridelave olja sedaj namenja več pozornosti – kot surovini za pridobivanje visoko vrednih učinkovin. Lahko bi se namreč uporabljale kot živilski dodatki ter pri pripravi funkcionalnih živil in nutraceutikov. Med temi bioaktivnimi substancami so zaradi svojih značilnosti zelo pomembne fenolne spojine.

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo v rastlinskih celicah. V rastlinah imajo pomembne morfološke in fiziološke lastnosti. Akumulirajo se predvsem v epidermalnem tkivu rastline, v celici so v vakuoli ali pa so vezane na celične stene. Rastline ščitijo pred škodljivci in drugimi stresnimi dejavniki, prispevajo k barvi in okusu sadja ter zelenjave in so pomembne pri rasti in reprodukciji rastlin. Fenolne spojine imenujemo tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in eno ali več hidroksilnih skupin, ki so neposredno vezane na aromatski obroč. Za fenolne spojine so ugotovili, da imajo antioksidativne lastnosti. Imajo sposobnost lovljenja radikalov, darovanja vodikovih

atomov ali elektronov in vezave kovinskih kationov ter sposobnost inhibicije encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek radikalov. Pripisujejo jim pozitivne učinke na zdravje, saj delujejo protivnetno, antialergijsko, antimutageno in antikancerogeno. Zaradi ozaveščenosti kupcev in njihove želje po naravnih sestavinah so fenolne spojine predmet številnih raziskav za uporabo kot dodatki živilom. Vendar so študije, ki potrjujejo pozitivne učinke fenolnih spojin opravljene večinoma v modelnih sistemih, manj je aplikacij na živilih. Šele takrat pa se bo zaradi interakcij s samim živilom pokazala njihova prava vrednost.

## 1.1 NAMEN NALOGE

V okviru diplomske naloge smo želeli v pogači oljne ogrščice in pogači lanu določiti količino skupnih fenolnih spojin in dokazati njihovo antioksidativno učinkovitost. Prav tako smo želeli ugotoviti vpliv različno polarnih topil na učinkovitost ekstrakcije in na antioksidativno učinkovitost ekstraktov.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da bomo z različno polarnimi topili ekstrahirali različne količine fenolnih spojin. Pričakujemo tudi, da bomo lahko dokazali različen antioksidativni učinek pridobljenih ekstraktov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OLJNA OGRŠČICA

Oljna ogrščica (*Brassica napus*) je pomembna oljarica hladnejših območij, čeprav njeni predniki izvirajo iz toplejšega Sredozemlja in jugovzhodne Azije. V rodu *Brassica* je več kot 30 vrst, ki so nastale z naravnim križanjem, nekatere novejšje pa so rezultat žlahtnjenja. Domneva se, da je današnja ogrščica nastala šele v 17. stoletju z naravnim križanjem. Industrijsko stiskanje olja iz semena ogrščice se je razširilo v šestdesetih letih 20. stoletja, ko so požlahtnili in uvedli v pridelavo sorte, iz katerih pridobivajo olje z malo ali brez zdravju škodljive eruka kisline in glukozinolatov. Ogrščica je v Evropi postala gospodarsko pomembna poljščina (največ je posejejo v Nemčiji) za pridobivanje jedilnega olja in tudi kot surovina za biogorivo. Pri nas je oljna ogrščica prisotna od okoli leta 1780, ko je njeno pridelovanje spodbujala dunajska vlada.



Slika 1: Polje oljne ogrščice (Koren, 2006)

Olje pridobivajo tako, da seme najprej zdrobijo, stisnejo in olje za jedilne namene prečistijo. Surovo ogrščično olje je temnorumeno, prečiščeno pa svetlorumeno. Semena, iz katerih pridobivamo olje za prehrano ali industrijo vsebujejo 20 do 60 % maščob. Vsebnost olja v semenu pa je odvisna tako od sorte kot tudi načina pridelovanja, rastnih razmer in od načina predelave. Novejšje sorte vsebujejo v semenu približno 50 % kakovostnega olja, 15

do 25 % beljakovin, minerale in vitamine. Olje oljne ogrščice se uporablja v jedilne namene, za cvrtje, saj je obstojnejše od sončničnega in sojinega olja tudi po večkratnem pogrevanju. Uporablja se ga tudi v tehnične namene, kot neprečiščeno za mazanje strojnih delov, v industriji pralnih sredstev, tekstila in za strojenje usnja. Ogrščično olje se kot eden izmed obnovljivih virov uporablja za biodizel, ki ga pridobijo z zaestrenjem olja. Pogače oljne ogrščice so beljakovinsko bogate in se uporabljajo kot dodatek k živalski krmi. Ponekod pogačo zažgejo, pepel pa uporabijo kot gnojilo (Kocjan Ačko, 1999b).

## 2.2 LAN

Lan je prastara rastlina, njegovo seme je najstarejši vir rastlinskih maščob. O uporabi lanu pričajo najdišča semen, olja in izdelkov iz lanenih vlaken v Sumeriji, Mezopotamiji in Egiptu iz obdobja okoli pet tisoč let pred našim štetjem. Laneno seme in olje so uporabljali za zdravila, z oljem so si svetili, iz lanenih niti so tkali platno, iz njega pa krojili obleke. Na naših tleh so mostiščarji pustili za seboj lanene izdelke, o uporabi lanu piše tudi Valvazor v svojem delu Slava vojvodine Kranjske. Danes je po svetu najbolj razširjen navadni lan (*Linum usitatissimum*), ki uspeva na približno 7 mio hektarov, na katerih je večinoma zasejan oljni lan (6 mio hektarov). Lan za olje pridelujejo predvsem v suhem in toplem podnebju jugozahodne Azije, v Evropi pa so glavne pridelovalke Grčija, Italija in Španija.



Slika 2: Navadni lan (Hassler, 2004)

Seme oljnega lanu vsebuje 40 do 50 % maščob, 25 % beljakovin, 4 do 10 % sluzi, prehranske vlaknine, lecitin in vitamine A, B, D, E in F. Uporablja se kot odvajalo pri kroničnem zaprtju, sindromu vzdraženega črevesja in divertikularni bolezni. Iz semen oljnega lanu stisnejo olje, ki ga za jedilne namene večinoma prečistijo. Laneno olje vsebuje nenasičene maščobne kisline (linolno, linolensko), ki so pomembne za ohranjanje zdravja in preprečujejo nabiranje maščob na žilnih stenah in tkivih. Prav tako spada v skupino hitro sušičih olj in ustreza lastnostim tehničnih olj. Nepogrešljivo ni le v farmaciji in kozmetiki, ampak tudi v drugih industrijah, npr. za dodatke v pekarstvu, barvah, lakih, tiskarskih črnilih in pri izdelavi herbicidov. Lanene pogače so beljakovinsko bogate. Sveže, posušene, zmlete oziroma briketirane se uporabljajo kot dodatek v prehrani ljudi in živali (Kocjan Ačko, 1999a).



## 2.3 AVTOOKSIDACIJA

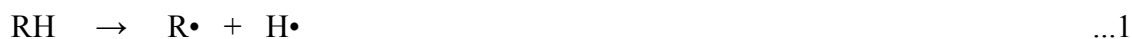
Avtooksidacija je radikalska verižna reakcija, kar pomeni, da so vmesne spojine radikali (spojine z neparnim elektronom). Avtooksidacija vsebuje tri osnovne faze:

Iniciacija - začetek

Propagacija - širjenje

Terminacija - zaključek

V prvi fazi (iniciacija) se odcepi vodikov atom (H) iz maščobno kislinske verige (RH) in nastane radikal (R•) (reakcija 1).



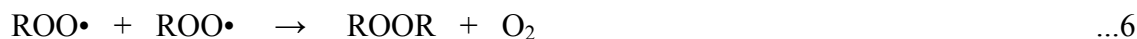
V drugi fazi (propagacija) se nastali radikal združi s kisikom in nastane peroksilni radikal (reakcija 2).



Nastali radikal lahko v hipu pritegne vodikov atom z naslednje lipidne molekule (RH). Tako nastane peroksid in nov radikal, s čimer se nadaljuje propagacija (reakcija 3).



Reakcija se zaključi (terminacija), ko radikali reagirajo med sabo in nastanejo nereaktivni produkti (reakcije 4, 5 in 6). Zaključne reakcije ustavijo ponavljajoče reakcije faze propagacije.

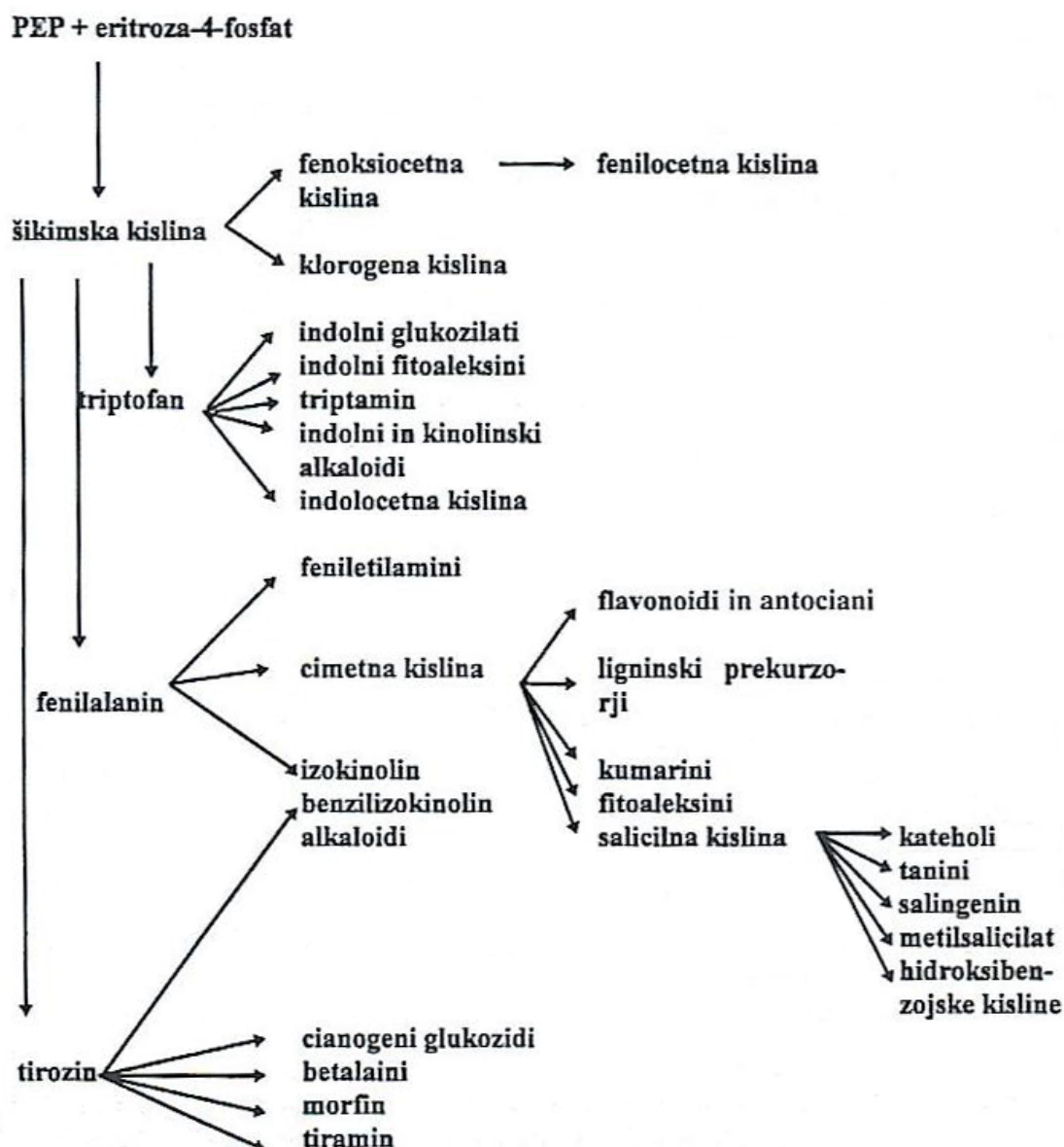


Antioksidanti preprečijo verižne reakcije oksidacije s tem, da se vključijo ali v fazo iniciacije ali propagacije, kar privede do zaključka reakcije in odložitve degradacijskih reakcij. Večina antioksidantov deluje kot lovilci radikalov in zaradi svoje fenolne strukture delujejo kot donorji vodika ali elektronov – to je kot reducenti.

