

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jernej KAISER

**VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN IN  
ANTIOKSIDATIVNI UČINEK EKSTRAKTA OLJNIH  
POGAČ BELE GORJUŠICE IN LANU**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jernej KAISER

**VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN IN ANTIOKSIDATIVNI UČINEK  
EKSTRAKTA OLJNIH POGAČ BELE GORJUŠICE IN LANU**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT  
EFFECT OF EXTRACTS FROM PRESS CAKES OF WHITE  
MUSTARD AND FLAXSEED**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc. dr. Helena Abramovič, za somentorja prof. dr. Rajko Vidrih in za recenzenta doc. dr. Blaž Cigić.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Somentor: prof. dr. Rajko Vidrih

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jernej Kaiser

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 633.85 : 547.56 + 577.1 (043) = 163.6  
KG oljne pogače/bela gorjušica/*Sinapis alba* L./lan/*Linum usitatissimum*/ekstrakti oljnih pogač/fenolne spojine/antioksidativna aktivnost  
AV KAISER, Jernej  
SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/VIDRIH, Rajko (somentor)/CIGIČ, Blaž (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2012  
IN VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN IN ANTIOKSIDATIVNI UČINEK EKSTRAKTA OLJNIH POGAČ BELE GORJUŠICE IN LANU  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 54 str., 10 pregl., 19 sl., 37 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V sklopu diplomske naloge smo iz pogač lanu in dveh sort bele gorjušice z uporabo solventne ekstrakcije pripravili ekstrakte fenolnih spojin. V ta namen smo uporabili topilo zmes metanol/voda (70:30 v/v). Celokupno koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktih smo določili spektrofotometrično z uporabo Folin-Ciocalteujeve metode. Antioksidativno učinkovitost smo določili s pomočjo različnih metod: DPPH· metoda (sposobnost lovljenja radikala DPPH·), beljenje β-karotena (sposobnost lovljenja peroksilnega radikala v sistemu emulzije linolne kisline v vodi), sposobnost reduciranja kovinskih ionov in sposobnost zaviranja oksidacije v homogenem lipidnem sistemu med skladiščenjem pri povišani temperaturi (spektrofotometrična določitev primarnih in sekundarnih produktov oksidacije). Ekstrakti so pokazali antioksidativno učinkovitost in so primerljivi z najbolj razširjenima komercialnima antioksidantoma, askorbinsko kislino in butiliranim hidroksitoluenom (BHT). Analizirani ekstrakti so v emulziji pri metodi beljenja β-karotena pokazali slabšo učinkovitost od BHT. Rezultati so pokazali, da ima ekstrakt lanu boljše sposobnost redukcije kovinskih ionov od askorbinske kisline, ekstrakta obeh sort bele gorjušice pa sta pokazala primerljivo sposobnost reduciranja z askorbinsko kislino. Prav tako so pri analizi DPPH· antioksidanti iz ekstrakta lanu reagirali najboljše pri lovljenju radikala DPPH·. Komercialni antioksidant BHT je reagiral malenkostno slabše od lanu, obe beli gorjušici pa še nekoliko slabše. Je pa imel BHT največjo sposobnost zaviranja oksidacije v olju pri določanju primarnih produktov oksidacije, pri določanju sekundarnih produktov oksidacije pa je bil malenkostno slabši od sorte bela gorjušica 2.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn  
DC UDC 633.85 : 547.56 + 577.1 (043) = 163.6  
CX press cakes/white mustard/*Sinapis alba* L./flaxseed/*Linum usitatissimum*/press cakes extracts/phenolic compounds/antioxidant activity  
AU KAISER, Jernej  
AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/VIDRIH, Rajko (co-advisor)/ CIGIČ, Blaž (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2012  
TI CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT EFFECT OF EXTRACTS FROM PRESS CAKES OF WHITE MUSTARD AND FLAXSEED  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO X, 54 p., 10 tab., 19 fig., 37 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB We have extracted phenolic compounds from the press cakes of white mustard and flaxseed. Mixture of methanol/water (70:30 v/v) was used for the extraction and the concentration of phenolic compounds was determined with Folin-Ciocalteu method. The antioxidant efficiency of our extracts was also determined, therefore we used 4 different methods: DPPH<sup>•</sup> assay (scavenging activity of DPPH<sup>•</sup> radical), reducing power, antioxidant activity in emulsified linoleic acid ( $\beta$ - carotene bleaching assay). Primary and secondary oxidation products were determined spectrophotometrically. Extracts have shown antioxidant efficiency and they were comparable to the most common and used commercial antioxidants, such as ascorbic acid and BHT. The flaxseed extract has shown to have higher reducing power as compared to ascorbic acid, while both sorts of white mustard came out comparable to ascorbic acid. Analyzed extracts had lower activity in comparison with BHT in emulsion at  $\beta$ -carotene bleaching assay. As well as in  $\beta$ -carotene bleaching assay, antioxidants from flaxseed extract showed the highest potential in free radical scavenging effectiveness. BHT proved to have less antioxidant ability than flaxseed, but it was quite superior to both sorts of white mustard. BHT also proved to be better than all our investigated extracts at primary oxidation products testing in the lipid system, but it was surprisingly slightly inferior to the extract of white mustard sort 2 (bela gorjušica 2) at secondary oxidation product testing.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</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>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 STRANSKI PROIZVODI .....	3
<b>2.1.1 Preostanki pri stiskanju olja .....</b>	<b>3</b>
2.2 BELA GORJUŠICA .....	4
2.3 LAN .....	5
2.4 RADIKALI .....	7
<b>2.4.1 Oksidacija maščob .....</b>	<b>7</b>
2.5 ANTIOKSIDANTI (FENOLNE SPOJINE).....	9
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>11</b>
3.1 MATERIALI .....	11
<b>3.1.1 Ostanki semen po stiskanju – pogače .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2 Reagenti in pribor .....</b>	<b>12</b>
3.2 METODE.....	14
<b>3.2.1 Priprava vzorca .....</b>	<b>14</b>
3.2.1.1 Homogenizacija vzorca .....	14
3.2.1.2 Razmastitev vzorca.....	14

<b>3.2.2</b>	<b>Ekstrakcija</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Določanje skupnih fenolih spojin v pogači semen</b> .....	<b>16</b>
3.2.3.1	Umeritvena krivulja.....	16
<b>3.2.4</b>	<b>Analiza sposobnosti redukcije</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Analiza DPPH</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Beljenje <math>\beta</math>-karotena</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Določitev primarnih in sekundarnih produktov oksidacije</b> .....	<b>21</b>
3.2.7.1	Priprava lipidnega sistema.....	21
3.2.7.2	Spektrofotometrično določanje primarnih in sekundarnih produktov oksidacije.....	22
<b>3.2.8</b>	<b>Statistična analiza</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>24</b>
4.1	VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN.....	24
4.2	SPOSOBNOST REDUKCIJE.....	26
4.3	ANALIZA DPPH.....	29
4.4	BELJENJE $\beta$ -KAROTENA.....	35
4.5	SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH PRODUKTOV OKSIDACIJE.....	39
4.6.1	Določanje konjugiranih dienov.....	40
4.6.2	Določanje konjugiranih trienov.....	43
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>49</b>
<b>ZAHVALA</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Volumen ( $V$ ) izhodne raztopine klorogenske kisline, masne koncentracije klorogenske kisline v mikrocentrifugirki ( $\gamma$ ) in vrednosti izmerjene absorbance ( $A_{765}$ ) .....	17
Preglednica 2: Vrednosti izmerjenih in povprečnih absorbcanc ( $A_{765}$ ).....	24
Preglednica 3: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v razmaščenih pogačah bele gorjušice 1, bele gorjušice 2 in lanu ter koncentracija fenolnih spojin v metanolnih ekstraktih ( $\gamma_{\text{izh}}$ ).....	25
Preglednica 4: Koncentracija fenolnih snovi ( $\gamma$ ) v ekstraktih, pripravljenih iz razmaščenih pogač bele gorjušice 1, bele gorjušice 2, lanu in askorbinske kisline v reakcijski zmesi, izmerjene in povprečne absorbance ( $A_{740}$ ) ter redukcijska moč ( $C_R$ ).....	27
Preglednica 5: Koncentracija fenolnih snovi ( $\gamma$ ) v ekstraktih, pripravljenih iz razmaščenih pogač bele gorjušice 1, bele gorjušice 2, lanu in BHT v reakcijski zmesi, izmerjene absorbance ( $A_{517}$ ) ter % preostalega DPPH· v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije .....	30
Preglednica 6: Nakloni premic in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za redukcijo 50 % DPPH· radikalov .....	34
Preglednica 7: Vrednosti absorbcanc za emulzijo ( $A_{470}$ ) z ekstrakti bele gorjušice 1, bele gorjušice 2, lanu, BHT in kontrolnega vzorca izmerjene pri različnih časih ( $t$ ).....	36
Preglednica 8: Koeficienti antioksidativne učinkovitosti v emulziji ( $C_{AO}$ ) ekstraktov oljnic in BHT po 120 min inkubiranja pri 50 °C.....	37
Preglednica 9: Izmerjene in povprečne vrednosti absorbcanc $A_{232}$ ter ustrezne vrednosti $E_{1\text{cm}}^{1\%}(232)$ v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter v olju brez dodatka antioksidantov v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C .....	40
Preglednica 10: Izmerjene in povprečne vrednosti absorbcanc $A_{268}$ in ustrezne vrednosti $E_{1\text{cm}}^{1\%}(268)$ v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter v olju brez dodatka antioksidantov v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C .....	43



## KAZALO SLIK

Slika 1: Bela gorjušica (Cohen, 2011).....	5
Slika 2: Navadni lan (Elisseva, 2006) .....	6
Slika 3: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006).....	10
Slika 4: Shema ekstrakcije.....	15
Slika 5: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino .....	17
Slika 6: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih razmaščenih oljnih pogač .....	25
Slika 7: Odvisnost absorbance od koncentracije fenolnih spojin v metanolnih ekstraktih v reakcijski zmesi .....	28
Slika 8: Redukcijska moč ( $C_R$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>-1</sup> ) ekstraktov bele gorjušice 1 in 2, lanu in askorbinske kisline .....	28
Slika 9: Delež DPPH·, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolov v reakcijski zmesi.....	31
Slika 10: Delež DPPH·, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin za pogačo bele gorjušice 1 .....	32
Slika 11: Delež DPPH·, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin za pogačo bele gorjušice 2 .....	32
Slika 12: Delež DPPH·, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin za pogačo lanu.....	33
Slika 13: Delež DPPH·, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od koncentracije komercialnega antioksidanta BHT .....	33
Slika 14: Koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za zmanjšanje 50 % začetne vrednosti DPPH· ( $ED_{50}$ ) za pogače bele gorjušice 1 in 2, lanu ter BHT .....	34

Slika 15: Odvisnost koeficientov antioksidativne učinkovitosti v reakcijski emulziji ( $C_{AO}$ ) od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C za ekstrakte oljnic in BHT .....	38
Slika 16: Odvisnost $E_{1\text{cm}(232)}^{1\%}$ v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter olja brez dodatka antioksidantov v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C .....	41
Slika 17: $E_{1\text{cm}(232)}^{1\%}$ v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter olja brez dodatka antioksidantov po 14-dnevni inkubaciji pri temperaturi 50 °C .....	42
Slika 18: $E_{1\text{cm}(268)}^{1\%}$ v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter olja brez dodatka antioksidantov v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C .....	44
Slika 19: $E_{1\text{cm}(268)}^{1\%}$ v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter olja brez dodatka antioksidantov po 14-dnevni inkubaciji pri temperaturi 50 °C .....	45