Oksidativne spremembe maščob in olja v živilih in nastanek sekundarnih, potencialno nevarnih spojin, so krive za žarkost ter s tem za znižanje prehranske vrednosti in varnosti živila (Wettasinghe in Shahidi, 1999). Za preprečevanje teh sprememb se v živilstvu uporabljajo antioksidanti, ki so lahko sintetični ali naravnega izvora. Med sintetičnimi se najpogosteje uporabljajo butilirani hidroksianizol (BHA), butilirani hidroksitoluen (BHT), propil galat (PG) in terciarni butil hidrokinon (TBHQ). Zaradi potencialne karcinogenosti sintetičnih antioksidantov in posledično omejene uporabe v živilstvu se povečujejo potrebe po identifikaciji alternativnih naravnih in varnejših virov antioksidantov (Thiyam in sod. 2004). Med naravne antioksidante štejemo tokoferole, polifenole, askorbinsko kislino, karotene in ekstrakte začimb. Zamenjava sintetičnih antioksidantov z naravnimi prinaša prednosti zaradi zdravstvenih implikacij in funkcionalnosti, kot je npr. topnost tako v vodi kot v oljih, odvisno od potrebe v živilu. Vendar imajo nekateri izmed njih, predvsem ekstrakti začimb, omejeno uporabo kljub visoki antioksidativni aktivnosti, ker dajejo živilu karakteristični okus zelišča in so zato potrebni predhodni postopki deodorizacije (Moure in sod., 2001).

## 2.4 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo med intermediati glikolize in pentozofosfatnega cikla preko šikimatne ter po fenilpropanoidni poti v rastlinah (Slika 3) (Randhir in sod., 2004). Te spojine imajo izjemno pomembno fiziološko in morfološko vlogo v rastlinah. So pomembne pri rasti in reprodukciji rastlin, prispevajo k obrambi rastlin pred škodljivci in drugimi stresnimi dejavniki ter prispevajo k barvi in senzoričnim karakteristikam sadja in zelenjave. Vsebnost lahko variira od 0,5 do 5,0 g na 100 g suhe mase rastlinskih tkiv. Pozitivne učinke fenolnih spojin pripisujejo njihovi antioksidativni učinkovitosti in bi lahko bile naravni vir antioksidantov v živilih (Sun in Ho, 2005; Srivastava in sod., 2006).



Slika 3: Nastanek nekaterih sekundarnih produktov iz šikimske kisline in aromatskih aminokislin (Abram in Simčič; 1997)

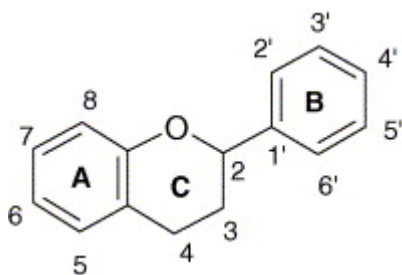
Strukturno fenolne spojine sestavljajo en ali več aromatskih obročev, na katere je vezana najmanj ena hidroksilna spojina in se pojavljajo kot preproste fenolne molekule do visoko polimeriziranih spojin (Bravo, 1998). Kljub strukturni raznolikosti se to skupino spojin pogosto imenuje polifenoli. Čeprav je posledica take strukturne raznolikosti velik razpon fenolnih spojin, ki se pojavljajo v naravi, se jih lahko razvrsti v osnovne skupine, kot je prikazano v preglednici 1.

Preglednica 1: Skupine fenolnih spojin v rastlinah (Balasundram in sod., 2006)

Skupina	Struktura
Preprosti fenoli, benzokinoni	$C_6$
Hidroksibenzojske kisline	$C_6 - C_1$
Fenilacetne kisline	$C_6 - C_2$
Hidroksicimetne kisline, fenilpropeni (kumarini, izokumarini)	$C_6 - C_3$
Naftokinoni	$C_6 - C_4$
Ksantoni	$C_6 - C_1 - C_6$
Stilbeni, antrakinoni	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoidi, izoflavonoidi	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignani, neolignani	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoidi	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Lignini	$(C_6 - C_3)_n$
Kondenzirani tanini (proantocianidini ali flavanoli)	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

### 2.4.1 Flavonoidi

Flavonoidi so največja skupina rastlinskih fenolnih spojin, saj predstavljajo več kot polovico od osem tisoč fenolnih spojin, ki se nahajajo v naravi. Flavonoidi so spojine z majhno molekulsko maso, zgrajeni so iz 15 ogljikovih atomov, urejenih v  $C_6-C_3-C_6$  strukturo. Strukturno so flavonoidi sestavljeni iz dveh aromatskih obročev A in B, ki sta povezana z mostom iz treh ogljikov v obliki heterocikličnega obroča C, kot je prikazano na sliki 4. V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. Zaradi grenkega okusa odganjajo parazite in ker lahko absorbirajo UV svetlobo, delujejo kot zaščita rastline pred UV žarki (Abram, 2000).



Slika 4: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006)

## 2.5 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST FENOLNIH SPOJIN

Antioksidativna aktivnost fenolnih spojin je posledica ali njihove sposobnosti lovljenja radikalov ali vezave kovinskih kationov ali sposobnosti inhibicije encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek radikalov. Antioksidant je molekula, ki zavira oziroma preprečuje proces oksidacije drugih molekul. Struktura fenolnih spojin določa njihovo sposobnost lovljenja radikalov in keliranja. Pri fenolnih kislinah antioksidativna učinkovitost narašča s številom hidroksilnih skupin na benzenovem obroču in se zmanjša, če hidroksilno skupino na tretjem in petem C-atomu v benzenovem obroču nadomesti metoksilna skupina (Balasundram in sod., 2006).

Antioksidanti lahko deaktivirajo radikale preko dveh glavnih mehanizmov: preko prenosa vodikovega atoma (reakcija 7) ali preko prenosa elektrona (Huang in sod., 2005).



Metode za določanje antioksidativne učinkovitosti, ki temeljijo na prenosu elektrona merijo sposobnost antioksidantov prenesti elektron, ki reducira katerokoli spojino, tako kovine kot radikale (reakcija 8).



Oba mehanizma se skoraj vedno pojavljata skupaj v vseh vzorcih, prevladujoči mehanizem pa določa struktura antioksidantov in pH sistema (Prior in sod., 2005).

Možne zdravstvene koristi polifenolov so odvisne od njihove absorpcije in metabolizma, ki ju določajo njihova struktura, konjugacija z drugimi fenoli, stopnja glikoliziranosti, molska masa in topnost. Za polifenole v zeliščih, sadju in zelenjavi se pogosto domneva, da imajo pomembno fiziološko vlogo pri ohranjanju dobrega zdravja. Pozitivne učinke polifenolov pripisujejo njihovi antioksidativni učinkovitosti, sposobnosti lovljenja radikalov in interakcijami z drugimi molekulami, kot so proteini in polisaharidi (Silva in sod., 2008). Raziskave kažejo izjemno pomembno vlogo polifenolnih komponent z antioksidativno

učinkovitostjo, pomembne pa so tudi kot deli drugih mehanizmov, ki prispevajo k antikarcinogenim, protivirusnim, protivnetnim in kardiozaščitnim lastnostim (Swanson, 2003).

Polifenoli igrajo pomembno vlogo tako v rastlinah kot tudi v živilih. V živilski industriji se največ uporabljajo kot barvila in antioksidanti. Kot antioksidanti se uporabljajo v izdelkih, ki vsebujejo maščobe in olja, podaljšajo namreč rok trajanja živila – ta je omejen zaradi poslabšanja lastnosti, ki so posledica oksidacijskih reakcij. Antioksidanti so pomembni tudi za ohranjanje prehranske in senzorične vrednosti živil (Murkovic, 2003).

### **2.5.1 Analiza sposobnosti redukcije**

Redukcijska sposobnost določene spojine lahko deluje kot pomemben indikator njene potencialne antioksidativne učinkovitosti. Med analizo sposobnosti redukcije prisotnost reducentov (antioksidantov) v preiskovanih vzorcih vodi v redukcijo železovih (III) ionov ( $\text{Fe}^{3+}$ ) do železovih (II) ionov ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in povzroči znižanje vsebnosti  $\text{Fe}^{3+}$ /fericianidnega kompleksa, kar zasledujemo z merjenjem absorbance pri 740 nm.

### **2.5.2 Analiza DPPH•**

V bioloških in živilskih sistemih nastaja veliko različnih radikalov. Pri ugotavljanju sposobnosti antioksidantov za lovljenje radikalov se v veliki meri uporablja DPPH• radikal, ki je eden redkih stabilnih organskih radikalov. Metoda temelji na reakciji DPPH• radikala z antioksidantom, pri čemer gre predvsem za prenos elektrona (Foti in sod., 2004). Sposobnost antioksidanta, da vstopi v reakcijo z DPPH• radikalom in s tem zniža vsebnost omenjenega radikala, se lahko oceni z elektronsko spinsko resonanco ali spektrofotometrično (Prior in sod., 2005). Pri analizi smo lovljenje DPPH• radikala spremljali tako, da smo zasledovali znižanje absorbance pri valovni dolžini 517 nm, kjer je absorpcijski maksimum radikala. Boljša kot je antioksidativna učinkovitost, manjši delež radikala preostane v reakcijski zmesi in nižja je absorbanca. Prednost te metode je njena preprostost. Zato je zelo razširjena in splošno uporabljena za določanje antioksidativne učinkovitosti. Težave se pojavijo, ko analiziran vzorec vsebuje snovi, ki imajo podoben absorpcijski spekter pri karakteristični valovni dolžini kot DPPH•. Take interference še posebej ustvarjajo karotenoidi in drugi pigmenti (Prior in sod., 2005).

### **2.5.3 Beljenje $\beta$ -karotena**

Živila so po svoji sestavi heterogeni sistemi. Zato je smiselno določiti tudi antioksidativno učinkovitost preiskovanih ekstraktov tudi v emulziji. V ta namen mnogi avtorji (Sun in Ho, 2005; Suja in sod., 2005; Wettasinghe in Shahidi, 1999; Matthäus, 2002a) izberejo metodo beljenja  $\beta$ -karotena. Pri tej analizi ob zvišani temperaturi (50 °C) inkubiramo emulzijo linolne kisline v vodi v prisotnosti  $\beta$ -karotena. Radikal linolne kisline (peroksilni radikal), ki nastane kot posledica oksidacije linolne kisline, reagira z molekulo  $\beta$ -karotena. To spremeni strukturo molekule  $\beta$ -karotena, ki posledično izgubi svojo karakteristično oranžno barvo. Obseg beljenja (razbarvanja)  $\beta$ -karotena lahko zmanjšamo z dodatkom antioksidanta, ki bolj ali manj uspešno "tekmuje" z  $\beta$ -karotenom v reakciji z peroksilnimi radikali (Prior in sod., 2005).



#### **2.5.4 Sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni**

V lipidnih sistemih prisotni kovinski ioni delujejo kot prooksidanti, torej pospešujejo oksidacijo lipidov in s tem njihov kvar. Določitev sposobnosti tvorbe kompleksov fenolnih s kovinskimi ioni temelji na dejstvu, da se v prisotnosti teh spojin poruši struktura kompleksa: izbrani komercialni kelator (ferozin) - kovinski ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ). To posledično privede do zmanjšanja intenzitete rdeče barve. Nižja absorbanca pomeni večjo sposobnost ekstraktov za tvorbo kompleksov s kovinskimi ioni (Juntachote in Berghofer, 2005).

#### **2.6 STRANSKI PROIZVODI**

Pri predelavi sadja, zelenjave in oljnih semen nastanejo velike količine odpadnih materialov kot so olupki, semena, pečke in oljne pogače (Oreopoulou in Tzia, 2007). Odstranitev teh odpadnih materialov predstavlja problem, saj so biološko nestabilni in lahko pride do razvoja patogenih mikroorganizmov. Vsebujejo velik delež vode (od 70 do 95 % mase odpadkov), kar podraži transport, odstranitev te vode pa lahko vodi tudi do nadaljnjih težav pri ravnanju z odpadno vodo, ki vsebuje veliko organskega materiala. Odpadki z visoko vsebnostjo maščob so dovzetni za oksidacijo, kar lahko privede do sproščanja neprijetnih vonjev. V zadnjem času se živilska industrija sooča z izzivi, kako spremeniti predelavo hrane v smeri zmanjšanja odpadkov in povečanja koristnih stranskih proizvodov (Schieber in sod., 2001; Obeid in sod., 2005). V preteklosti so agroindustrijske odpadke večinoma uporabljali kot gnojilo ali krmo. V zadnjem obdobju se v teh odpadkih ugotavlja prisotnost bioaktivnih substanc in možnost uporabe le teh kot dodatke živilom z namenom zvišanja njihove prehranske vrednosti (Matthäus, 2002b; Hagerman in sod., 1998). Fitokemične ekstrakte (antioksidante, barvila, arome) se lahko uporablja zaradi njihovih bioloških lastnosti kot nutraceutike, kot dodatke funkcionalnim živilom ali zaradi njihovih lastnosti, ki ohranjajo oziroma izboljšujejo kvaliteto živil (Abramovič in sod. 2008).