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$A$  – absorbanca

$A\bullet$  – radikal antioksidanta

AH – antioksidant

AK – askorbinska kislina

BHT – butiliran hidroksitoluen

$C_{AO}$  – koeficient antioksidativne učinkovitosti

$C_{CA}$  – koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov

DPPH• – 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil

$E_{1\text{cm}(\lambda)}^{1\%}$  – absorbanca raztopine olja pri koncentraciji 1g olja/100 ml raztopine v cikloheksanu

$ED_{50}$  – koncentracija fenolnih spojin, ki za 50 % zmanjša začetno količino DPPH•

FC – Folin-Ciocalteu

GRAS – generally recognized as safe

IHPS – inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

KK – klorogenska kislina

LDL – lipoproteini nizke gostote

$R\bullet$  – radikal

RH – maščobna kislina

ROO• – peroksilni radikal

ROOH – peroksid

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

SV – slepi vzorec

$V$  – volumen

$\gamma$  – masna koncentracija

## 1 UVOD

Človeški organizem je izpostavljen različnim stresom. Že običajna presnova povzroča nastanek prostih radikalov, ki se lahko poveča ob izpostavitvi stresom, nekaterim kemikalijam, sevanju, vplivu alkohola, cigaret, težkim kovinam, katranastim snovem izpušnih plinov, prekajeni in zapečeni hrani. V našem organizmu sta po izvoru dve vrsti antioksidantov: endogeni in eksogeni. Endogene proizvaja naše telo samo, medtem ko moramo eksogene pridobiti s hrano. Raziskave so pokazale na povezavo med eksogenimi antioksidanti hrane in zaščito pred boleznimi srca in ožilja, nastankom raka in drugimi boleznimi, povezanimi z oksidativnim stresom v organizmu (Kreft in sod., 2000).

Zadnja leta poudarjamo pomen zdrave hrane, ki je pripravljena brez umetnih aditivov. Tako se je tudi na področju antioksidantov pričelo večati povpraševanje po naravnih antioksidantih. Vse več potrošnikov je pozornih in obveščenih glede sestave hrane, ki jo zaužijejo.

Osnovno načelo živilske industrije je proizvodnja hrane, ki je zdrava, hkrati pa ima tudi čim daljši čas uporabnosti. Industrija je do sedaj uporabljala predvsem sintetične antioksidante. V zadnjem času pa so mnoge raziskave pokazale sum, da slednji delujejo rakotvorno, zato je vse več potreb po zamenjavi sintetičnih aditivov z naravnimi, ki so neškodljivi za človeški organizem.

Bela gorjušica in lan sta oljarici, ki so jih poznali že v antiki. Ob njihovih imenih pomislimo na različne stvari: od biodizla, firneža, lanenega prediva oziroma oblačil, do proizvodnje gorčice. Res je, da se nismo čisto nič zmotili, pa vendar je večinski obseg pridelave lanu namenjen predvsem pridobivanju olja, medtem ko se bela gorjušica v Evropi seje predvsem za proizvodnjo gorčice iz njenega semena. Gorjušica in lan imata veliko pozitivnih učinkov na zdravje človeka, zato so jih sprva uporabljali kot zdravilo. Njihova semena so uporabljali za zunanje obkladke in obliže, njihovo olje z ugodno maščobnokislinsko sestavo pa se je uporabljalo za odpravljanje notranjih težav, kot so npr. prebavne motnje in pojav žolčnih kamnov.

Olje bele gorjušice in lanu pridobivajo s stiskanjem semen, olje nato še prečistijo. Poleg glavnega produkta – olja, nastane pri stiskanju tudi ostanek – pogača, kot stranski produkt, v kateri je velika vsebnost biološko aktivnih spojin. Pogača se je v preteklosti uporabljala

le kot krmilo za živali oziroma kot gnojilo, z njo pa so se zavrgle tudi biološko pomembne spojine.

Zato se stranskim proizvodom predelave rastlinskih živil namenja pozornost kot surovini za pridobivanje visoko vrednih učinkovin, ki bi imele uporabno vrednost GRAS dodatkov v živilskih izdelkih ter pri pripravi funkcionalnih živil in nutracevtikov (Abramovič in sod., 2008)

### 1.1 NAMEN NALOGE

V sklopu diplomskega dela smo želeli dokazati, da so pogače vir fenolnih spojin, določiti količino skupnih fenolnih spojin in ugotoviti antioksidativni učinek ekstraktov v različnih sistemih (lipidnem, polarnem, emulziji).

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bodo metanolni ekstrakti pokazali antioksidativni učinek. Pričakujemo tudi, da sta vsebnost in antioksidativni učinek fenolnih spojin različna med preiskovanima vrstama oljnic (bela gorjušica in lan) ter med sortama znotraj vrste bele gorjušice.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 STRANSKI PROIZVODI**

V pridelovalno predelovalni verigi rastlinskih živil nastaja veliko odpadkov, ki jih lahko koristno uporabimo. Zaradi velike pestrosti osnovnih surovin je paleta stranskih proizvodov skoraj nepregledna. Izolacijski materiali v gradbeništvu in embalažna polnila predstavljajo primer nizkocenovnih proizvodov iz rastlinskih surovin. V to skupino lahko uvrstimo tudi neposredno uporabo in preprosto predelavo v krmila za živali, kompostiranje in predelavo, v etanol in biodizel (Hribar in sod., 2008).

Iz rastlinskih odpadnih surovin pa lahko izoliramo celo paleto funkcionalnih bioaktivnih snovi, ki se lahko neposredno uporabijo pri razvoju novih živil ali pa predstavljajo osnovo za prehranske, farmacevtske, kozmetične ali biotehnološke izdelke (Hribar in sod., 2008).

Oksidacija in mikrobiološki kvar vplivata na prehransko vrednost in senzorične lastnosti živil. Zaradi dokazano škodljivih vplivov nekaterih sintetičnih aditivov lahko naravne snovi z antioksidativno in protimikrobno aktivnostjo prispevajo h kakovosti in varnosti hrane. Dodatek takšnih sestavin živilskemu izdelku podaljša obstojnost ter zviša biološko vrednost živila (Abramovič in sod., 2008).

#### **2.1.1 Preostanki pri stiskanju olja**

Med pridelavo olj po stiskanju semen dobimo olje in stranski produkt, oljno pogačo. Slednja se zaradi visoke vsebnosti beljakovin (od 15 do 50 %) najpogosteje uporablja kot krmilo za živali, neužitne dele pogač uporabljajo kot gnojilo obogateno z dušikom (Ramachandran in sod., 2006), lahko pa jo uporabimo tudi kot gorivo (Matthäus, 2002). Vendar pa bi po stiskanju ostanek bolje izkoristili, saj vsebuje poleg beljakovin tudi veliko bioaktivnih spojin, ki bi se lahko uporabile kot fungicidi in baktericidi ali pa kot naravni antioksidanti za zaščito maščob in olj pred avtooksidacijo (Barberan, 2007).

Med oljnice, ki jih pridelujejo z namenom pridobivanja olja, pri čemer preostaja velika količina odpadnih produktov, sodita tudi bela gorjušica in lan.

## 2.2 BELA GORJUŠICA

Bela gorjušica (*Sinapis alba* L.) je k nam prišla iz Azije, kjer so jo poznali že pred dva tisoč leti. Močno razširjena je bila tudi v Evropi pri Rimljanih in Grkih, predvsem zaradi tega, ker so iz njenih semen izdelovali gorčico, kot učinkovino v obliki obkladkov pa so uporabljali gorčično olje, ki je bilo uporabno tudi za razsvetljavo (Kocjan Ačko, 1999). Pri nas jo sejemo predvsem kot rastlino za podor. Listi so pecljati, krpati in dlakavi, parno pernati, z valovitimi robovi listnih ploskev. Njeni cvetovi so rumene barve, cveti neenakomerno, cvetenje pa se lahko zavleče pozno v jesen. Za belo gorjušico je značilno, da se medsebojno oprahuje. Je tako vetrocvetka kot tudi žužkocvetka, zato je primerna tudi za čebeljo pašo (Čeh, 2009).

Bela gorjušica se prideluje zaradi semena, ki vsebuje od 20 % do 40 % maščob. Olje je zlatorumene barve, uporabno pa kot solatno olje in olje za cvrenje, konzerviranje rib, uporabljajo ga pri izdelavi mil, pralnih sredstev in impregniranih tkanin. Olje sort z večjo vsebnostjo eruka kisline, ki niso primerne za prehrano, pa za maziva. V ljudskem zdravilstvu belo gorjušico uporabljajo za zdravljenje številnih bolezni, med njimi so celo karcinogena obolenja, zobobol in bolečine v ušesih, bronhitis, druge težave respiratornih organov in kot diuretik. Zmanjševala naj bi tudi lokalno bolečino in revmatske bolečine, spodbujala izločanje želodčnih sokov, izboljševala apetit, pospeševala prebavo beljakovin in maščob. V želodcu deluje razstrupljevalno in poveča želodčno peristaltiko. Pretiravanje pri uživanju pa lahko po drugi strani razdraži in vname želodčno in črevesno sluznico. Iz semen so stari Grki in Rimljani stiskali olje, ki so ga uporabljali za razsvetljavo, mlade liste so uživali kot solato in rastlino pripravljali, kot pri nas pripravljamo špinačo. Seme vsebuje 26 % do 28 % beljakovin in večje količine glukozinolatov, zaradi katerih ima ostro pekoč okus. Zaradi te lastnosti s semenom bele gorjušice aromatizirajo kis, ga dodajajo pri vlaganju kumaric in druge zelenjave, pri pripravi divjačinskih omak, marinade za ribe. Mlade rastlinice (visoke do 3,5 cm) se uporabljajo pri pripravi solat. V kulinariki se uporabljajo tudi kalčki. Seme vsebuje še 28,2 % ogljikovih hidratov, od 5,2 % do 10,3 % vlaknin in od 4,1 % do 4,5 % pepela (Čeh, 2009).

Zmleta semena se uporabljajo za izdelavo začimbe, imenovane gorčica ("zenf"), pripravo eteričnega olja in obližev. Obliže in mazila, ki so jim dodajali zelišča, so v ljudskem zdravilstvu uporabili za odpravljanje različnih bolezenskih težav (Čeh, 2009).



Slika 1: Bela gorjušica (Cohen, 2011)

### 2.3 LAN

Lan (*Linum usitatissimum*) je ena izmed najstarejših kulturnih rastlin. Poznali so ga že v mlajši kameni dobi, danes pa ga gojijo po vsem svetu. O starodavni uporabi lanu pričajo najdišča semen, olja in izdelkov iz lanenih vlaken v Sumeriji, Mezopotamiji in Egiptu 5000 let pred našim štetjem. Grki in Rimljani so laneno seme in olje uporabljali za zdravila, olje tudi za rasvetljava. Iz lanenih niti so tkali platno, iz njega pa krojili obleke. Beseda plačati izhaja iz besede platno (platiti), saj so Slovani s platnom namreč plačevali druge življenske potrebščine (Kocjan Ačko, 1999).