Med pridelavo olj po stiskanju semen dobimo olje in oljno pogačo kot stranski produkt. Pogačo lahko uporabljamo kot gorivo, vendar je iz ekonomskega vidika učinkovite organizacije proizvodnje olj bolje ostanek po stiskanju uporabiti kot produkt z dodano vrednostjo (Matthäus, 2002b).

Ker ima pogača veliko beljakovin, se pogosto uporablja kot krma za živino. Vsebuje pa tudi veliko bioaktivnih substanc, kot so fenolne spojine, ki bi se lahko uporabljale kot fungicidi in baktericidi ali pa kot naravni antioksidanti za zaščito maščob in olj pred avtooksidacijo (Barberan, 2007). Prisotnost teh spojin v stranskih produktih živilske industrije in pogačah po stiskanju olj dokazujejo številne raziskave (Matthäus, 2002a; Suja in sod., 2005; Peschel in sod., 2007; Obied in sod., 2005), kar potrjuje uporabnost stranskih produktov v različne namene; kot nutracevtiki, dodatki funkcionalnim živilom, kot aditivi za izboljšanje kvalitete živil.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 Ostanki semen po stiskanju (pogače)**

Za analize smo uporabili pogači oljne ogrščice in lanu. Pogače smo dobili na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, kjer poteka raziskava v okviru CRPa: Proizvodnja surovin in izdelava biodizla in biomaziv za potrebe slovenskega trga; nosilec projekta je Barbara Čeh.

Lan je domače seme proizvajalca Rengea, ime sorte ni znano. Oljna ogrščica je hibrid Toccata. Olnjici sta zrasli na lokaciji poskusnega posestva IHPS v letu 2007 v okviru navedenega CRPa.

Olnjice so bile stisnjene na poskusni stiskalnici na Kmetijskem inštitutu - Oddelek za kmetijsko tehniko. Semena pred stiskanjem niso bila pražena, gre za hladno stiskanje. Semena so pred stiskanjem olja zdrobili in ob drobljenju in mešanju dosegli maksimalno temperaturo med 30 in 40 °C. Pogače so bile do analiz shranjene v hladilniku pri temperaturi 5 °C šest mesecev.

### 3.1.2 Reagenti in pribor

Za analize smo uporabljali naslednje reagente:

- $\beta$ -karoten (čistost >97 %, Fluka, Švica)
- DPPH• reagent (Sigma, Nemčija)
- etanol (96 %, Merck, Nemčija)
- ferozin (Sigma, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Švica)
- kalijev dihidrogenfosfat(V) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)
- kalijev heksacianoferat(II) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)
- kloroform (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- klorogenska kislina (čistost >95 %, Sigma, Nemčija)
- linolna kislina (čistost >95 %, Sigma, Nemčija)
- metanol (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- n-heksan (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- natrijev karbonat (analitske čistosti, Alkaloid, Makedonija)
- natrijev hidrogenfosfat(V) (analitske čistosti, Zorka, Šabac, Srbija)
- trikloroacetna kislina (čistost 99,5 %, Merck, Nemčija)
- Tween 20 detergent (Sigma, Nemčija)
- železov(III) klorid (čistost >99 %, Carlo Erba Reagenti, Italija)
- železov(II) klorid (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)

Za pripravo raztopin smo uporabljali bidestilirano vodo.

Uporabljali smo sledeče aparature in pribor:

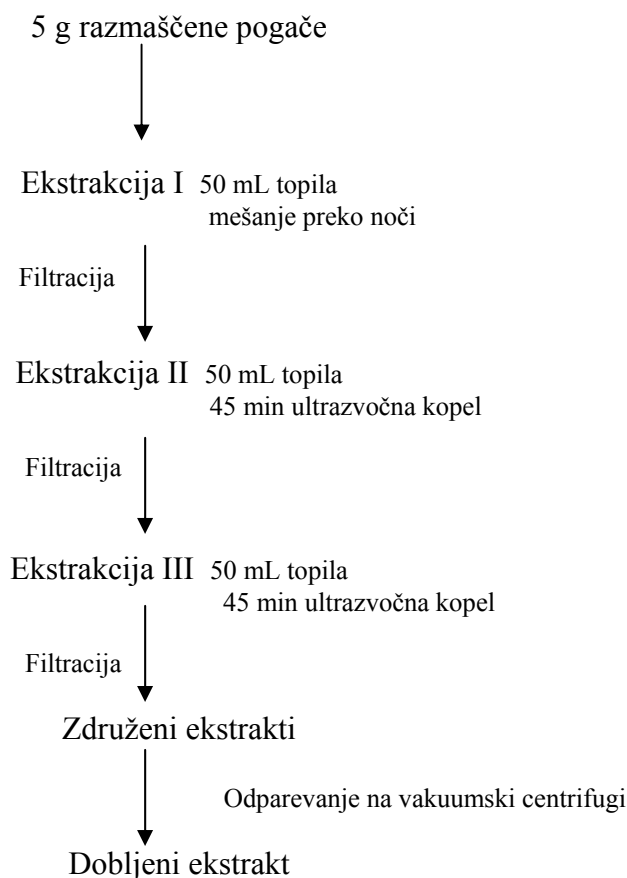
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija)
- magnetno mešalo (IKA<sup>®</sup> RH basic KT/C, Nemčija)
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica)
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, Združene države Amerike)
- tehtnica (Mettler Toledo AT201, Švica)
- ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52, Nemčija)
- vakuumška centrifuga (GeneVac HT-4 series II, Združene države Amerike)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Določanje skupnih fenolnih spojin v pogači semen

#### 3.2.1.1 Ekstrakcija

Približno 6 gramov pogače smo strli v terilnici in razmastili s 60 mL heksana z mešanjem v erlemajerici na magnetnem mešalu čez noč in nato filtrirali. Preostanek po razmastitvi (približno 5g) smo ekstrahirali z dvema različnima topiloma – zmes etanol/voda (96:4 v/v) in zmes metanol/voda (70:30 v/v). Postopek ekstrakcije je bil opravljen po modificirani metodi, opisani v literaturi (Matthäus, 2002a) in je shematsko prikazan na sliki 5. Ekstrakcijo smo izvedli pri sobni temperaturi v treh stopnjah tako, da smo topilo vsakokrat filtrirali in nadomestili s svežim. Prva stopnja ekstrakcije je potekala čez noč, naslednji dve pa dvakrat po 45 minut z mešanjem v ultrazvočni kopeli pri sobni temperaturi.



Slika 5: Shema ekstrakcijskega postopka

Suhi preostanek po odparevanju ekstrakcijskega topila smo raztopili v ustreznem topilu (metanolni ekstrakt v metanolu, etanolni ekstrakt v etanolu).

### 3.2.1.2 Folin – Ciocalteu metoda

Postopek določitve vsebnosti skupnih fenolnih spojin je povzet po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). V mikrocentrifugirko smo odmerili 0,2 mL raztopine dobljenega ekstrakta, mu dodali 0,125 mL Folin – Ciocalteu reagenta (razredčen z vodo v razmerju 1:1, v/v) ter premešali. Nato smo dodali 0,125 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata in dopolnili z vodo do 1 mL; ponovno smo premešali in v Eppendorfovi centrifugi 5415c centrifugirali 10 minut pri 13000 obr/min. Po 40 minutah od dodatka vode smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm,  $A_{765}$ , proti slepemu vzorcu, ki je bil pripravljen po

istem postopku, le da je bila namesto ekstrakta dodana destilirana voda. Vsako meritev smo opravili v treh ponovitvah.

### 3.2.1.3 Priprava umeritvene krivulje

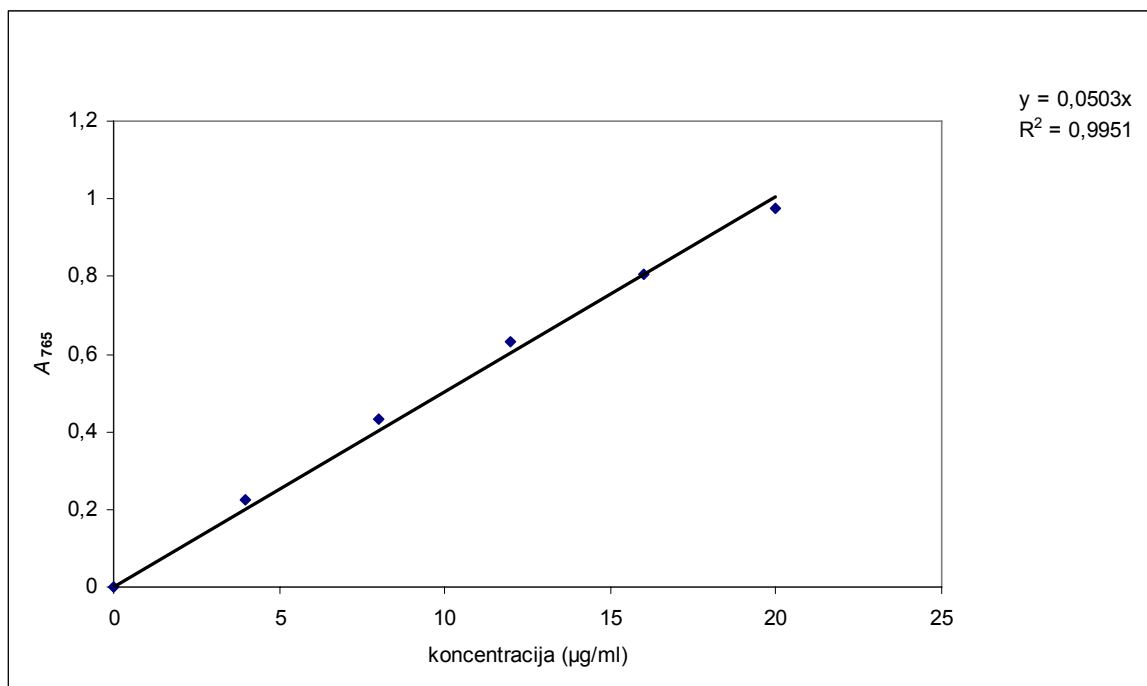
Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili klorogensko kislino. V 25 mL bučko smo zatehtali 10 mg klorogenske kisline, jo raztopili v destilirani vodi in razredčili raztopino do 25 ml. Koncentracija pripravljene izhodne raztopine je bila 400  $\mu\text{g/mL}$ . V epice smo dodali različno izbrane volumne izhodne raztopine in v skladu s Folin – Ciocalteu metodo izmerili absorbanco. V preglednici so podane vrednosti za masno koncentracijo klorogenske kisline v mikrocentrifugirki,  $\gamma_{k.k.}$  in vrednosti izmerjene absorbance.

Preglednica 2: Volumen ( $V$ ) izhodne raztopine klorogenske kisline, masne koncentracije klorogenske kisline v mikrocentrifugirki ( $\gamma_{k.k.}$ ) in vrednosti izmerjene absorbance ( $A_{765}$ )

$V(\mu\text{l})$	$\gamma_{k.k.}(\mu\text{g/ml})$	$A_{765}$
10	4	0,223887
20	8	0,431063
30	12	0,633277
40	16	0,804547
50	20	0,97343

Iz izmerjene absorbance in masne koncentracije klorogenske kisline smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijsko analizo smo določili koeficient naklona premice (umeritvene krivulje), ki je prikazana na sliki 6. Vrednost koeficienta  $k$  je  $0,0503 (\mu\text{g/ml})^{-1} \pm 0,0002$  ( $R=0,9951$ ).





Slika 6: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v mikrocentrifugirki smo izračunali iz zveze:

$$\gamma_{k.k.} = A_{765} / k \quad \dots 9$$

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v razmaščeni pogači smo izrazili kot miligrame klorogenske kisline na gram razmaščenih semen. Izračunali smo jo iz koncentracije skupnih fenolnih spojin v mikrocentrifugirki, razredčitve ekstrakta in mase razmaščene pogače.

### 3.2.2 Analiza sposobnosti redukcije

Sposobnost redukcije smo določili v skladu s postopkom, ki so ga opisali Juntachote in sodelavci (2006). V epruvete smo odpipetirali 0,5 mL dobljenega ekstrakta različnih koncentracij in jim dodali 2,5 mL fosfatnega pufru (pH=6,8), 2,5 mL kalijevega heksacianoferata(II) (1 % raztopina) in 2,5 mL trikloroacetne kisline (20 % raztopina) ter premešali. Dobljeno mešanico smo dali v Eppendorfovo centrifugo 5415c za 15 minut pri 13000 obr/min. Po centrifugiranju smo vzeli 2,5 mL supernatanta, mu dodali 2,5 mL destilirane vode in 1 mL železovega(III) klorida ter po 25 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 740 nm,  $A_{740}$ , proti slepemu vzorcu, ki je bil pripravljen po istem postopku, le da je bilo namesto ekstrakta dodano ustrezno topilo. Vsako meritev smo opravili v treh ponovitvah.

### 3.2.3 Analiza DPPH•

Analizo sposobnosti lovljenja radikalov smo povzeli po metodi, ki so jo opisali Brand-Williams in sodelavci (1995). Postopali smo tako, da smo k 2,9 mL etanolne raztopine DPPH• ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dodali 0,1 mL raztopine ekstrakta, premešali in 30 minut v ustreznem časovnem intervalu merili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm,  $A_{vz517}$ , proti slepemu vzorcu. Za slepi vzorec smo uporabili etanol. Vsako meritev smo opravili v treh ponovitvah. Pomerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca,  $A_{k517}$ , ki je vseboval 2,9 mL raztopine DPPH• in 0,1 mL etanola in je imel začetno absorbanco približno 1,1.

### 3.2.4 Beljenje $\beta$ -karotena

Postopek določitve antioksidativne učinkovitosti z metodo beljenja  $\beta$ -karotena smo opravili v skladu z metodo, ki so jo opisali Moure in sodelavci (2000). V bučko smo zmešali 1 mL raztopine  $\beta$ -karotena v kloroformu (0,2 mg/ml), 0,02 mL linolne kisline (analitske čistosti) in 0,2 mL detergenta Tween 20. Premešali in na rotavaporju odpareli topilo. K preostanku po odparevanju smo počasi dodali 50 mL oksigenirane destilirane vode (pripravil smo jo z 10 minutnim stresanjem v erlemajerici) in s stresanjem pripravimo emulzijo. Emulzijo smo razporedili po 5 mL v epruvete, v katere smo dodali vzorec ekstraktov z enakimi koncentracijami fenolnih spojin. Zmes smo izpostavili termični avtooksidaciji pri 50 °C za dve uri. Absorbanco,  $A_{vz\ 470}$ , smo merili vsakih 10 minut pri valovni dolžini 470 nm proti slepemu vzorcu, ki je vseboval emulzijo brez  $\beta$ -karotena. Absorbanco smo izmerili v treh paralelkah. Pomerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca,  $A_{k\ 470}$ , ki smo ga pripravili tako, da smo namesto vzorca dodali ustrezno topilo.

### 3.2.5 Sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni

Metoda je povzeta in modificirana po metodi, ki sta jo opisala Decker in Welsch (1990). 1 mL ekstrakta smo dodali 3,7 mL ustreznega topila, 0,1 mL raztopine železovega(II) klorida ( $0,002 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in 0,2 mL raztopine ferozina ( $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), premešali, pustili 10 minut na sobni temperaturi in zatem izmerili absorbanco pri karakteristični valovni dolžini 562 nm,  $A_{\text{vz } 562}$ . Za slepi vzorec smo uporabili čisti metanol. Pomerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca,  $A_{\text{k } 562}$ , ki je poleg naštetih reagentov namesto ekstrakta vseboval ustrezno topilo. Meritve smo izmerili v treh paralelkah.

### 3.2.6 Statistična analiza

Analize smo delali v treh paralelkah, vrednosti so podane kot povprečje  $\pm$  standardni odklon, ki smo ga izračunali po prikazani enačbi (10):

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad \dots 10$$

$\delta$  = standardni odklon

$x_i$  = i-ta enota vzorca

$\bar{x}$  = aritmetična sredina vzorca

$N$  = število vseh enot

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

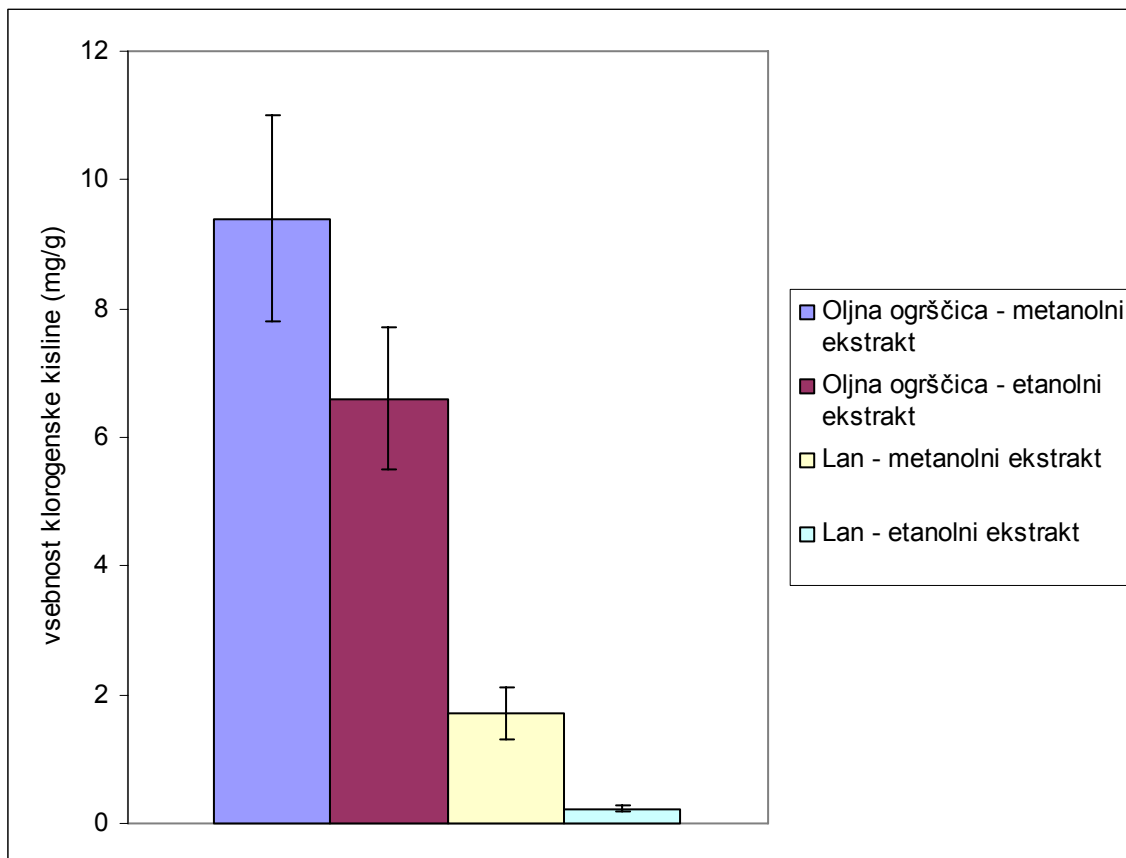
Skupne fenolne spojine smo določili s Folin-Ciocalteu metodo. Metoda je bila razvita leta 1927, kasneje sta jo izpopolnila Singleton in Rossi z namenom določitve fenolnih spojin v vinu. Danes pa se uporablja za določitev fenolov v vseh rastlinskih produktih. Metoda je preprosta, občutljiva in natančna. Težave metode so predvsem veliko število substanc, ki motijo analizo. To so večinoma ogljikovi hidrati, nekatere aminokisliline, žveplov dioksid, organske kisline, askorbinska kislina in drugi reducenti (Prior in sod., 2005).

Ekstrakcijo smo izvedli z zmesjo metanol/voda (70:30, v/v) (v nadaljevanju – metanolni ekstrakt) in zmesjo etanol/voda (96:4, v/v) (v nadaljevanju – etanolni ekstrakt). Učinkovitost ekstrakcije smo podali kot dobit, ki je izražena kot vsebnost fenolnih spojin v razmaščenih pogačah. V preglednici 3 so podane povprečne vrednosti za vsebnost fenolnih spojin v razmaščenih pogačah oljne ogrščice in lanu. Vrednosti so podane kot masa klorogenske kisline na gram razmaščene pogače, saj smo za pripravo umeritvene krivulje uporabili raztopino klorogenske kisline.

Preglednica 3: Vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu (mg klorogenske kisline/ g razmaščene pogače)

<u>Ekstrakti pogač</u>	<u>Vsebnost fenolnih spojin [mg/g]</u>
Oljna ogrščica – metanolni ekstrakt	9,4 ± 1,6
Oljna ogrščica – etanolni ekstrakt	6,6 ± 1,1
Lan – metanolni ekstrakt	1,7 ± 0,4
Lan – etanolni ekstrakt	0,23 ± 0,05

Na sliki 7 so grafično prikazane vsebnosti fenolnih spojin v razmaščenih pogačah.



Slika 7: Vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu (mg klorogenske kisline/ g razmaščene pogače)

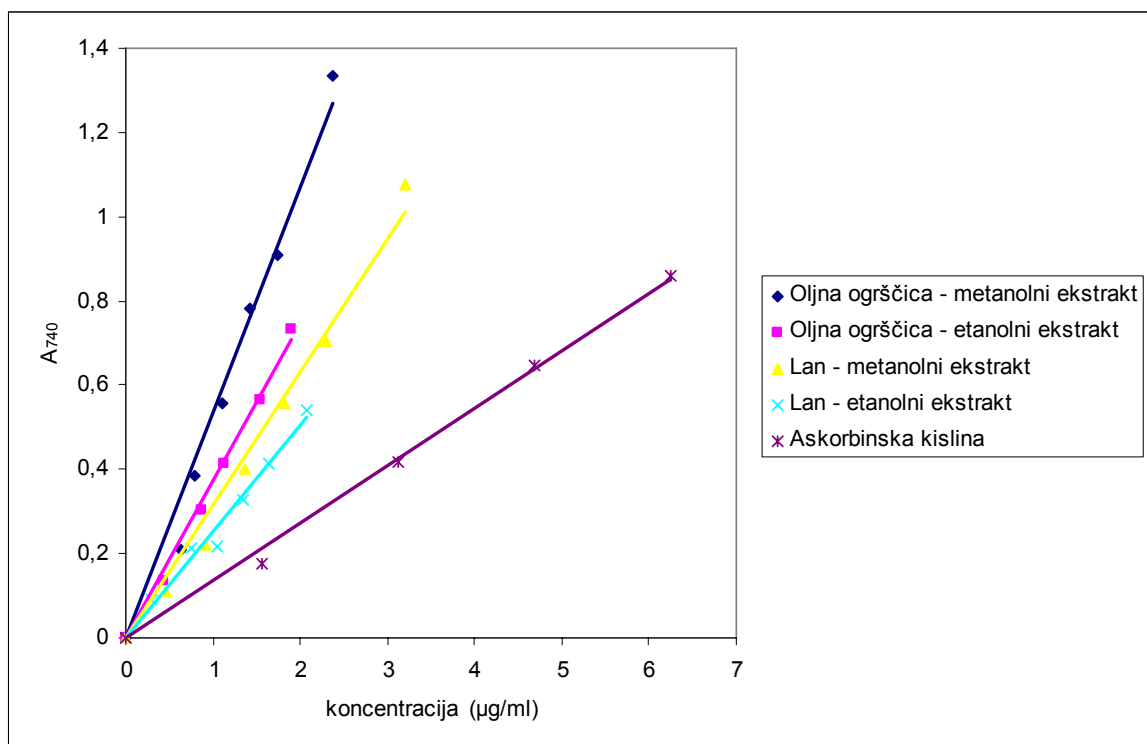
Izkazalo se je, da je zmes metanol/voda (70/30, v/v) v primerjavi z zmesjo etanol/voda (96:4 v/v) bolj učinkovito topilo za ekstrakcijo. Dobit ekstrakcije ob uporabi metanola kot ekstrakcijskega topila je namreč signifikantno višja od dobiti v primeru uporabe etanola kot ekstrakcijskega topila. Največ fenolnih spojin smo določili v metanolnem ekstraktu oljne ogrščice, kjer znaša dobit ekstrakcije ( $9,4 \pm 1,6$ ) mg/g. Nižja vsebnost fenolnih spojin je v etanolnem ekstraktu oljne ogrščice. V tem primeru znaša dobit ekstrakcije ( $6,6 \pm 1,1$ ) mg/g. Bistveno manj fenolnih spojin je v obeh ekstraktih lanu in tudi tu jih je manj v etanolnem ekstraktu (dobit ekstrakcije je ( $0,23 \pm 0,05$ ) mg/g) kot pa v metanolnem ekstraktu, kjer je dobit ekstrakcije ( $1,7 \pm 0,4$ ) mg/g. Iz dobljenih rezultatov lahko

sklepamo, da polarnost topila vpliva na uspešnost ekstrakcije in da smo lahko več fenolnih spojin ekstrahirali z bolj polarno zmesjo metanol/voda (70:30, v/v) kot pa z manj polarno zmesjo etanol/voda (96/4, v/v).