Pridelujemo ga zaradi semen, olja in vlaken. Seme vsebuje od 30 % do 50 % maščob, od 20 % do 30 % beljakovin, od 4 % do 10 % sluzi, lecitin in vrsto vitaminov (A, B, D, E, F). V prehrani ljudi se seme uporablja za lajšanje presnovnih motenj, urejanje prebave in za odvajanje, dober vpliv ima na dihala in sečila. Laneno seme je poznano kot eno izmed najboljših naravnih zdravil proti kroničnemu zaprtju, pri čemer deluje tako, da v tekočem okolju nabreka, pri čemer se sprošča sluz, tako da blato postane bolj spolzko (Čeh, 2009).



Kot blago polnilno odvajalo so se izkazala predvsem zdrobljena semena. Pri zdrobljenih semenih se iz semenske notranjosti namreč v večji meri sprostijo olja, ki delujejo mazljivo. V ljudski medicini s prevretkom jedilne žlice semen v skodelici vode blažijo katar gornjih dihalnih poti ter vnetja želodčne sluznice (Špringer, 2003). Zmleto seme, pripravljeno kot kaša, se nanese na krpo in položi na kožo pri revmi, vnetih pljučih ali rebri mreni. V ljudski medicini so tak način uporabili tudi za izgnojevanje ran. V kulinariki seme zamešamo v posebne vrste kruha, za solate in juhe pa se uporabljajo tudi laneni kalčki (Čeh, 2009).

Z uživanjem čistega lanenega olja si pomagamo pri nezdravi polti, žolčnih kamnih, vnetjih prebavil, živčnih obolenjih, preprečuje nabiranje maščob na stenah žil, itd. Ker spada v skupino lahkosušnih olj, ga uporabljajo kot hitro sušeča se olja za izdelavo barv, lakov, linoleja, herbicidov, firneža, tiskarskega črnila, za strojenje usnja, itd. Uporabljajo ga tudi v farmaciji in kozmetiki. Vlakena so uporabna tudi v zdravstvene namene, iz njih izdelujejo kakovostne kirurške niti. Laneno olje in predivo sta kombinacija za tesnjenje vodovodnih cevi (Čeh, 2009).

Po stiskanju semena ostane lanena pogača, ki jo uporabljamo za pripravo zdravilnih obližev za mehčanje podkožnih turov, zamašenih lojnic,... ali za krmo domačih živali (Čeh, 2009).



Slika 2: Navadni lan (Elisseva, 2006)

## 2.4 RADIKALI

Radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim elektronom brez para. To so visoko reaktivne zvrsti, ki nastajajo pri cepitvi kovalentne vezi (Korošec, 2000).

V večini organizmov kisik ni samo potreben za življenje. Je razlog, da v celici kot rezultat normalne presnove (dihanja) nastajajo radikali oziroma t.i. reaktivne kisikove zvrsti (reactive oxygen species – ROS) (Jovanovič in Simič, 2000). Oksidativni stres je povezan z zvišano vsebnostjo teh zvrsti (Kehrer in Smith, 1994). Oksidativni stres se v bioloških sistemih pokaže, če je bil sistem dalj časa izpostavljen oksidantom in/ali če je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma. Je posledica dejavnikov okolja, kot so UV in gama žarki, toplota, kajenje, onesnaževanje okolja, itd. Tudi nekatere snovi in zdravila (alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki, itd.) povzročajo nastanek prostih radikalov (Korošec, 2000).

Reaktivne kisikove zvrsti poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni in so udeležene pri številnih normalnih in patoloških procesih v telesu. Pomembna je njihova vloga pri staranju, degenerativnih boleznih, raku, ishemiji, kardiovaskularnih boleznih, aterosklerozi, zmanjšani imunski odzivnosti, Alzheimerjevi in Parkinsonovi in Crohnovi bolezni, pri sladkorni bolezni, itd (Korošec, 2000). Posledice oksidacije je mogoče najti na molekularnem nivoju kot oksidirane lipide, proteine ali DNA.

Najpomembnejše reaktivne kisikove zvrsti so superoksidni anionski radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), tripletni kisik ( $^3O_2$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ), hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), radikal dušikovega oksida ( $NO^{\cdot}$ ) in peroksilni radikal ( $ROO^{\cdot}$ ) (Korošec, 2000).

### 2.4.1 Oksidacija maščob

V živilih je nastanek radikalov povezan z oksidacijo maščob. To je kompleksen proces, ki poteka lahko po treh različnih potek (Laguerre in sod., 2007):

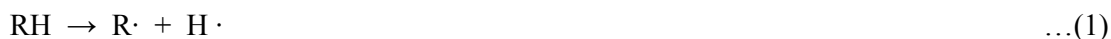
- neencimska verižna avtooksidacija, povzročena z prostimi radikali,
- neencimska fotooksidacija,
- encimska oksidacija.

Avtooksidacija je glede na pojavnost glavni mehanizem oksidacije maščob v živilih. Odvije se v prisotnosti kisika ob povišani temperaturi, v prisotnosti prostih radikalov, svetlobe, fotosintetskih pigmentov in kovinskih ionov. Poteka v treh osnovnih fazah (Laguerre in sod., 2007):

- iniciacija ali začetek,
- propagacija ali širjenje,
- terminacija ali zaključek.

#### ➤ Iniciacija

V začetni fazi gre za odcepitev vodikovega atoma (H) iz maščobnokislinske verige (RH) in nastanek alkilnega radikala (R·):



#### ➤ Propagacija

V tej fazi nastali prosti radikal reagira s kisikom (O<sub>2</sub>), posledica je nastanek peroksilnega radikala (ROO·):



Nastali radikal hitro pritegne vodikov atom z naslednje lipidne molekule, posledično nastane peroksid (ROOH) in novi radikal:



Alkilni radikal lahko reagira s kisikom in tako nastane nov peroksilni radikal, s čimer se proces propagacije nadaljuje.

#### ➤ Terminacija

Proces oksidacije se zaključi, ko radikali reagirajo med seboj in nastanejo nereaktivni produkti, kar ustavi ponavljajočo fazo propagacije:



## 2.5 ANTIOKSIDANTI (FENOLNE SPOJINE)

Antioksidanti so v središču pozornosti v živilski industriji, ker preprečujejo žarkost oz oksidacijo. Prav tako je veliko zanimanje za njih, ker naj bi pomagali pri zaščiti našega telesa pred poškodbami, ki jih povzročijo reaktivne zvrsti kisika (Halliwell in sod., 1995). Porušeno ravnotežje med radikali in antioksidanti imenujemo oksidativni stres (Korošec, 2000).

Antioksidanti so lahko encimski ali neencimski, topni v vodi ali v maščobah (Briviba in Sies, 1994). Učinkujejo kot odjemalci radikalov (reagirajo z radikali in na ta način preprečijo prostim radikalom reagiranje pri verižnih radikalskih reakcijah), kot odjemalci kisika (reagirajo s kisikom in ga kot takšnega odstranijo iz reakcije), kot sinergisti (povečujejo učinkovitost odjemalcem radikalov) in kot snovi, ki popravljajo poškodbe povzročene s strani prostih radikalov.

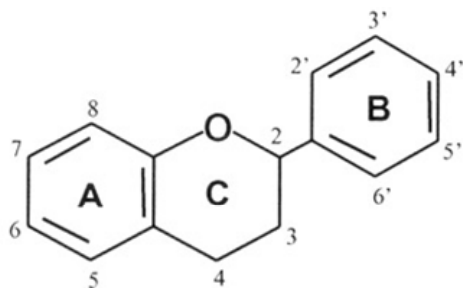
Fenolne spojine imajo strukturo, ki določa njihov antioksidativni potencial (Murkovic, 2003). Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastanejo iz primarnih metabolitov celice. Te spojine imajo pomembno vlogo pri rasti in razmnoževanju celic, omogočajo zaščito pred patogenimi mikroorganizmi in škodljivci (Bravo, 1998).

Fenolne spojine igrajo pomembno vlogo tako v rastlinah, kot tudi v hrani. Glavna vloga fenolnih spojin v hrani je, da nastopajo kot barvila in antioksidanti. Kot antioksidanti doprinesejo k podaljšanju obstojnosti oz. roka trajanja hrane, ki je omejen zaradi oksidacijskih reakcij, predvsem maščobne oksidacije. Ne le, da oksidirana hrana predstavlja problem zaradi žarke arome, pač pa ima vpliv tudi na človekovo zdravje (Murkovic, 2003).

Fenolne spojine so številčna in raznolika skupina spojin. Vsebujejo vsaj en aromatski obroč, na katerem je ena ali več hidroksilnih spojin (Abram in Simčič, 1997). Polifenoli je skupno ime za fenole, ki vsebujejo več hidroksilnih skupin. Prehransko so najpomembnejše fenolne kisline, flavonoidi in tanini (Balasundram in sod., 2006).

Flavonoidi so med fenolnimi spojinami največja skupina. So barvila v zelenjavi, sadju in žitih. Zaradi grenkega okusa odganjajo parazite, prav tako delujejo kot zaščita rastline pred UV žarki, saj jih absorbirajo (Jovanovič in sod., 1997). Flavonoidi so fenolne spojine

zgrajene iz 15 C-atomov. Strukturno so sestavljeni iz dveh aromatskih obročev A in B, povezanimi med seboj s tremi ogljiki v obliki heterocikličnega obroča C (Abram, 2000).



Slika 3: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006)

Fenolne spojine so antioksidanti, ki lahko preprečijo oksidacijo maščob na več načinov (Briviba in Sies, 1994):

- z lovljenjem radikalov,
- z vezavo kovinskih ionov,
- z inhibicijo encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek prostih radikalov.

Pri preprečevanju oksidacije LDL holesterola imajo dvojno vlogo. Poleg tega, da so zmožni loviti proste radikale, so tudi dobri agensi za vezavo  $\text{Cu}^{2+}$  ionov, ki so nujni za začetek peroksidacije lipidov (Morel in sod., 1997).

Fenolne spojine (AH) onesposobijo proste radikale z oddajo vodikovega atoma, pri čemer same preidejo v radikalsko obliko ( $\text{A}\cdot$ ) (Prior in sod., 2005):



Pri fenolnih kislinah antioksidativna učinkovitost narašča s številom hidroksilnih skupin na benzenovem obroču in se zniža, če hidroksilno skupino na tretjem in petem C-atomu v benzenovem obroču nadomesti metoksilna skupina (Balasundram in sod., 2006). Antioksidativno učinkovitost flavonoidov zviša večje število hidroksilnih skupin na B-obroču v molekuli, dvojna vez med drugim in tretjim ogljikovim atomom, konjugirana s 4-okso skupino v C-obroču, prisotnost hidroksilne skupine na tretjem ogljikovem atomu v C-obroču ter stopnja polimerizacije.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 Ostanki semen po stiskanju – pogače**

Za analize smo uporabili pogači dveh sort bele gorjušice in eno pogačo lanu. Pogače je zagotovil Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), kjer je potekala raziskava v okviru CRP (ciljni razvojni program) z naslovom Proizvodnja surovin in izdelava biodizla in biomaziv za potrebe slovenskega trga, čigar nosilec je Barbara Čeh.

Ena sorta bele gorjušice je sorta Achilles (v nadaljevanju bela gorjušica 1), druga je seme proizvajalca Dejana Rengeo (v nadaljevanju bela gorjušica 2), lan pa je sorta Cebeco. Olnice so zrasle na prostoru poskusnega posestva IHPS v letu 2007 v okviru že omenjenega CRP-a.

Olnice so bile stisnjene na poskusni stiskalnici na Kmetijskem inštitutu na Oddelku za kmetijsko tehniko. Semena so pred stiskanjem olja zdrobili, ob drobljenju in mešanju se je temperatura gibala med 30 in 40 °C (potekalo je hladno stiskanje). Pogače so bile do analiz shranjene v hladilniku pri temperaturi 5 °C.

### 3.1.2 Reagenti in pribor

Za analize smo uporabili naslednje reagente:

- askorbinska kislina (99 % čistost, Sigma, Nemčija)
- $\beta$ -karoten (čistost > 97 %, Fluka, Švica)
- BHT (analitska čistost, Fluka, Švica)
- cikloheksan (analitska čistost, Merck, Nemčija)
- DPPH· reagent (Sigma, Nemčija)
- etanol (96 %, Merck, Nemčija)
- reagent Folin-Ciocalteu (Fluka, Švica)
- kalijev heksacianoferat (II) (analitska čistost, Kemika, Hrvaška)
- kloroform (analitska čistost, Merck, Nemčija)
- klorogenska kislina (čistost > 95 %, Sigma, Nemčija)
- linolna kislina (čistost > 95 %, Sigma, Nemčija)
- metanol (analitska čistost, Merck, Nemčija)
- natrijev karbonat (analitska čistost, Alkaloid, Makedonija)
- olje barvilnega rumenika *Carthamus tinctorius* L. (Sigma, Nemčija)
- trikloacetna kislina (čistost 99,5 %, Merck, Nemčija)
- Tween 20 detergent (Sigma, Nemčija)
- železov (III) klorid (čistost > 99 %, Carlo Erba Reagenti, Italija)

Za pripravo raztopin smo uporabili bidestilirano vodo.

Uporabljali smo naslednje aparature in pribor:

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija)
- keramična terilnica
- komora (Kambič)
- magnetno mešalo (IKA RH basic KT/C, Nemčija)
- rotacijski stresalnik (Mrzel)
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica)
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, Združene države Amerike)
- tehtnica (Mettler Toledo AT201, Švica)
- ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52, Nemčija)
- vortex



## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava vzorca

#### 3.2.1.1 Homogenizacija vzorca

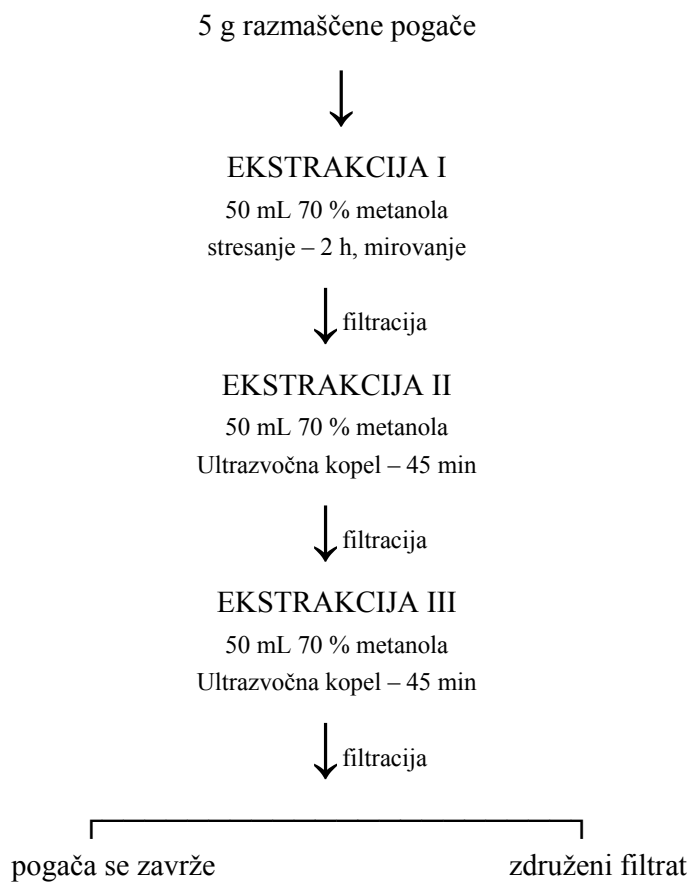
Pogačo smo zdrobili v keramični terilnici.

#### 3.2.1.2 Razmastitev vzorca

Zatehtali smo 7 g zdrobljene pogače v erlenmajerico in dodali 70 mL heksana ter postavili na stresalnik. Stresali smo 2 h, nato je vzorec še 2 h miroval. S pomočjo vakuumske črpalke smo odstranili heksan. Razmaščeno pogačo smo v digestoriju enakomerno razporedili po petrijevki, da je izhlapel še preostali heksan.

### 3.2.2 Ekstrakcija

Po razmastitvi je sledila ekstrakcija. V erlenmajerico smo zatehtali 5 g posušenega razmaščenega vzorca, dodali 50 mL 70 % metanola (v/v). Vzorec smo postavili na stresalnik za 2 h, odstavili in pustili mirovati čez noč. Naslednji dan smo vzorec filtrirali z vakuumsko črpalko in filtrat skrbno prelili v stekleno bučko. Pogačo smo pretresli nazaj v erlenmajerico in zopet dodali 50 mL 70 % metanola. Vzorec smo postavili v ultrazvočno kopel za 45 min in ga zatem filtrirali. Filtrat smo prelili v stekleno bučko, pogači pa ponovno dodali 50 mL 70 % metanola. Postavili smo ga za 45 min v ultrazvočno kopel, prefiltrirali, filtrat prelili v stekleno bučko, pogačo pa zavrgli. Filtrate smo združili. Postopek ekstrakcije je bil opravljen po modificirani metodi, ki je opisana v literaturi (Matthäus, 2002).



Slika 4: Shema ekstrakcije

Pridobljeni filtrat nato sušimo z rotavaporjem pri temperaturi 45 °C. Suhi preostanek smo raztopili v 15 mL 99,9 % metanola in shranili v zmrzovalniku do nadaljnjih analiz.

### 3.2.3 Določanje skupnih fenolih spojin v pogači semen

Za določitev skupnih fenolov smo izvedli Folin-Ciocalteu metodo. Postopek je povzet po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981).

Reagenti:

- 99,9 % metanol
- raztopina natrijevega bikarbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (20 %, w/v)
- Folin-Ciocalteu reagent (vodna raztopina, razmerje Folin-Ciocalteu/voda je 1:2 v/v)
- bidestilirana voda

V mikrocentrifugirko (v nadaljevanju epica) z volumnom 1,5 mL smo odpipetirali 0,025 mL raztopine ekstrakta, dodali 0,175 mL metanola in 0,125 mL reagenta Folin-Ciocalteu, premešali in dodali 0,125 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata ter 0,550 mL bidestilirane vode. Skupni volumen raztopine v epici ( $V_{\text{epica}}$ ) je znašal 1 mL. Vse smo dobro premešali na vortex mešalu.

Slepi vzorec je bil pripravljen po istem postopku, le da smo namesto ekstrakta odpipetirali enako količino bidestilirane vode.

Zmes smo centrifugirali v Eppendorf centrifugi 5415c 10 min pri 14.000 r/min. Po 40 minutah od dodatka bidestilirane vode smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm ( $A_{765}$ ) proti slepemu vzorcu. Vsako meritev smo trikrat ponovili.

#### 3.2.3.1 Umeritvena krivulja

Reagenti:

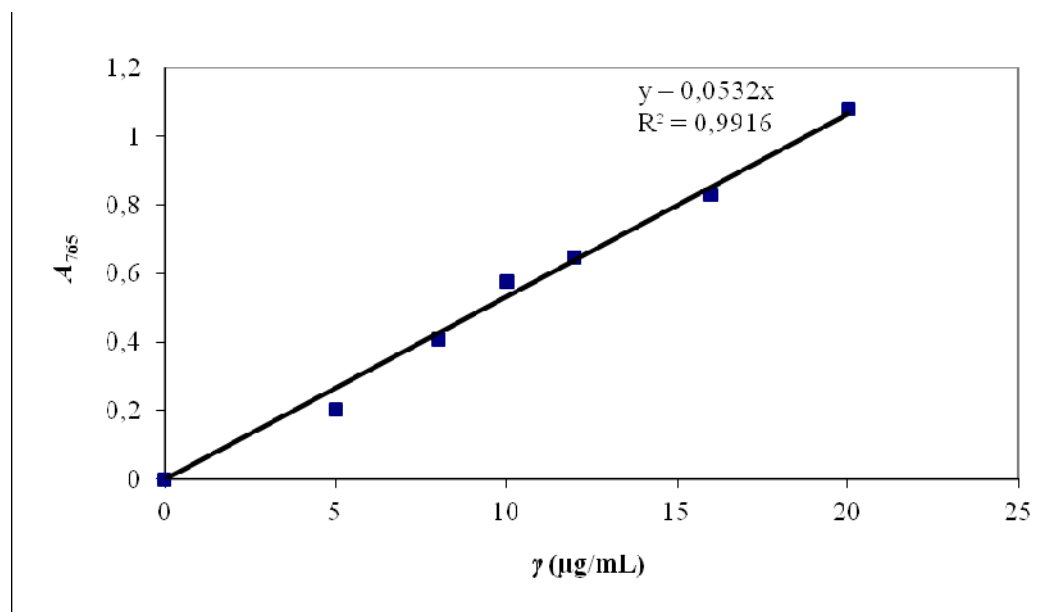
- klorogenska kislina
- 99,9 % metanol
- raztopina natrijevega bikarbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (20 %, w/v)
- Folin-Ciocalteu reagent (vodna raztopina, razmerje Folin-Ciocalteu/voda je 1:2 v/v)
- bidestilirana voda
- metanol

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili klorogensko kislino. V 10 mL bučko smo zatehtali 4 mg klorogenske kisline in z metanolom dopolnili do oznake. Nato smo tako dobljen vzorec razredčili s topilom v razmerju 1:1, v/v. Koncentracija izhodne raztopine je bila 200  $\mu\text{g/mL}$ . V epice smo odmerili različne volumne izhodne raztopine in v skladu s Folin-Ciocalteu metodo izmerili absorbanco pri 765 nm.

Preglednica 1: Volumen ( $V$ ) izhodne raztopine klorogenske kisline, masne koncentracije klorogenske kisline v mikrocentrifugirki ( $\gamma$ ) in vrednosti izmerjene absorbanco ( $A_{765}$ )

$V$ ( $\mu\text{L}$ )	$\gamma$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$A_{765}$
25	5	0,20385
40	8	0,40571
50	10	0,57438
60	12	0,64688
80	16	0,82973
100	20	1,07860

Iz izmerjene absorbanco in masne koncentracije klorogenske kisline smo narisali umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 6. Z linearno regresijsko analizo smo določili smerni koeficient premice. Vrednost smernega koeficienta  $k$  je  $0,053 \pm 0,001$  ( $R^2=0,9916$ ).