Tudi v literaturi smo zasledili, da na ekstrakcijo vpliva polarnost topila. Matthäus (2002a) navaja, da uspešnost ekstrakcije pada z zmanjševanjem polarnosti topil, kar potrjujejo tudi drugi avtorji (Sun in Ho, 2005; Suja in sod., 2005; Srivastava in sod., 2006). V literaturi podatkov za vsebnost fenolnih spojin v lanu nismo našli, vsebnost fenolnih spojin v oljni ogrščici pa je določil Matthäus (2002a), kjer je dobit metanolne ekstrakcije znašala 11,8 mg/g, kar je malo več kot smo določili mi.

## 4.2 SPOSOBNOST REDUKCIJE

Pri analizi sposobnosti redukcije smo zasledovali odvisnost  $A_{740}$  od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Na sliki 8, kjer je omenjena odvisnost prikazana, vidimo, da v preiskovanem koncentracijskem območju  $A_{740}$  linearno narašča s koncentracijo fenolnih spojin. Sposobnost redukcije smo kvantitativno ovrednotili tako, da smo izračunali naklon premic. Na sliki 9 so grafično prikazane sposobnosti redukcije. Povprečne vrednosti sposobnosti redukcije pa so podane v preglednici 4. Za primerjavo smo opravili tudi analizo sposobnosti redukcije askorbinske kisline.



Slika 8: Odvisnost absorbance od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi

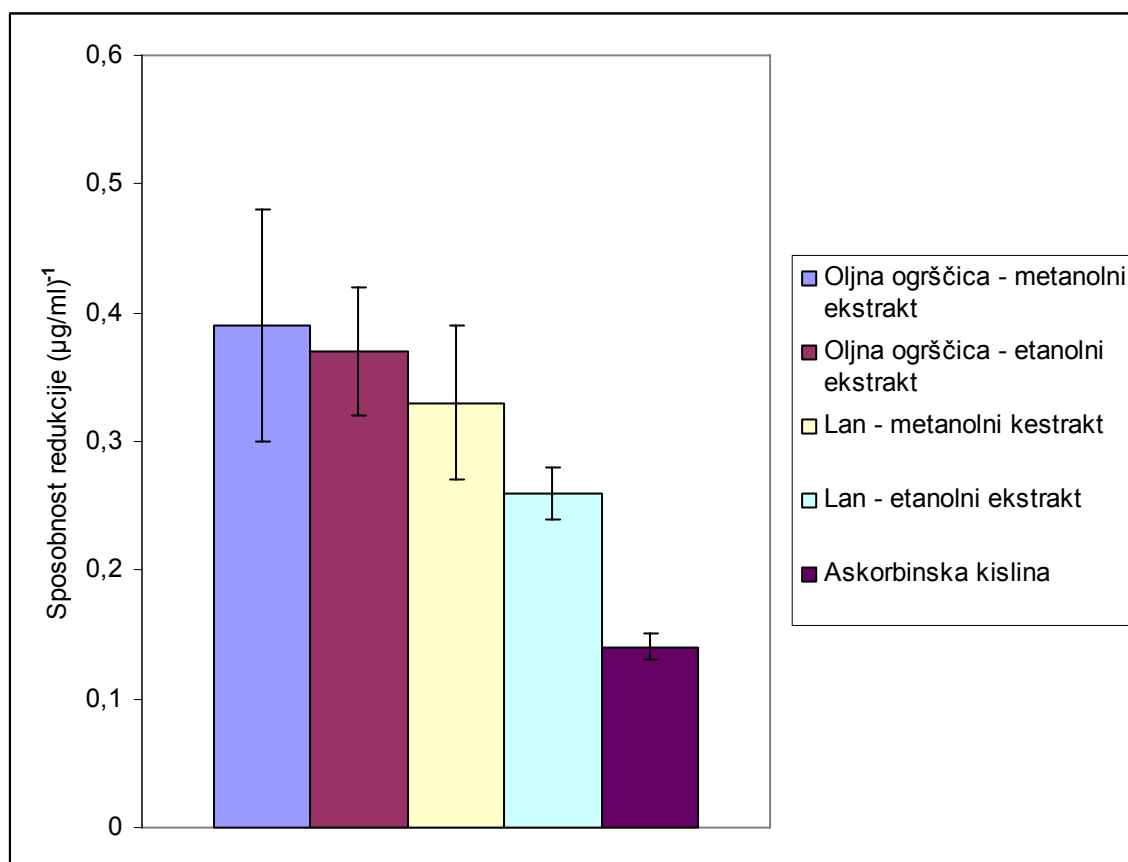
Sposobnost redukcije se za preiskovane ekstrakte med seboj v okviru eksperimentalne napake signifikantno ni razlikovala. Kljub temu pa opazimo, da je imel najvišji naklon premice, torej največjo sposobnost redukcije med preiskovanimi ekstrakti metanolni ekstrakt iz pogače oljne ogrščice ( $0,39 \pm 0,09 (\mu\text{g/ml})^{-1}$ ), najnižjo sposobnost redukcije pa je pokazal etanolni ekstrakt iz pogače lanu ( $0,26 \pm 0,02 (\mu\text{g/ml})^{-1}$ ). V primerjavi z



ekstrakti iz pogač oljne ogrščice in lanu je imela askorbinska kislina signifikantno nižjo sposobnost redukcije ( $0,14 \pm 0,01$  ( $\mu\text{g/ml}$ )<sup>-1</sup>).

Preglednica 4: Sposobnost redukcije ekstraktov iz razmaščenih pogač oljne ogrščice, lanu ter askorbinske kisline in primerjava sposobnosti redukcije ekstraktov iz razmaščenih pogač proti askorbinski kislini

<u>Ekstrakti pogač</u>	<u>Sposobnost redukcije</u> [ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>-1</sup> ]	<u>Primerjava proti askorbinski kislini</u>
Oljna ogrščica – metanolni ekstrakt	$0,39 \pm 0,09$	2,8
Oljna ogrščica – etanolni ekstrakt	$0,37 \pm 0,05$	2,6
Lan – metanolni ekstrakt	$0,33 \pm 0,06$	2,4
Lan – etanolni ekstrakt	$0,26 \pm 0,02$	1,9
Askorbinska kislina	$0,14 \pm 0,01$	1



Slika 9: Sposobnost redukcije askorbinske kisline ter ekstraktov iz razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu

To nam pove, da je za enak učinek potrebna nižja koncentracija fenolnih spojin ekstrakta kot askorbinske kisline. Poudariti velja tudi to, da imajo pri isti koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski mešanici metanolni ekstrakti višjo sposobnost redukcije od etanolnih, čeprav razlika ni velika, saj je v okviru eksperimentalne napake.

#### 4.3 ANALIZA DPPH•

Pri analizi smo lovljenje DPPH• radikala spremljali tako, da smo zasledovali znižanje absorbance pri valovni dolžini 517 nm, kjer je absorpcijski maksimum radikala. Boljša kot je antioksidativna učinkovitost, manjši delež radikala preostane v reakcijski zmesi in nižja je absorbanca.

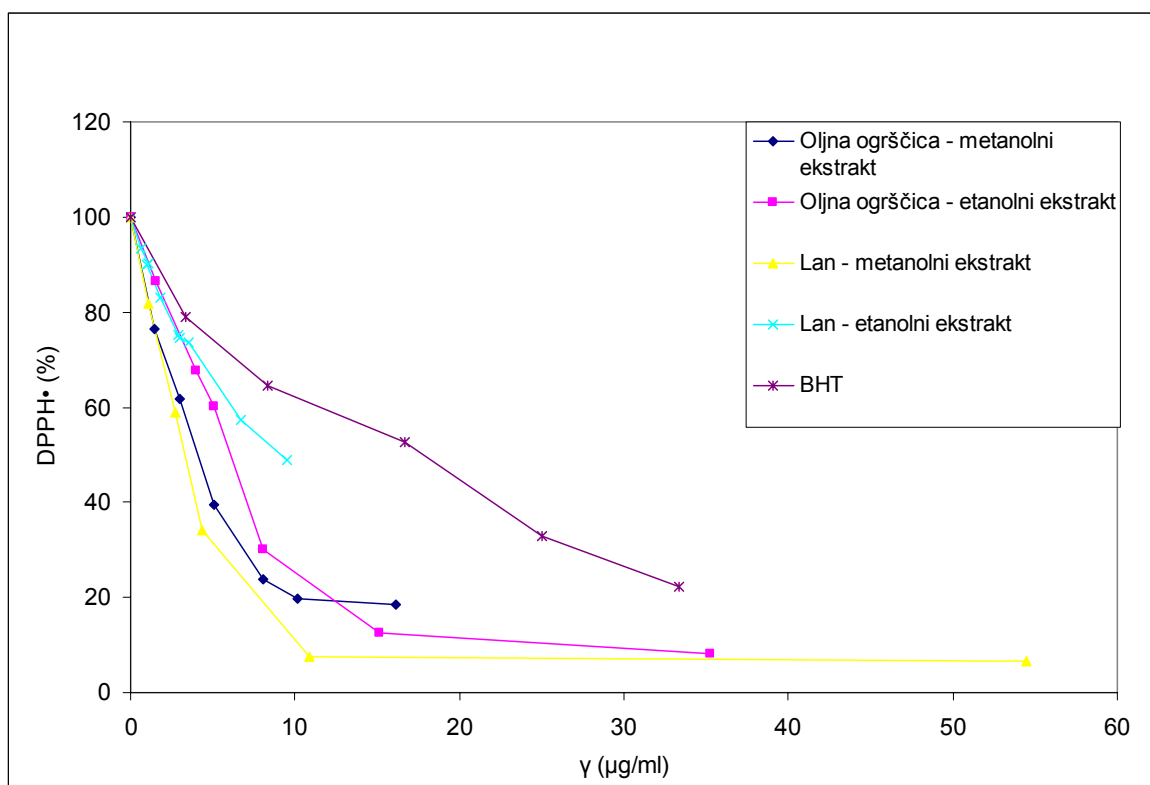
Delež radikala (%), ki po 30 minut inkubacije preostane v reakcijski zmesi, smo izračunali v skladu z naslednjo relacijo:

$$\text{DPPH}\bullet = \frac{A_{\text{vz}517}}{A_{\text{k}517}} \times 100 \% \quad \dots 11$$

$A_{\text{vz}517}$  - absorbanca vzorca

$A_{\text{k}517}$  - absorbanca kontrole

Na sliki 10 je prikazan delež DPPH•, ki je preostal v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin.



Slika 10: Delež DPPH•, ki je preostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi

Vsi ekstrakti so reagirali z DPPH• radikalom. Na sliki 10 lahko vidimo, da je delež preostalega DPPH• proporcionalen koncentraciji. Delež preostalega DPPH• radikala se je zmanjševal z višanjem koncentracije fenolnih spojin do določene stopnje - nato pa se tudi z nadaljnjim višanjem koncentracije fenolnih spojin delež preostalega DPPH• radikala ni več zmanjševal. Sposobnost lovljenja radikalov je podana kot koncentracija, ki povzroči zmanjšanje začetne koncentracije DPPH• za 50 % ( $ED_{50}$  %). Koncentracijo, ki povzroči zmanjšanje začetne koncentracije DPPH• za 50 % smo izračunali iz naklona linearnega dela krivulj (ki smo ga določili z linearno regresijsko analizo v Excelu z uporabo začetnih točk krivulje, kjer je naklon še linearen) na sliki 10 v skladu z relacijo (12) (Juntachote in Berghofer, 2005).

$$ED_{50} \% = \frac{50}{k} \times -1 \quad \dots 12$$

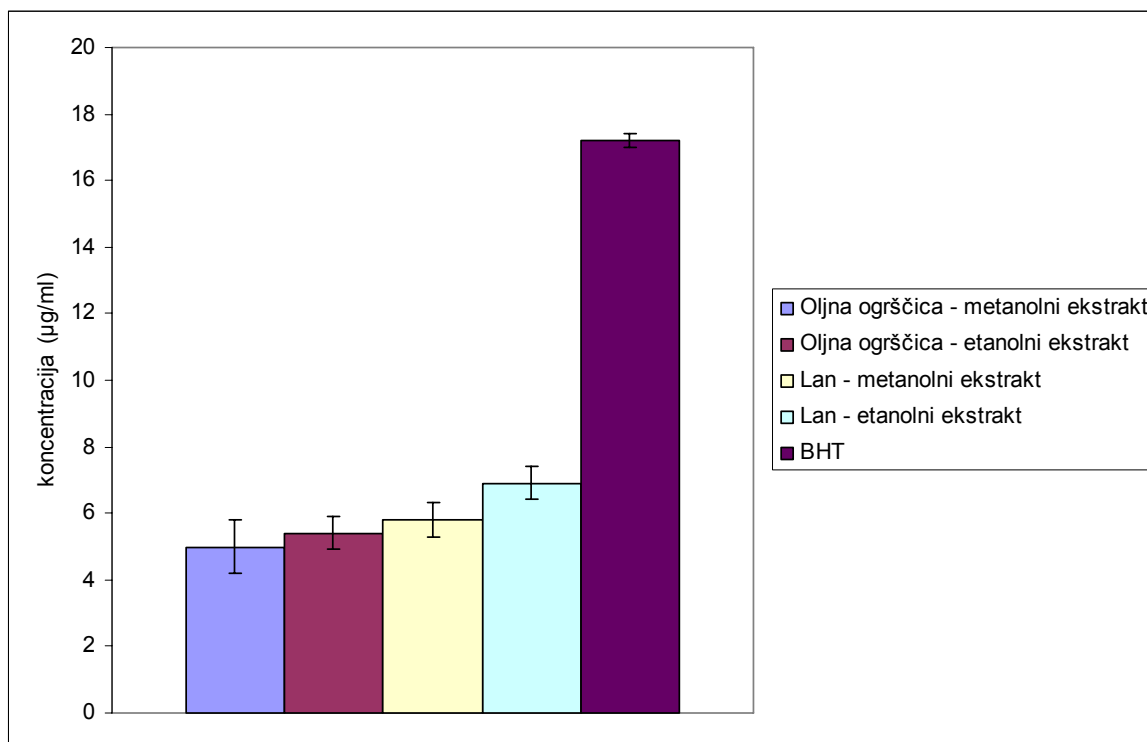
$k$  – koeficient naklona linearnega dela krivulj na sliki 10

V preglednici 5 so podane vrednosti za naklon linearnega dela krivulj in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za razgradnjo polovice začetnega DPPH•. Koncentracije, ki so potrebne za razgradnjo polovice začetnega DPPH• so podane tudi grafično na sliki 12. Višja vrednost  $ED_{50\%}$  pomeni slabšo sposobnost lovljenja DPPH• radikalov.

Vrednosti  $k$  in vrednosti za  $ED_{50\%}$  se za preiskovane ekstrakte med seboj v okviru eksperimentalne napake sicer ne razlikujejo. Kljub temu pa opazimo, da imata večji naklon krivulji v primeru ekstraktov oljne ogrščice, kar pomeni boljšo sposobnost lovljenja radikalov. Manjši naklon in s tem slabšo učinkovitost imata ekstrakta lanu. Za primerjavo smo raziskali sposobnost lovljenja radikala za BHT. BHT ima signifikantno nižjo sposobnost lovljenja radikalov od ekstraktov iz pogač oljne ogrščice in lanu.

Preglednica 5: Nakloni linearnega dela krivulj in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH•

<u>Ekstrakti pogač</u>	<u>Naklon krivulje (k)</u>	<u><math>ED_{50\%}</math> [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</u>
Oljna ogrščica – metanolni ekstrakt	$-10,2 \pm 1,7$	$5,0 \pm 0,8$
Oljna ogrščica – etanolni ekstrakt	$-9,3 \pm 0,9$	$5,4 \pm 0,5$
Lan – metanolni ekstrakt	$-8,7 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,5$
Lan – etanolni ekstrakt	$-7,3 \pm 0,7$	$6,9 \pm 0,5$
BHT	$-2,9 \pm 0,3$	$17,2 \pm 0,2$



Slika 11: Koncentracije fenolnih spojin in koncentracija BHT, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH· ( $ED_{50}$  %)

#### 4.4 BELJENJE $\beta$ -KAROTENA

Z metodo beljenja  $\beta$ -karotena smo spektrofotometrično merili odvisnost razgradnje  $\beta$ -karotena in primerjali intenzivnost razpada  $\beta$ -karotena v kontrolnih vzorcih (brez prisotnega antioksidanta) z intenziteto razpada  $\beta$ -karotena v prisotnosti preiskovanih ekstraktov. Antioksidativno učinkovitost preiskovanih ekstraktov smo izrazili kot koeficient antioksidativne učinkovitosti ( $C_{AO}$ ), ki smo ga izračunali z naslednjo relacijo:

$$C_{AO} = \left[ 1 - \frac{A_{vz470}^0 - A_{vz470}^t}{A_{k470}^0 - A_{k470}^t} \right] \times 100 \% \quad \dots 13$$

$C_{AO}$  – koeficient antioksidativne učinkovitosti (%)

$A_{vz470}^0$  - absorbanca vzorca v času 0

$A_{vz470}^t$  - absorbanca vzorca po določenem času

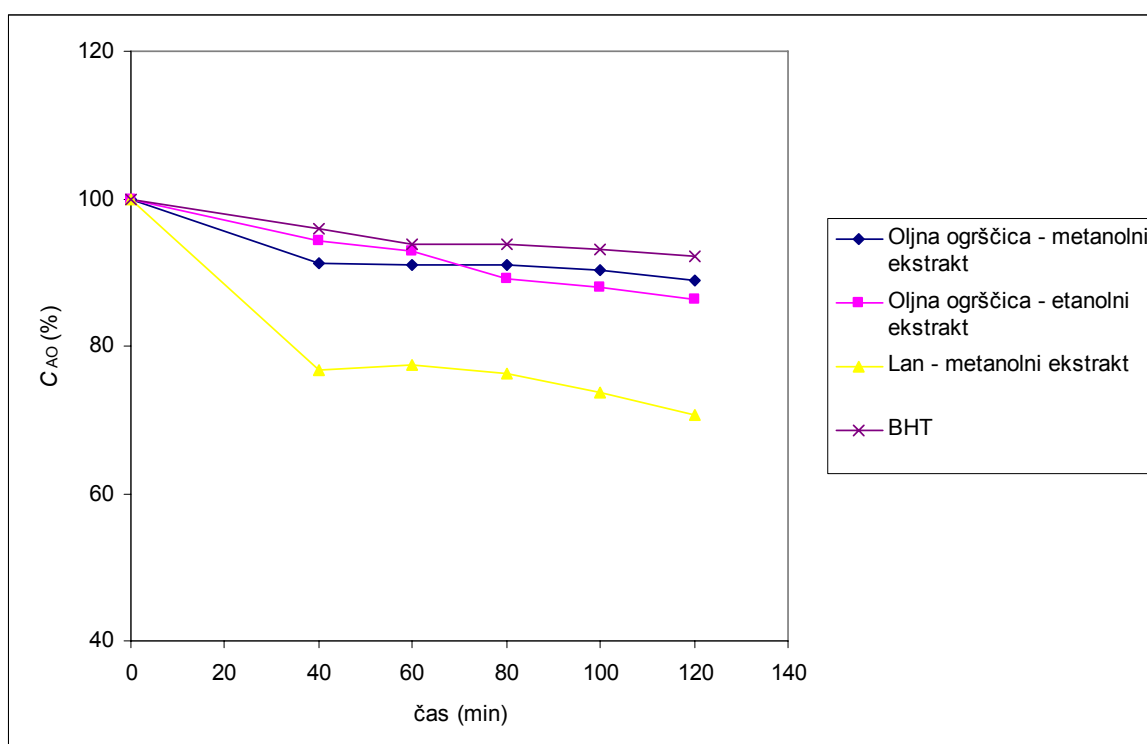
$A_{k470}^0$  - absorbanca kontrole v času 0

$A_{k470}^t$  - absorbanca kontrole po določenem času

Na sliki 12 so za preiskovane ekstrakte prikazane vrednosti koeficienta antioksidativne učinkovitosti v odvisnosti od časa. Vrednosti koeficienta antioksidativne učinkovitosti smo za primerjavo določili tudi BHT. Topilo na samo analizo ni vplivalo, kar je bilo dokazano s predhodnimi analizami, zato smo za standard uporabili BHT, pripravljen samo v metanolu. Analize za etanolni ekstrakt lanu zaradi prenizke koncentracije fenolnih spojin nismo mogli opraviti.

Preglednica 6: Koeficienti antioksidativne učinkovitosti v emulziji ( $C_{AO}$ ) iz ekstraktov razmaščenih pogač in BHT

Ekstrakti pogač	$C_{AO}$ (%)
Oljna ogrščica – metanolni ekstrakt	89,0
Oljna ogrščica – etanolni ekstrakt	86,4
Lan – metanolni ekstrakt	75,5
BHT	92,1



Slika 12: Odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti v reakcijski emulziji ( $C_{AO}$ ) od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C za ekstrakte razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu ter BHT

V preglednici 6 so podane vrednosti za  $C_{AO}$  (%) preiskovanih ekstraktov in BHT po 120 minutah inkubacije pri temperaturi 50 °C. Kot je razvidno s slike 12 in preglednice 6 je sintetični antioksidant BHT pokazal v emulziji najboljšo antioksidativno učinkovitost. To je v nasprotju z rezultati analize določitve sposobnosti lovljenja radikalov (DPPH• test), kjer je BHT v primerjavi z ostalimi preiskovanimi ekstrakti izkazal signifikantno nižjo učinkovitost lovljenja DPPH• radikala. S časom inkubacije antioksidativna učinkovitost

BHT v emulziji le počasi upada. Ekstrakta oljne ogrščice imata nekoliko slabšo antioksidativno učinkovitost, ki se v okviru eksperimentalne napake ne razlikuje od  $C_{AO}$  za BHT, medtem ko ima metanolni ekstrakt lanu precej slabšo učinkovitost, ki mu s časom tudi hitreje upada.

Čeprav sta ekstrakta iz oljnih pogač v *in vitro* DPPH• testu pokazala boljšo sposobnost lovljenja radikalov od BHT, je bila njuna antioksidativna učinkovitost v emulziji nekoliko slabša od BHT. Porazdelitev antioksidantov med fazama in s tem tudi njihova antioksidativna učinkovitost v vodni emulziji linolne kisline je med drugim odvisna tudi od njihove polarnosti. V večfaznih sistemih se namreč antioksidanti porazdelijo med fazama glede na njihovo topnost v posamezni fazi. V emulziji torej manj polarni antioksidanti kot je npr. BHT v večji meri prehajajo v lipidni medij (kapljica emulgirane linolne kisline), kjer lahko uspešno vstopajo v interakcije s peroksilnimi radikali in s tem zavirajo proces oksidacije, medtem ko bolj polarne spojine v večji meri ostajajo v vodni fazi in so zato manj učinkovite v zaviranju oksidacije.