Slika 5: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v mikrocentrifugirki (epici) smo dobili iz zveze:

$$\gamma_{\text{epica}} = A_{765}/k \quad \dots(8)$$

$\gamma_{\text{epica}}$  – masna koncentracija fenolnih spojin v epici

$A_{765}$  – absorbanca pri valovni dolžini 765 nm

$k$  – smerni koeficient

S pomočjo zveze med masno koncentracijo v epici in volumnom raztopine v epici smo določili maso fenolnih snovi v epici:

$$m_{\text{epica}} = \gamma_{\text{epica}} \times V_{\text{epica}} \quad \dots(9)$$

$m_{\text{epica}}$  – masa fenolnih snovi v epici

$\gamma_{\text{epica}}$  – masna koncentracija fenolnih spojin v epici

$V_{\text{epica}}$  – volumen raztopine v epici

Iz mase fenolnih snovi v epici in z znanim volumnom odpipetirane raztopine ekstrakta smo lahko izračunali še masno koncentracijo fenolnih snovi v izhodni raztopini ekstrakta:

$$\gamma_{\text{izh}} = m_{\text{epica}}/V_{\text{pip}} \quad \dots(10)$$

$\gamma_{\text{izh}}$  – masna koncentracija fenolnih snovi v izhodni raztopini ekstrakta

$m_{\text{epica}}$  – masa fenolnih snovi v epici

$V_{\text{pip}}$  – volumen odpipetirane raztopine ekstrakta

### 3.2.4 Analiza sposobnosti redukcije

Analiza redukcijske sposobnosti nam poda antioksidacijski potencial določene spojine. Med analizo se  $\text{Fe}^{3+}$  ioni reducirajo do  $\text{Fe}^{2+}$ , kar povzroči znižanje fericianidnega kompleksa. To spremembo določimo z merjenjem absorbance pri 740 nm (Juntachote in sod., 2006).

### Reagenti:

- raztopina trikloroacetne kisline ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) (20 %, w/v)
- raztopina kalijevega heksacianoferata (II) ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) (1 %, w/v)
- fosfatni pufer s  $\text{pH}=6,8$
- raztopina železovega (III) klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) (1 %, w/v)
- bidestilirana voda
- metanol

Raztopino trikloroacetne kisline smo pripravili tako, da smo odtehtali 20 g trikloroacetne kisline in jo v 100 mL bučki raztopili z bidestilirano vodo. Raztopino kalijevega haksacianoferata (II) smo pripravili tako, da smo zatehtali 1 g kalijevega haksacianoferata (II) in v 100 mL bučki z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. Raztopino železovega (III) klorida smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,5 g železovega (III) klorida in ga v 50 mL bučki z bidestilirano vodo dopolnili do oznake.

Fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo zatehtali 3,38 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 3,53 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  raztopili v bidestilirani vodi; z  $\text{NaOH}$  uravnali  $\text{pH}$  na 6,8; prelili v 1000 mL bučko z bidestilirano vodo dopolnili do oznake.

V epruvete smo odpipetirali 0,5 mL raztopine ekstrakta različnih koncentracij, dodali 2,5 mL fosfatnega pufru s  $\text{pH}$  6,8, 2,5 mL raztopine kalijevega haksacianoferata (II) in 2,5 mL raztopine trikloroacetne kisline ter dobro premešali. Dobljeno mešanico smo postavili v Eppendorf centrifugo 5451c za 10 min pri 14.000 r/min. Po centrifugiranju smo odvzeli 2,5 mL supernatanta in mu v novi epruveti dodali 2,5 mL bidestilirane vode in 1 mL raztopine železovega (III) klorida ter premešali na vortexu. Po 25 min, ko se je razvila ustrezna barva, smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 740 nm ( $A_{740}$ ) proti slepemu vzorcu, ki smo ga pripravili enako kot vzorce, le da smo namesto ekstrakta dodali metanol. Za vsak vzorec smo izvedli analizo v dveh paralelkah. Vsako meritev smo opravili v treh ponovitvah.

### 3.2.5 Analiza DPPH·

Analizo sposobnosti lovljenja prostih radikalov smo določili po metodi, ki jo je opisal Brand-Williams s sodelavci (1995).

Reagenti:

- DPPH· (c=0,1 mM, raztopljen v etanolu)
- etanol

Reagent DPPH· smo pripravili tako, da smo v 50 mL bučki odtehtali 1,97 mg DPPH· in ga s 96 % etanolom razredčili do oznake.

V kivete smo odpipetirali po 2,9 mL raztopine DPPH· in 0,1 mL predhodno z etanolom različno razredčenega ekstrakta, premešali in po 30 min v določenem časovnem intervalu (30 s) spremljali absorbanco pri 517 nm ( $A_{517}$ ) proti slepemu vzorcu. Izmerili smo tudi absorbanco kontrole, ki je vsebovala 2,9 mL raztopine DPPH· in 0,1 mL etanola. Slepni vzorec je vseboval samo etanol.

### 3.2.6 Beljenje $\beta$ -karotena

Antioksidativno učinkovitost v emulziji z  $\beta$ -karotenom smo določili v skladu z metodo, ki jo je zapisal Moure s sodelavci (2000).

Reagenti:

- $\beta$ -karoten
- kloroform
- linolna kislina
- polietilen glikol sorbitan monolaurat (Tween 20)
- bidestilirana voda

Najprej smo pripravili raztopino  $\beta$ -karotena v kloroformu. V bučki smo v 10 mL kloroforma raztopili 2 mg  $\beta$ -karotena ter premešali.

Za pripravo emulzije smo odpipetirali 2 mL kloroformne raztopine  $\beta$ -karotena, 40  $\mu$ L linolne kisline in 400  $\mu$ L emulgatorja Tween 20. Vse smo dobro premešali in z rotavaporjem odparili topilo pri 40 °C. Preostanku po sušenju smo počasi dodajali 100 mL bidestrilirane vode in stresali 5 min, tako da smo dobili rumeno-oranžno emulzijo.

V epruvete smo razporedili po 5 mL emulzije in dodali smo 0,2 mL raztopine ekstrakta.

Pripravili smo tudi kontrolni vzorec, ki je namesto raztopine ekstrakta vseboval 0,2 mL metanola. Poleg kontrolega vzorca smo pripravili tudi slepi vzorec, tako da smo pripravili emulzijo po opisanem postopku brez  $\beta$ -karotena.

Vzorci pripravljene emulzije smo postavili za 120 min v vodno kopel s temperaturo 50 °C, ter vsakih 20 min izmerili absorbanco pri valovni dolžini 470 nm ( $A_{470}$ ) proti slepemu vzorcu. Vsako določitev smo dvakrat ponovili.

Za primerjavo smo pripravili emulzijo s komercialnim antioksidantom BHT.

### **3.2.7 Določitev primarnih in sekundarnih produktov oksidacije**

#### **3.2.7.1 Priprava lipidnega sistema**

Lipidni sistem je predstavljal olje iz semen žafrana (*Carthamus tinctorius*), iz katerega so bili odstranjeni vsi antioksidanti. K 120 g olja smo dodali raztopine ekstraktov. Koncentracija fenolnih spojin v olju je znašala 100 ppm. Po dodatku ekstraktov smo vzorce stresali 10 min z rotacijskim stresalnikom pri 125 r/min, po stresanju pa metanol odparili s pomočjo prepihanja z dušikom. Celotno analizo smo opravili v paralelkah.

Za kontrolni vzorec smo uporabili le olje brez dodatka antioksidantov. Poleg tega smo pripravili tudi vzorec s standardnim komercialnim antioksidantom BHT.

Olje smo skladiščili 14 d pri temperaturi 50 °C in vsak dan odvzeli vzorce olja (5 mg) za analizo.



### 3.2.7.2 Spektrofotometrično določanje primarnih in sekundarnih produktov oksidacije

Vsebnost konjugiranih dienov in trienov smo določili spektrofotometrično v skladu z metodo (ISO 3656, 1989).

Reagenti:

- cikloheksan

Odtehtali smo 5 mg olja in ga raztopili v 5 mL cikloheksana ter ustrezno razredčili zaradi meritev absorbance. Ta naj bi se gibala med 0,2 in 0,8. Določitev konjugiranih dienov smo izvedli z meritvijo absorbance pri valovni dolžini 232 nm oz. 234 nm. Določitev konjugiranih trienov smo izvedli z meritvijo absorbance pri valovni dolžini 268 nm oz. 270 nm.

### 3.2.8 Statistična analiza

Analize smo opravili v treh paralelkah, zato so podane kot povprečje  $\pm$  standardni odklon, ki smo ga izračunali sledeče:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

...(11)

$\sigma$  – standardni odklon

$x_i$  –  $i$ -ta enota vzorca

$\bar{x}$  – aritmetična sredina vzorca

$N$  – število vseh enot

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Iz pogač oljaric bele gorjušice in lanu smo pridobili ekstrakte in jim določili skupne fenolne spojine s pomočjo metode Folin-Ciocalteu, ki je bila vpeljana že leta 1927, kasneje pa dopolnjena s strani Singletona in Rossija. Metoda je preprosta, občutljiva in natančna. Težava je predvsem veliko število substanc, kot so ogljikovi hidrati, aminokislina in drugi reducenti, ki so lahko prisotne v ekstraktih (Prior in sod., 2005) in ravno tako reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom .

Osnova je spektrofotometrično določanje z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 765 nm ( $A_{765}$ ), ki je posledica modrega obarvanja zaradi reakcije med fenolnimi snovmi in Folin-Ciocalteu reagentom. Preglednica 2 podaja izmerjene vrednosti in povprečno vrednost za  $A_{765}$ .