#### 4.5 SPOSOBNOST TVORBE KOMPLEKSOV S KOVINSKIMI IONI

Sposobnost tvorbe kompleksov smo izrazili kot koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov (chelating ability), ki smo ga izračunali po naslednji enačbi:

$$C_{CA} = \left( 1 - \frac{A_{vz562}}{A_{k562}} \right) \times 100 \% \quad \dots 14$$

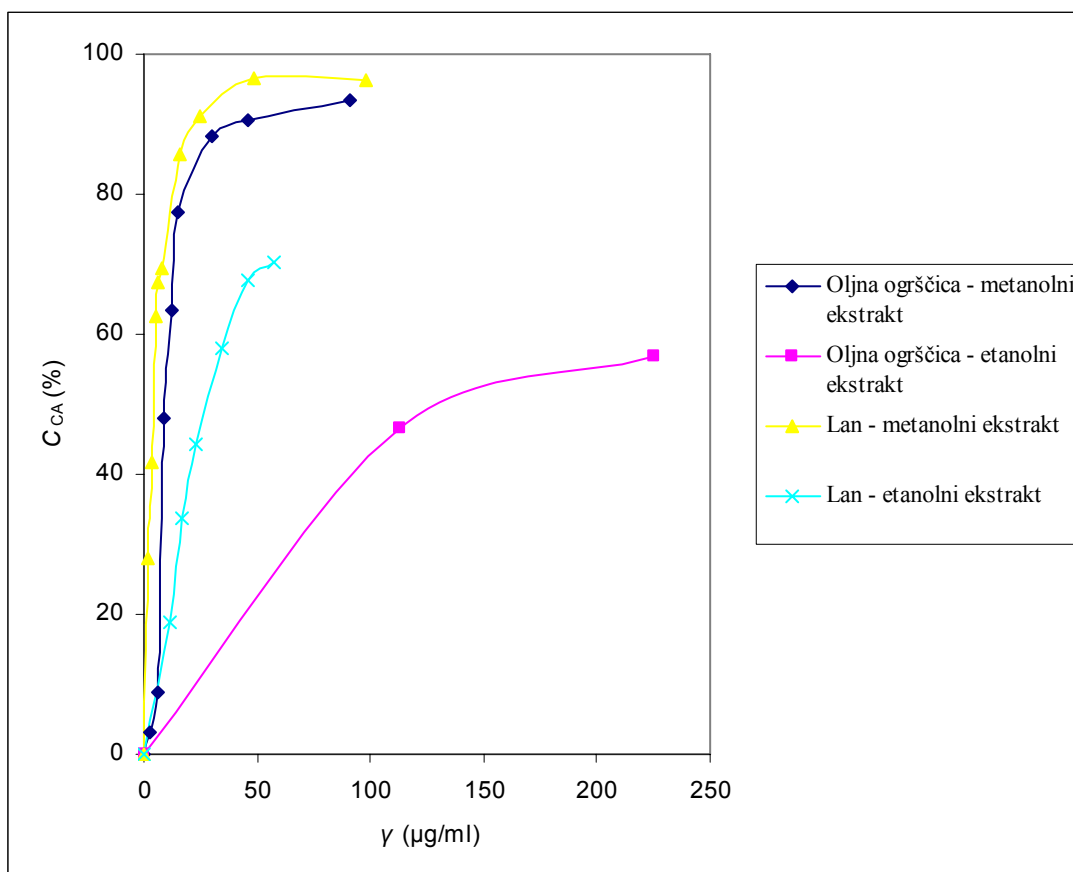
$C_{CA}$  – koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov (%)

$A_{vz562}$  - absorbanca vzorca

$A_{k562}$  - absorbanca kontrole

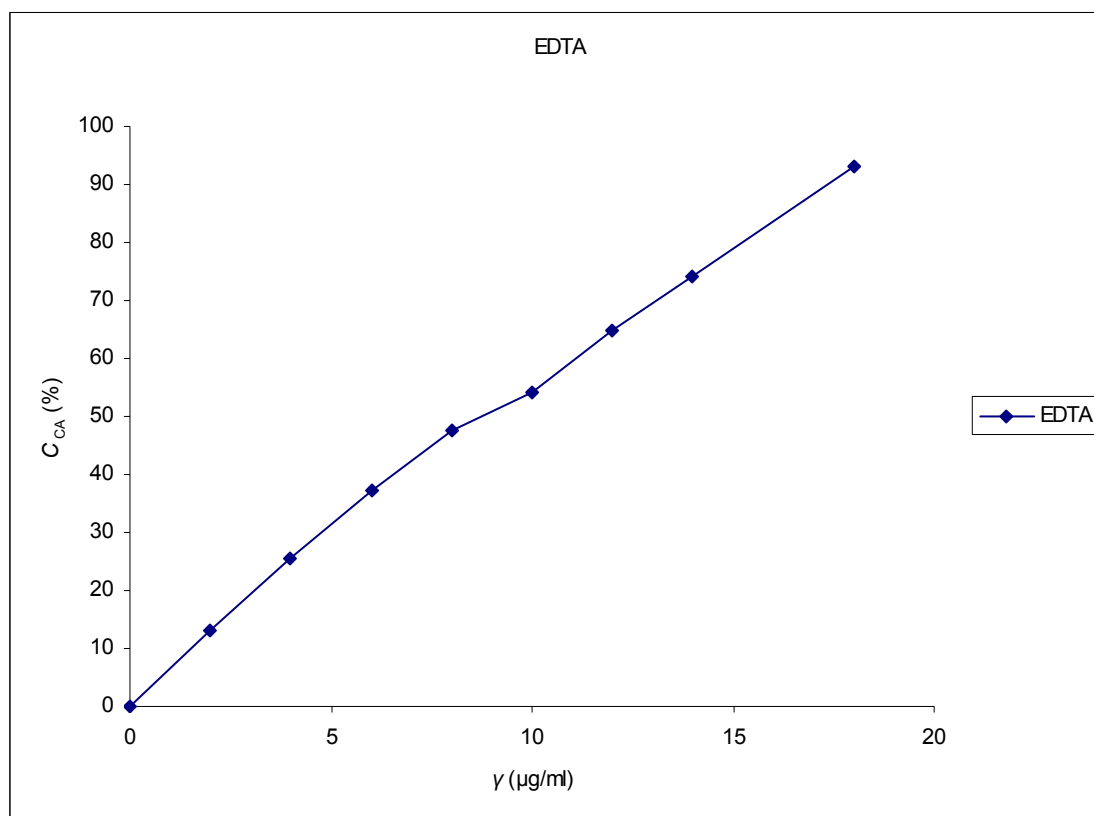


Na sliki 13 je za preiskovane ekstrakte prikazana odvisnost  $C_{CA}$  od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi.



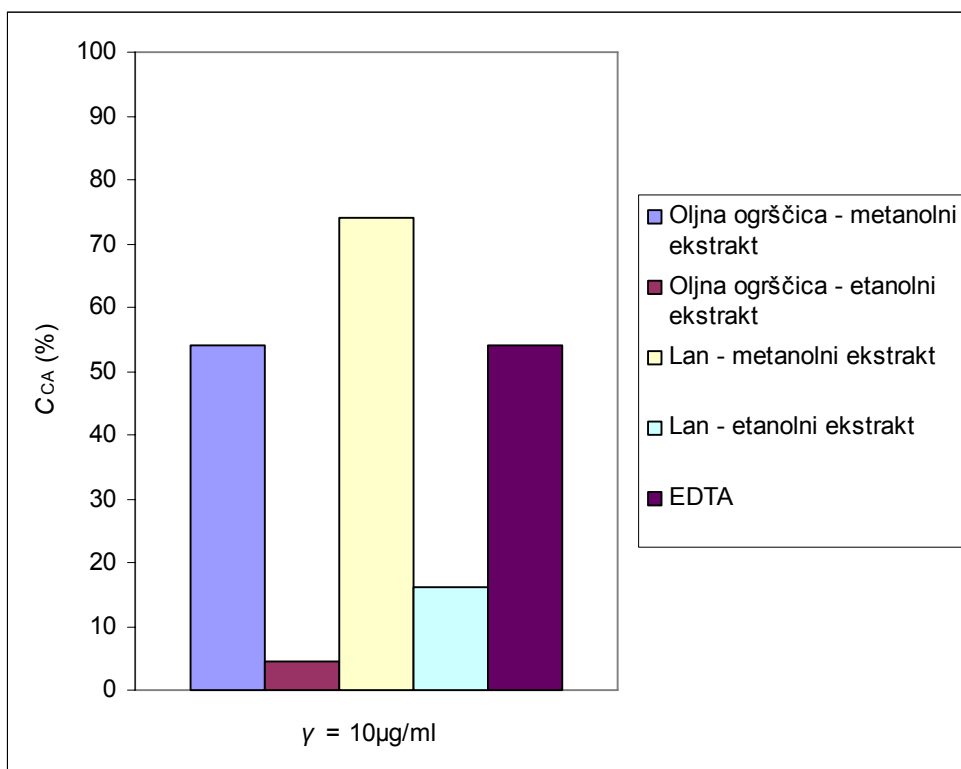
Slika 13: Odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti v emulziji ( $C_{CA}$ ) od masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakte iz razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu

Sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni se večja s povečevanjem koncentracije fenolnih spojin, vendar pa samo do določene vrednosti; nato se s povečevanjem koncentracije antioksidanta sposobnost tvorbe kompleksov ne večja več. Na sliki 14 smo za primerjavo prikazali odvisnost  $C_{CA}$  od koncentracije EDTA. V celotnem preiskovanem koncentracijskem območju  $C_{CA}$  narašča linearno s koncentracijo EDTA.

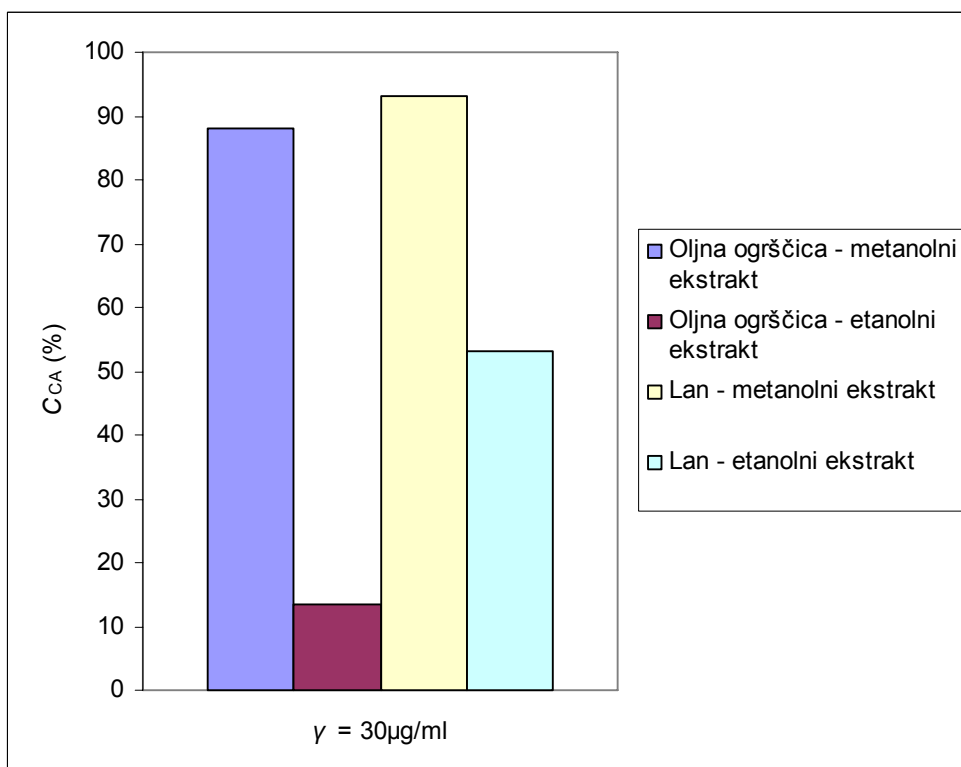


Slika 14: Odvisnost koeficienta sposobnosti tvorbe kompleksov ( $C_{CA}$ ) od masne koncentracije EDTA v reakcijski zmesi

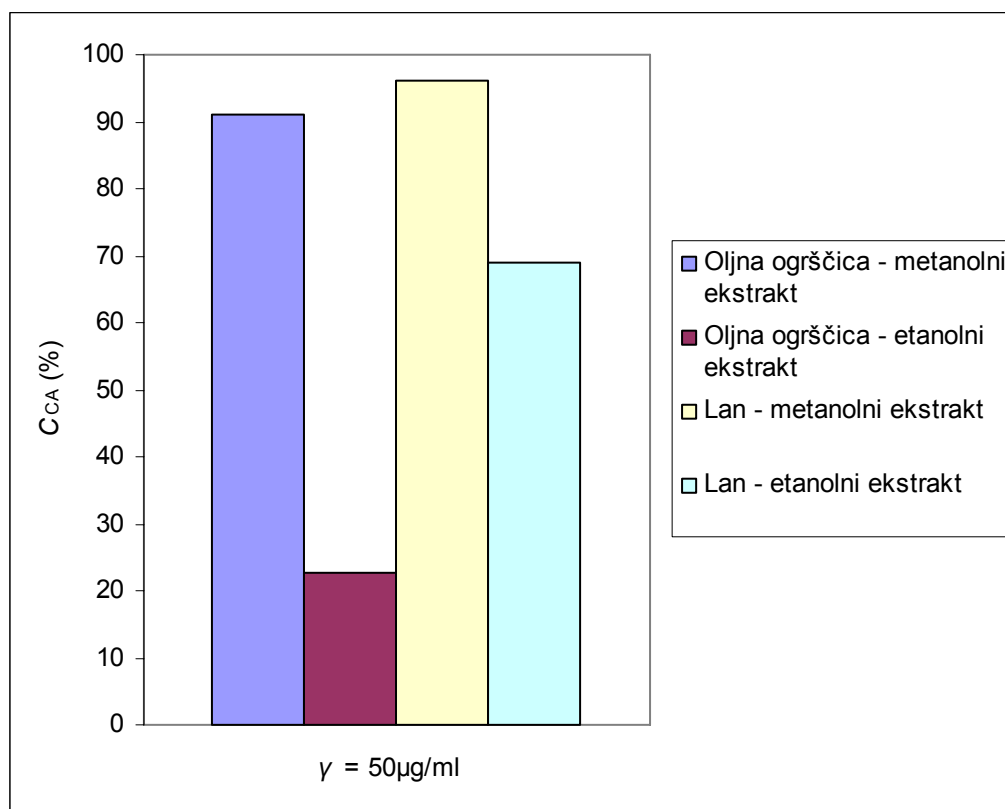
Kot vidimo na sliki 13 so med posameznimi ekstrakti razlike v sposobnosti tvorbe kompleksov. Za boljšo predstavljenost smo na slikah 15, 16 in 17 prikazali sposobnost tvorbe kompleksov preiskovanih ekstraktov pri masnih koncentracijah 10  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$  in 50  $\mu\text{g/mL}$ . Vrednosti za  $C_{CA}$  pri omenjenih koncentracijah smo določili grafično s krivulj na sliki 13 ter za EDTA s slike 14.



Slika 15: Koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov ( $C_{CA}$ ) za ekstrakte razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu pri masni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 10  $\mu\text{g/mL}$



Slika 16: Koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov ( $C_{CA}$ ) za ekstrakte razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu pri masni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 30  $\mu\text{g/mL}$



Slika 17: Koefficient sposobnosti tvorbe kompleksov ( $C_{CA}$ ) za ekstrakte razmaščenih pogač oljne ogrščice in lanu pri masni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 50  $\mu\text{g/mL}$

S slik 15, 16 in 17 je razvidno, da na sposobnost tvorbe kompleksov preiskovanih ekstraktov vpliva substrat, iz katerega smo pripravili ekstrakt oziroma fenolne spojine v ekstraktih. Poleg tega je očitno tudi vpliv topila, ki smo ga uporabili za ekstrakcijo, saj metanolna ekstrakta dosegata boljše rezultate od etanolnih. V primeru metanolnih ekstraktov je ekstrakt lanu pokazal nekoliko boljšo sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni od ekstrakta oljne ogrščice. Slabšo sposobnost tvorbe kompleksov je imel etanolni ekstrakt lanu, najslabšo pa etanolni ekstrakt oljne ogrščice.

Na sliki 15 vidimo, da je bila sposobnost tvorbe kompleksov fenolnih spojin v preiskovanih etanolnih ekstraktih s kovinskimi ioni znatno nižja od sposobnosti EDTA, medtem ko je bila sposobnost tvorbe kompleksov fenolnih spojin v metanolnem ekstraktu lanu s kovinskimi ioni višja od sposobnosti EDTA. Pri koncentraciji EDTA v reakcijski zmesi 10  $\mu\text{g/mL}$  je bila vrednost za  $C_{CA}$  54 %. V primeru najbolj učinkovitega med

preiskovanimi ekstrakti, to je metanolni ekstrakt lanu, je bila vrednost za  $C_{CA}$  pri isti koncentraciji (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 75 %.

## 5 SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo v pogačah oljne ogrščice in lanu določili vsebnost fenolnih spojin in vpliv topila na količino ekstrahiranih fenolnih spojin. Nato smo z različnimi metodami ugotovili njihovo antioksidativno učinkovitost. Tudi tu smo primerjali vpliv topila na dobljene rezultate.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo naslednje:

- Pogači oljne ogrščice in lanu vsebujeta fenolne spojine.
- Pogača oljne ogrščice vsebuje več fenolnih spojin kot pogača lanu.
- Z bolj polarnim topilom (zmes metanol/voda (70:30 v/v)) smo ekstrahirali več fenolnih spojin kot z manj polarnim topilom (zmes etanol/voda (96:4 v/v)).
- Vsem ekstraktom smo z različnimi metodami dokazali antioksidativno učinkovitost; ekstrakti so pokazali sposobnost reducirati kovinske ione, sposobnost lovljenja radikalov, zavirati oksidacijo linolne kisline v vodni emulziji in kelirati kovinske ione.
- Vsi ekstrakti deaktivirajo radikale preko dveh glavnih mehanizmov: preko prenosa vodikovega atoma in preko prenosa elektrona.
- Vsi preiskovani ekstrakti imajo v *in vitro* testih v primerjavi s komercialnima antioksidantoma (askorbinsko kislino in BHT) boljšo sposobnost redukcije in lovljenja radikalov; v emulziji je antioksidativna učinkovitost preiskovanih ekstraktov slabša od BHT; v primerjavi z EDTA sta metanolna ekstrakta pokazala primerljivo sposobnost, etanolna ekstrakta pa slabšo sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni.

- Na antioksidativno učinkovitost ekstraktov vpliva topilo, ki smo ga uporabili za ekstrakcijo; boljšo antioksidativno učinkovitost imajo metanolni ekstrakti.

Rezultati raziskovalnega dela so potrdili vse naše delovne hipoteze.

## 6 POVZETEK

V diplomskem delu smo iz razmaščenih ostankov po stiskanju olja (pogač) oljne ogrščice in lanu ekstrahirali fenolne spojine. Za ekstrakcijo smo uporabili dve zmesi različnih topil, bolj polarno topilo (zmes metanol/voda (70:30 v/v)) in manj polarno topilo (zmes etanol/voda (96:4 v/v)). V ekstraktih smo določili koncentracijo fenolnih spojin in pokazali vpliv polarnosti zmesi topila na vsebnost ekstrahiranih fenolov. Nato smo z različnimi metodami določili njihovo antioksidativno učinkovitost.

Učinkovitost ekstrakcije smo podali kot dobit, ki je izražena kot vsebnost fenolnih spojin v razmaščenih pogačah. Dobit ekstrakcije iz pogače oljne ogrščice je ( $10,1 \pm 1,7$ ) mg/g (ekstrakcija z zmesjo metanol/voda (70:30 v/v)) in ( $7,1 \pm 1,2$ ) mg/g (ekstrakcija z zmesjo etanol/voda (94:6 v/v)). Dobit ekstrakcije iz pogače lanu je ( $1,8 \pm 0,4$ ) mg/g (ekstrakcija z zmesjo metanol/voda (70:30 v/v)) in ( $0,25 \pm 0,05$ ) mg/g (ekstrakcija z zmesjo etanol/voda (94:6 v/v)). Ker je koncentracija v obeh metanolnih ekstraktih višja kot v etanolnih, lahko sklepamo, da lahko z bolj polarno zmesjo topila (metanol/voda (70:30 v/v)) ekstrahiramo več fenolnih spojin.

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo dokazali s štirimi različnimi metodami (sposobnost redukcije kovinskih ionov, sposobnost lovljenja radikalov, antioksidativna učinkovitost v vodni emulziji linolne kisline in sposobnost keliranja kovinskih ionov). Te metode smo uporabili zato, ker antioksidanti delujejo preko dveh glavnih mehanizmov (preko prenosa vodikovega atoma in preko prenosa elektrona), kar omenjene metode tudi preverjajo. Ugotovili smo, da imajo vsi ekstrakti antioksidativno učinkovitost. Izkazalo se je, da so preiskovani ekstrakti v primerjavi s komercialnima antioksidantoma (askorbinsko kislino in BHT) v modelnih testih pokazali boljšo sposobnost redukcije in lovljenja radikalov. V emulziji pa so pokazali slabšo antioksidativno učinkovitost od BHT. To lahko razložimo s specifično porazdelitvijo posameznih snovi med fazama v emulziji. Metanolna ekstrakta sta v primerjavi z EDTA izkazala nekoliko boljšo sposobnost in etanolna



ekstrakta slabšo sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni. Dokazali smo, da preiskovani ekstrakti lahko delujejo tako kot donorji vodikovega atoma in tudi kot donorji elektrona ter, da na antioksidativno učinkovitost ekstraktov vpliva topilo, uporabljeno za ekstrakcijo.

## 7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573 - 589
- Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave – funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99: 191-203
- Barberan F.A.T. 2007. High-value co-products from plant foods: nutraceuticals, micronutrients and functional ingredients. V: Handbook of waste management and co-product recovery in food processing .Vol. 1. Waldron K. (ed.). Cambridge, Woodhead publishing limited: 448 – 467
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 28: 25-30
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56: 317–333

- Decker E.A., Welch B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 674 - 677
- Foti M.C., Daquino C., Geraci C. 2004. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *Journal of Organic Chemistry*, 69: 2309 -2314
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58: 966–968
- Hassler M. 2004. Botanischer Garten, Foto-Archiv *Linum usitatissimum* BotKA. Karlsruhe, Botanischer Garten Universität Karlsruhe.  
<http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotos-hassler/Linum%20usitatissimum%20BotKA%20G4.jpg> (25.9.2008): 1 str.
- Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riechel T.L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (Tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1887 - 1892
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841 - 1856
- Juntachote T., Berghofer E. 2005. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. *Food Chemistry*, 92: 193 – 202
- Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S. Bauer F. 2006. The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat Science*, 72: 446-456

- Kocjan Ačko D. 1999a. Lan. V: Pozabljene poljščine. Ljubljana, Kmečki glas: 83 - 100
- Kocjan Ačko D. 1999b. Ogrščica. V: Pozabljene poljščine. Ljubljana, Kmečki glas: 119 - 134
- Koren M. 2006. Olje oljne ogrščice. Murska Sobota, Pomurske lekarne.  
<http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=2101> (25.9.2008): 1 str.
- Matthäus B. 2002a. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3444 – 3452
- Matthäus B. 2002b. Antioxidant activity of extracts isolated from residues of oilseeds, such as rapeseed or sunflower. *Agro Food Industry Hi Tech*, 13: 22 – 25
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J. M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Parajo J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171
- Moure A., Franco D., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Lema J. M. 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3890–3897
- Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 8. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic press, Elsevier Science: 4507 – 4514
- Obeid H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R. 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 823 - 837

- Oreopoulou V., Tzia C. 2007. Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants and colorants. V: Handbook of waste management and co-product recovery in food processing .Vol. 1. Waldron K. (ed.). Cambridge, Woodhead publishing limited: 209 – 231
- Peschel W., Dieckmann W., Sonnenschein M., Plescher A. 2007. High antioxidant potential of pressing residues from evening primose in comparison to other oilseed cakes and plant antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 25: 44-54
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290 – 4302
- Randhir R., Lin Y.T., Shetty K. 2004. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 39: 637–646
- Schieber A., Stintzing F.C., Carle R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12: 401–413
- Silva B.A., Malva J.O., Dias A.C.P. 2008. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several *in vitro* models of oxidative stress. *Food Chemistry*, 110: 611 - 619
- Srivastava A., Harish S.R., Shivanandappa T. 2006. Antioxidant activity of the roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight & Arn.). *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology*, 39: 1059-1065
- Suja K.P., Jayalekshmy A., Arumughan C. 2005. Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry*, 91: 312 - 219

Sun T., Ho C.T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90: 743-749

Swanson B.G. 2003. Tannins and polyphenols. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 9. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic press, Elsevier Science: 5729 – 5733

Thiyam U., Kuhlmann A., Stöckmann H., Schwarz K. 2004. Prospects of rapeseed oil by-products with respect to antioxidative potential. *Comptes Rendus Chimie*, 7: 611 - 616

Wettasinghe M., Shahidi F. 1999. Antioxidant and free radical – scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chemistry*, 67: 399 - 414

## **ZAHVALA**

Mentorci doc. dr. Heleni Abramovič se zahvaljujem za pomoč, strokovne nasvete in skrben ter kritčen pregled diplomskega dela.

Za pregled naloge se najlepše zahvaljujem recenzentki prof. dr. Veroniki Abram.

Hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za kemijo, ki ste mi kakorkoli pomagali pri delu v laboratoriju.

Iskreno hvala staršema, bratu in vsem najbližjim za vsestransko podporo v času študija.

Nenazadnje pa hvala tudi Alji za vso potrpežljivost in ker mi je vedno stala ob strani.

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Marko GORGIEV

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST  
EKSTRAKTOV FENOLNIH SPOJIN IZ POGAČ  
OLJNE OGRŠČICE IN LANU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009