Preglednica 2: Vrednosti izmerjenih in povprečnih absorbanc ( $A_{765}$ ) bele gorjušice 1, bele gorjušice 2 in lanu

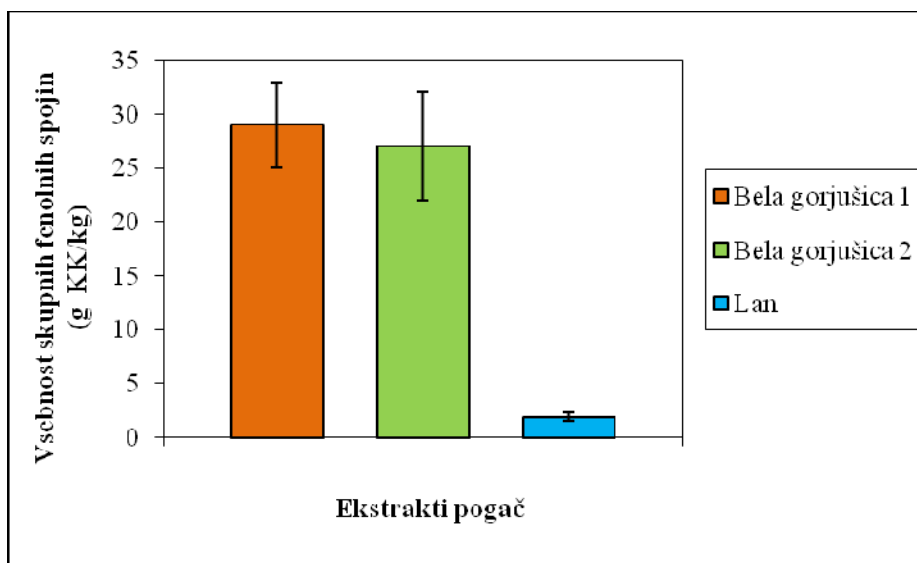
Ekstrakti pogač	Ekstrakcija	1. paralelka			2. paralelka			$A_{765}$
		$A_{765}$ 1	$A_{765}$ 2	$A_{765}$ 3	$A_{765}$ 1	$A_{765}$ 2	$A_{765}$ 3	
Bela gorjušica 1	1.	0,6201	0,619	0,6201	0,5079	0,5082	0,5079	0,56 ± 0,06
	2.	0,4270	0,4287	0,4298	0,4790	0,4779	0,4771	0,45 ± 0,03
	3.	0,4458	0,4461	0,4456	0,4640	0,4633	0,4639	0,45 ± 0,01
Bela gorjušica 2	1.	0,3988	0,4002	0,4457	0,4457	0,4457	0,4465	0,42 ± 0,02
	2.	0,3965	0,3975	0,3972	0,4350	0,4345	0,4347	0,42 ± 0,02
	3.	0,3787	0,3776	0,3779	0,4201	0,4199	0,4194	0,40 ± 0,02
Lan	1.	0,1262	0,1264	0,1268	0,1289	0,1280	0,1286	0,128 ± 0,001
	2.	0,1100	0,1094	0,1099	0,1293	0,1299	0,1361	0,12 ± 0,01
	3.	0,1293	0,1293	0,1292	0,1501	0,1501	0,1497	0,14 ± 0,01

Absorbanca je premo sorazmerna s koncentracijo fenolnih spojin. Zato smo masno koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktih določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo prikazuje slika 6 in jo označili kot koncentracijo izhodne raztopine ( $\gamma_{izh}$ ) in izrazili mg klorogenske kisline na ml ekstrakta. Vrednosti za omenjeno koncentracijo podaja preglednica 3. V preglednici 3 je zapisana tudi vsebnost fenolov v pogačah, ki smo jo izrazili kot maso klorogenske kisline na kilogram razmaščene pogače (g KK/kg).

Preglednica 3: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v razmaščenih oljnih pogačah bele gorjušice 1, bele gorjušice 2 in lanu ter koncentracija fenolnih spojin v metanolnih ekstraktih ( $\gamma_{izh}$ )

Ekstrakti pogač	Vsebnost skupnih fenolnih spojin (g KK/kg)	$\gamma_{izh}$ (mg/mL)
Bela gorjušica 1	$29 \pm 4$	$18 \pm 2$
Bela gorjušica 2	$27 \pm 5$	$18 \pm 4$
Lan	$1,9 \pm 0,4$	$0,97 \pm 0,06$

Na sliki 6 so grafično prikazane vsebnosti skupnih fenolnih spojin v posameznih razmaščenih pogačah.



Slika 6: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih razmaščenih oljnih pogač

Dejstvo je, da se v ekstraktih nahajajo spojine, ki jih določimo s Folin-Ciocalteu metodo. Navkljub našim pričakovanjem smo ugotovili, da se vsebnost fenolnih snovi med različnima sortama bele gorjušice bistveno ne razlikuje, saj ekstrakt pogače bele gorjušice 1 vsebuje  $29 \pm 4$  g KK/kg, ekstrakt pogače bele gorjušice 2 pa  $27 \pm 5$  g KK/kg. So se pa naše hipoteze glede vsebnosti skupnih fenolnih spojin med različnimi vrstami oljnic izkazale za pravilne. Bela gorjušica vsebuje precej več fenolov v primerjavi z lanom, ki jih po naših analizah vsebuje le  $1,9 \pm 0,4$  g KK/kg, kar je kar 15 krat manj od bele gorjušice.

Kozłowska in sodelavci so že leta 1983 določili vsebnost skupnih fenolnih kislin v semenih bele gorjušice in sicer je znašala 602,2 mg/kg moke, pridobljene iz semen oljnice. Največji delež so predstavljale sinapinska, ferulna, p-hidroksibenzojska, kumarna in kavna kislina.

Dabrowski in Sosulski sta leta 1984 določila skupno količino fenolnih kislin v semenih lanu s pomočjo kapilarne plinsko-tekočinske kromatografije, ki je znašala 81,1 mg/100 g moke, pridobljene iz semen lanu. Najpogosteje detektirane fenolne kisline v semenih lanu so bile ferulna, sinapinska, p-kumarna in kavna kislina. Tudi Oomah in sodelavci (1995) so določili skupno količino fenolnih kislin v različnih sortah lanu. Ta je znašala od 7,89 g/kg pa do 10,34 g/kg grobo mlete moke, pridobljene iz semen lanu. Študije so tudi pokazale, da so semena lanu bogat vir lignanov, saj naj bi vsebovala od 10 krat, pa tudi do 100 krat več te skupine fenolnih snovi, kot vse ostale jedilne rastline. Najpogostejši lignani v semenih lanu so pinoresinol, lariciresinol, matairesinol, isolariciresinol in njegov diglikozid secoisolariciresinol (SDG) (Johnsson, 2004).

Vrednosti za skupne fenolne spojine, ki smo jih pridobili v literaturi, so precej različne od naših rezultatov, velike razlike so tudi med posameznimi literaturnimi viri. Vse to je posledica več dejavnikov, ki so pripeljali do tako različnih končnih rezultatov, med katerimi so lahko različne sorte analiziranih oljnic, drugačno predhodno tretiranje oz. obdelava analiznega materiala, različni postopki ekstrakcij, različna ekstrakcijska topila, trajanje ekstrakcij, različne metode določanja skupnih fenolov, različen standard, s katerim izražamo maso fenolnih spojin (v naši raziskavi smo uporabili klorogensko kislino), itd.

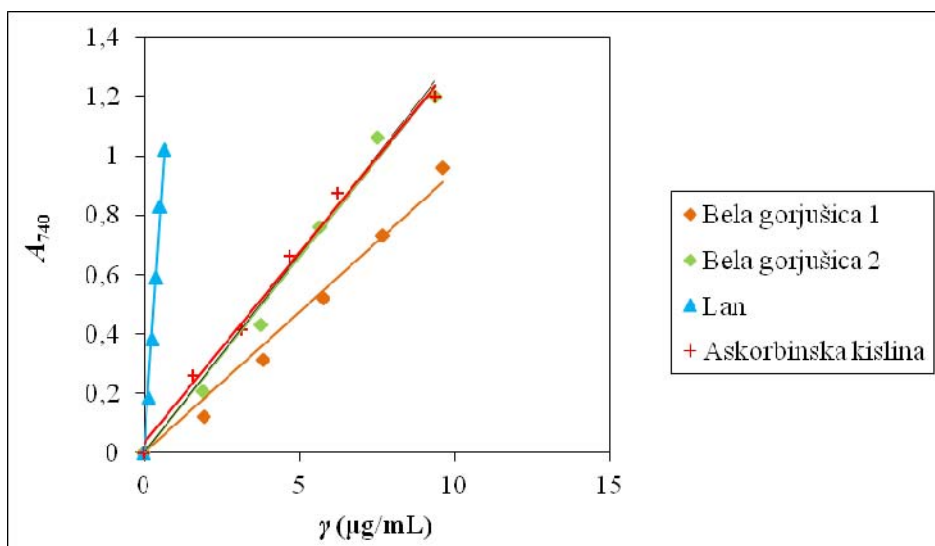
## 4.2 SPOSOBNOST REDUKCIJE

Sposobnost redukcije je eden od pomembnih pokazateljev potencialne antioksidativne učinkovitosti. Pri analizi se ob prisotnosti reducenta oz. antioksidanta  $\text{Fe}^{3+}$  reducira v  $\text{Fe}^{2+}$ , kar opazimo kot spremembo barve reakcijske mešanice iz rumene v modro-zeleno in določimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 740 nm. Za primerjavo z našimi ekstrakti smo določili tudi redukcijsko sposobnost askorbinske kisline, ki velja kot dober antioksidant. Večja vsebnost reducentov (t.j. snovi z antioksidativnim učinkom) v reakcijski zmesi je razlog za večjo količino nastalih  $\text{Fe}^{2+}$  ionov. V preglednici 4 so za preiskovane ekstrakte pogač prikazane vrednosti za absorbanco  $A_{740}$  v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin ( $\gamma$ ) v reakcijski zmesi.

Preglednica 4: Koncentracija fenolnih snovi ( $\gamma$ ) v ekstraktih, pripravljenih iz razmaščenih pogač bele gorjušice 1, bele gorjušice 2, lanu in askorbinske kisline v reakcijski zmesi, izmerjene in povprečne absorbance ( $A_{740}$ ) ter redukcijska moč ( $C_R$ )

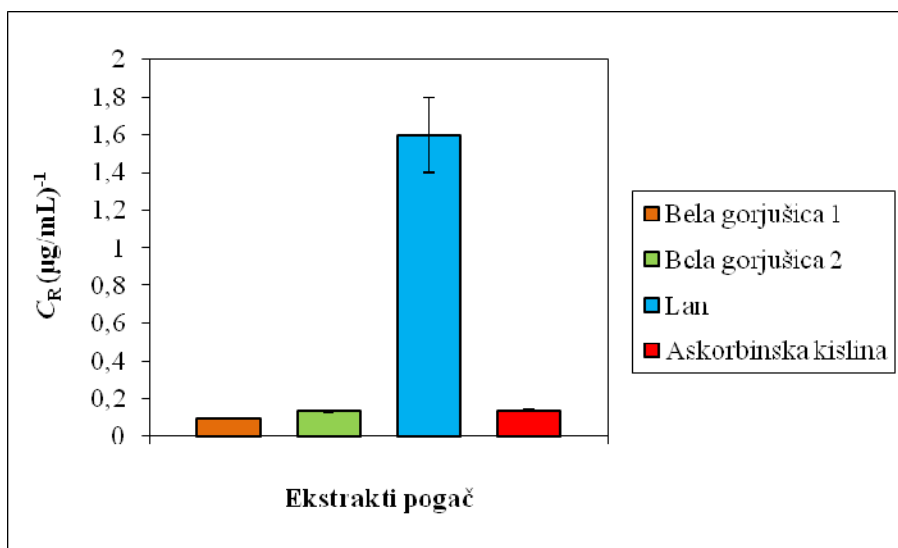
Ekstrakti oljnih pogač	$\gamma$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$A_{740}$ 1. paralelka	$A_{740}$ 2. paralelka	$A_{740}$	$C_R$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>-1</sup>
Bela gorjušica 1	1,922	0,1185	0,1214	0,120 ± 0,002	0,095 ± 0,003
	3,843	0,3126	0,311	0,312 ± 0,001	
	5,765	0,5109	0,5384	0,52 ± 0,02	
	7,686	0,7257	0,7476	0,73 ± 0,02	
	9,608	0,9916	0,9313	0,96 ± 0,04	
Bela gorjušica 2	1,879	0,2035	0,2062	0,205 ± 0,001	0,131 ± 0,004
	3,757	0,4285	0,4325	0,4305 ± 0,002	
	5,636	0,71	0,8025	0,76 ± 0,05	
	7,514	0,9644	1,1484	1,06 ± 0,09	
	9,393	1,3197	1,0275	1,2 ± 0,1	
Lan	0,127	0,1864	0,1927	0,190 ± 0,003	1,6 ± 0,2
	0,253	0,408	0,3594	0,38 ± 0,02	
	0,38	0,6223	0,5593	0,59 ± 0,03	
	0,506	0,8146	0,8397	0,83 ± 0,01	
	0,633	1,0384	0,9955	1,02 ± 0,02	
Askorbinska kislina	1,562	0,2584	0,2584	0,2584 ± 0	0,134 ± 0,003
	3,125	0,412	0,4121	0,4120 ± 0,0001	
	4,687	0,661	0,6599	0,6604 ± 0,0007	
	6,25	0,8721	0,8748	0,876 ± 0,002	
	9,374	1,2005	1,1987	1,200 ± 0,001	

Masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi je v prejem sorazmerju z izmerjeno absorbanco pri valovni dolžini 740 nm, kar je razvidno iz slike 8. Sposobnost redukcije smo kvantitativno ovrednotili tako, da smo s pomočjo linearne regresijske analize določili naklone premic, ki opisujejo odvisnost  $A_{740}$  od koncentracije fenolnih spojin. Večji naklon premice pomeni tudi večjo redukcijsko moč ( $C_R$ ). Vrednosti za redukcijsko moč za ekstrakte pogač so v primerjavi z askorbinsko kislino zapisane v preglednici 4.



Slika 7: Odvisnost absorbance od koncentracije fenolnih spojin metanolnih ekstraktov v reakcijski zmesi

Zaradi nazornejše ponazoritve je na sliki 8 podana primerjava sposobnosti redukcije med posameznimi ekstrakti iz razmaščenih pogač bele gorjušice 1, bele gorjušice 2, lanu in askorbinske kisline. Rezultati kažejo, da se spojine v ekstraktu lanu najboljše reducenti  $\text{Fe}^{3+}$  ionov. Spojine v ekstraktu bele gorjušice sorte 2 so pokazale redukcijsko moč, ki je dokaj primerljiva z redukcijsko močjo askorbinske kisline, najslabši reducenti pa so se izkazale spojine v ekstraktu bele gorjušice sorte 1.



Slika 8: Redukcijska moč ( $C_R$  ( $\mu\text{g/mL}$ )<sup>-1</sup>) ekstraktov bele gorjušice 1 in 2, lanu in askorbinske kisline

### 4.3 ANALIZA DPPH·

Za ugotavljanje sposobnosti antioksidantov za lovljenje radikalov se pogosto uporablja radikal DPPH·. Sposobnost antioksidanta, da reagira z DPPH· radikalom in s tem zniža vsebnost radikala, se lahko določi spektrofotometrično pri valovni dolžini 517, kjer je absorpcijski maksimum radikala. Zmanjšana absorbanca je posledica reakcije antioksidanta z radikalom DPPH·, kar lahko opazimo kot spremembo barve iz purpurne v rumeno. Z večjo antioksidativno učinkovitostjo analizirane snovi se v večji meri zmanjša delež radikala v reakcijski zmesi in nižja je zmerjena absorbanca. Zaradi preprostosti je metoda zelo razširjena (Prior in sod., 2005).

Ko antioksidant (AH) reagira z radikalom DPPH·, mu pri tem odda vodikov atom, pri čemer radikal DPPH· preide v stabilno spojino 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin (DPPH-H) (Matthäus, 2002):



Delež DPPH· radikala (%), ki po 30 minutah inkubacije preostane v reakcijski zmesi, smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\% \text{ DPPH}\cdot = \frac{A_{\text{vz } 517}}{A_{\text{k } 517}} \times 100 \% \quad \dots(13)$$

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

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

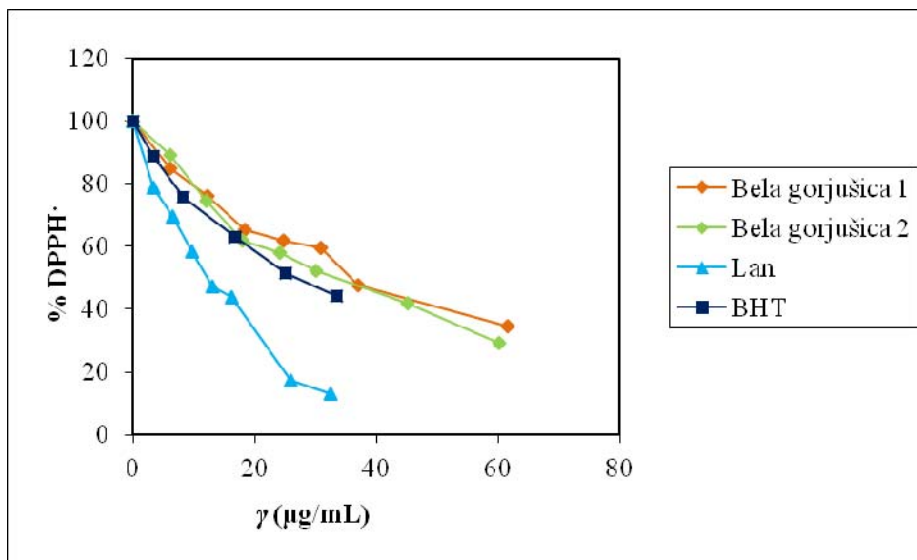
Zaradi dolgotrajnosti metode smo morali pred analizo vsakega ekstrakta vsakič znova pripraviti kontrolni vzorec in pomeriti vrednost za  $A_{\text{k } 517}$ . Tako so vrednosti  $A_{\text{k } 517}$  znašale 1,1395 za kontrolo bele gorjušice 1 in 1,1716 za kontrolo bele gorjušice 2. Pri lanu je vrednost  $A_{\text{k } 517}$  znašala 1,0986 in 1,1588 pri BHT.



Preglednica 5: Koncentracija fenolnih snovi ( $\gamma$ ) v ekstraktih, pripravljenih iz razmaščenih pogač bele gorjušice 1, bele gorjušice 2, lanu in BHT v reakcijski zmesi, izmerjene absorbance ( $A_{517}$ ) ter % preostalega DPPH· v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije

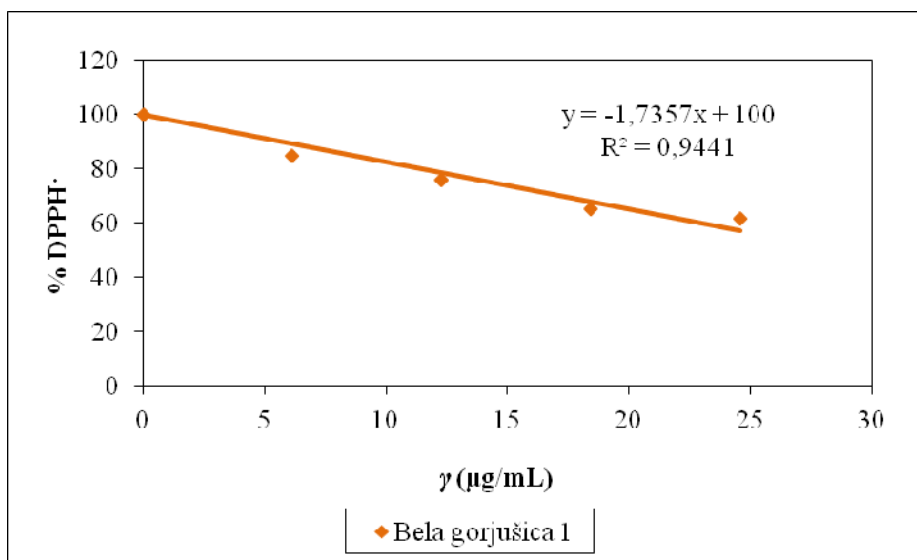
Ekstrakti pogač	$\gamma$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$A_{517}$ ( $t=30$ min)	% DPPH·
Bela gorjušica 1	6,149	0,9683	85,0
	13,298	0,8661	76,0
	18,447	0,7431	65,2
	24,595	0,7042	61,8
	30,744	0,6772	59,4
	36,893	0,5425	47,6
	61,489	0,3924	34,4
Bela gorjušica 2	6,011	1,0436	89,1
	12,023	0,8726	74,5
	18,034	0,7252	61,9
	24,046	0,6785	57,9
	30,057	0,6125	52,3
	45,086	0,4897	41,8
	60,114	0,3416	29,2
Lan	3,240	0,8663	78,9
	6,480	0,7630	69,5
	9,720	0,6438	58,6
	12,960	0,5181	47,2
	16,201	0,4814	43,8
	25,921	0,1913	17,4
	32,401	0,1327	13,0
BHT	3,333	1,0279	88,7
	8,333	0,8791	75,9
	16,666	0,7323	63,2
	25,000	0,5979	51,7
	33,333	0,5116	44,1

Na sliki 9 je za ekstrakte obeh sort bele gorjušice in lanu prikazan delež DPPH<sup>·</sup>, ki je ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od masne koncentracije fenolnih snovi v reakcijski zmesi. Z DPPH<sup>·</sup> radikalom so reagirali vsi preiskovani ekstrakti. Iz slike 9 je razvidno, da je delež preostalega radikala v obratnem sorazmerju z koncentracijo fenolnih snovi v reakcijski zmesi, kar pomeni, da se je delež DPPH<sup>·</sup> z naraščajočo koncentracijo fenolov zniževal.

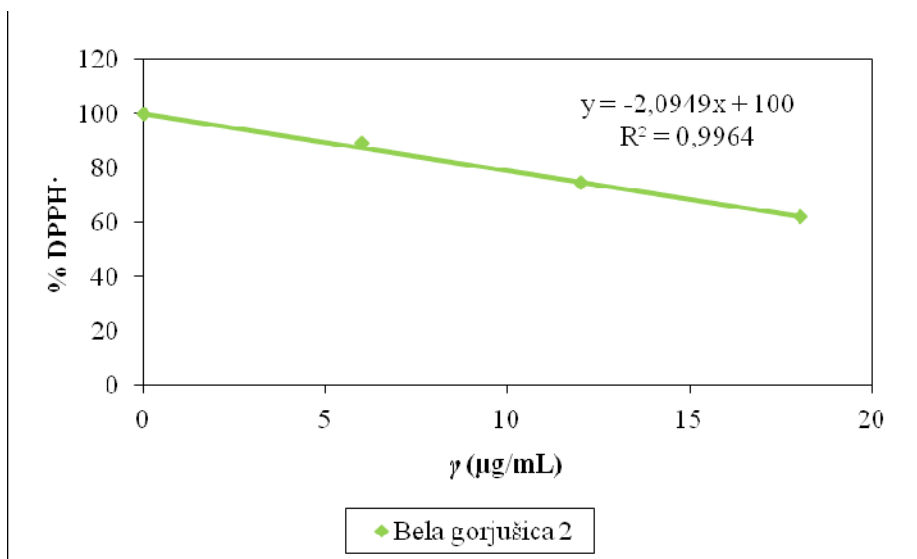


Slika 9: Delež DPPH<sup>·</sup>, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolov v reakcijski zmesi

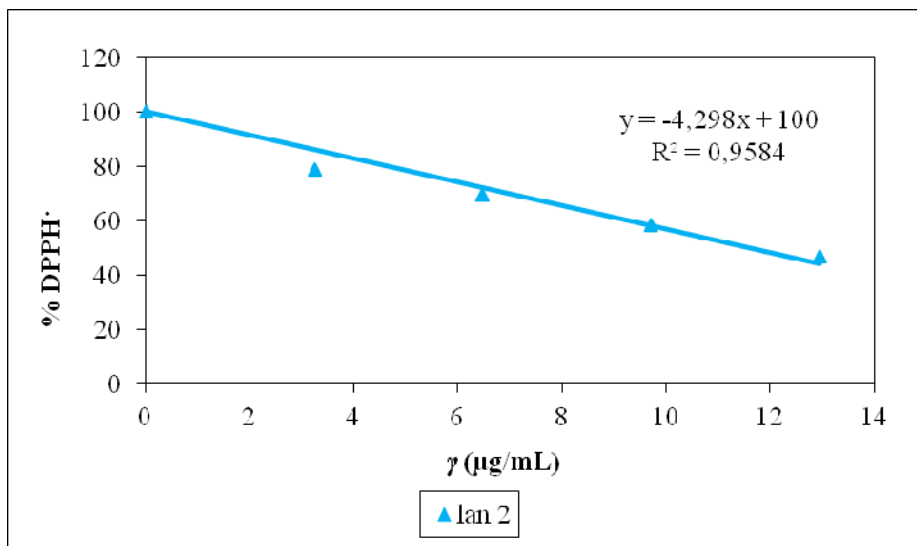
Odvisnost je v določenem koncentracijskem območju linearna, pri večjih koncentracijah pa zmanjšanje deleža DPPH<sup>·</sup> radikala v reakcijski zmesi ni več linearno. Na slikah 10, 11, 12 in 13 je zaradi nazornejše predstavitve prikazano padanje deleža DPPH<sup>·</sup> v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin le v območju, ko je odvisnost linearna.



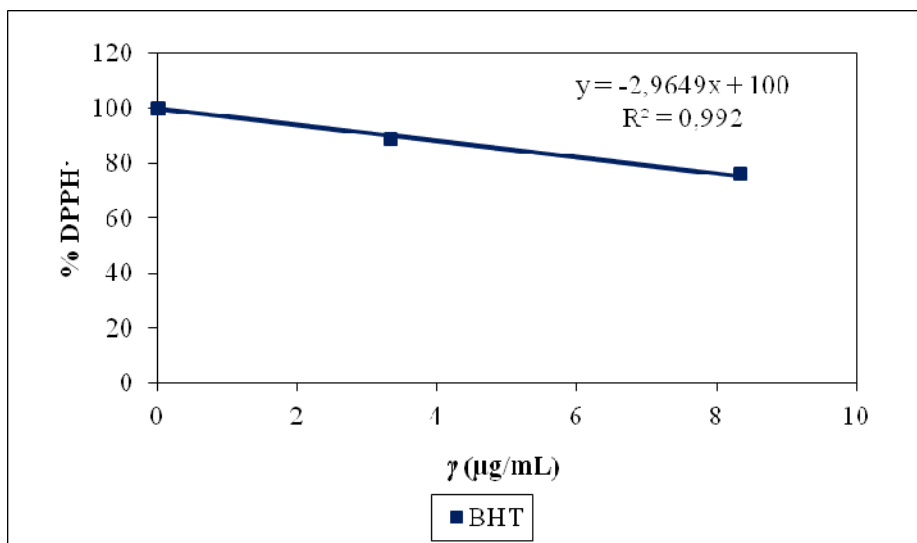
Slika 10: Delež DPPH, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin za pogačo bele gorjušice 1



Slika 11: Delež DPPH, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin za pogačo bele gorjušice 2



Slika 12: Delež DPPH·, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin za pogačo lanu



Slika 13: Delež DPPH·, ki je še ostal v reakcijski zmesi po 30 min inkubaciji v odvisnosti od koncentracije komercialnega antioksidanta BHT

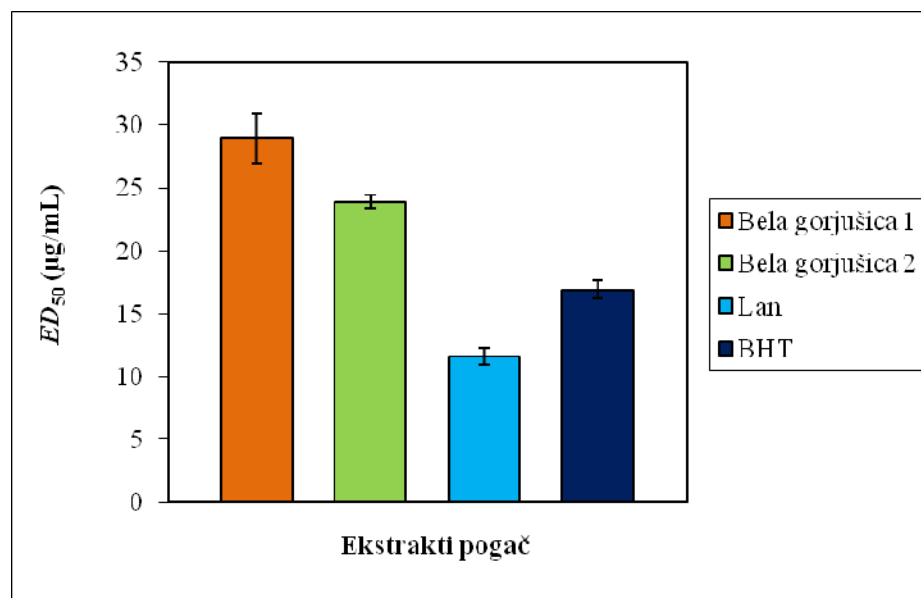
Sposobnost preiskovanih ekstraktov za lovljenje radikalov smo izrazili kot koncentracijo fenolnih spojin, ki povzroči zmanjšanje koncentracije DPPH· za 50 % ( $ED_{50}$ ). To koncentracijo smo izračunali iz naklonov premic, ki so prikazane na slikah 10, 11 in 12.

$$ED_{50} = -\frac{50}{k} \quad \dots(14)$$

V preglednici 6 so podane vrednosti naklonov, ki smo jih določili z linearno regresijsko analizo in vrednosti  $ED_{50}$ . Koncentracije, ki so potrebne za zmanjšanje 50 % začetne koncentracije DPPH·, so podane tudi grafično na sliki 13, kjer višja vrednost  $ED_{50}$  pomeni slabšo sposobnost lovljenja DPPH· radikalov.

Preglednica 6: Nakloni premice in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za redukcijo 50 % DPPH· radikalov

Ekstrakti oljnih pogač	Naklon premice	$ED_{50}$ (µg/mL)
Bela gorjušica 1	$-1,7 \pm 0,1$	$29 \pm 2$
Bela gorjušica 2	$-2,09 \pm 0,04$	$23,9 \pm 0,5$
Lan	$-4,3 \pm 0,2$	$11,6 \pm 0,7$
BHT	$-3,0 \pm 0,1$	$16,9 \pm 0,7$



Slika 14: Koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za zmanjšanje 50 % začetne vrednosti DPPH· ( $ED_{50}$ ) za pogače bele gorjušice 1 in 2, lanu ter BHT

Primerjava vrednosti  $ED_{50}$  za različne ekstrakte oljnic na sliki 13 pokaže, da sta najslabša pri lovljenju DPPH· radikalov ekstrakta obeh sort bele gorjušice. Med slednjima so se kot najslabši lovilci DPPH· radikalov izkazale fenolne spojine v ekstraktu sorte bela gorjušica 1 z  $ED_{50}$  vrednostjo 28,9  $\mu\text{g/mL}$ , ki ima po Folin-Ciocalteu metodi največjo vsebnost fenolnih spojin. Bela gorjušica 2 je izkazala vrednost  $ED_{50} = 23,9 \mu\text{g/mL}$ , kar je precej slabše od lanu. Fenolne spojine v ekstraktu lanu so se med preiskovanimi pogačami z  $ED_{50}$  vrednostjo 13,2  $\mu\text{g/mL}$  izkazale kot najuspešnejši lovilci radikalov DPPH·. Komerčni antioksidant BHT, ki smo ga analizirali zaradi primerjave z ekstrakti oljnih pogač, se je z  $ED_{50}$  vrednostjo 16,9  $\mu\text{g/mL}$  izkazal slabše od ekstrakta lanu. Rezultati kažejo, da ekstrakt, za katerega smo ugotovili, da vsebuje največ spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, ni hkrati tudi najuspešnejši pri lovljenju prostih radikalov DPPH·.

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

Ker so živila heterogen sistem, je smiselno določiti antioksidativno učinkovitost preiskovanih ekstraktov tudi v emulziji. Pri tej metodi pripravimo sistem, ki ga sestavljajo  $\beta$ -karoten in linolna kislina, ki v prisotnosti emulgatorja emulgira v vodi. Sistem pri povišani temperaturi (50 °C) inkubiramo in spremljamo hitrost razgradnje  $\beta$ -karotena. Prosti radikal linolne kisline ( $\text{ROO}\cdot$ ), ki nastane kot posledica oksidacije, reagira z molekulo  $\beta$ -karotena in spremeni njeno strukturo, kar se odraža na izgubi značilne oranžne barve  $\beta$ -karotena. Prisotni antioksidanti tekmujejo z  $\beta$ -karotenom v reakciji s peroksilnimi radikali (Prior in sod., 2005). Zato je obseg razbarvanja  $\beta$ -karotena manjši (Terpinč in Abramovič, 2010):



Razpad  $\beta$ -karotena, ki je tarčna molekula za  $\text{ROO}\cdot$  radikale, smo merili v kontrolnem vzorcu, kjer ni bilo antioksidantov, in ga primerjali z intenziteto razpada v sistemu, ki vsebuje preiskovane ekstrakte. Koncentracija fenolnih snovi v emulzijah, ki so vsebovale ekstrakte je znašala 0,05 mg/mL.

V preglednici 7 so podane vrednosti  $A_{470}$  paralelk za emulzijo, ki ni vsebovala antioksidantov (kontrolni vzorec) ter emulzije z ekstrakti obeh sort bele gorjušice in lanu. Za primerjavo smo analizirali tudi antioksidativno učinkovitost komercialnega antioksidanta BHT in ustrezne vrednosti za absorbanco podali v preglednici 7.

Preglednica 7: Vrednosti absorbanc za emulzijo ( $A_{470}$ ) z ekstrakti bele gorjušice 1, bele gorjušice 2, lanu, BHT in kontrolnega vzorca izmerjene pri različnih časih ( $t$ )

Ekstrakti oljnih pogač	$t$ (min)	$A_{470}$ 1.paralelka	$A_{470}$ 2.paralelka	$A_{470}$
Bela gorjušica 1	0	0,6698	0,6691	$0,6695 \pm 0,0004$
	20	0,6231	0,6265	$0,625 \pm 0,002$
	40	0,5936	0,5946	$0,5941 \pm 0,0005$
	60	0,5586	0,5595	$0,5590 \pm 0,0005$
	80	0,5209	0,5229	$0,522 \pm 0,001$
	100	0,4896	0,4906	$0,4901 \pm 0,0005$
	120	0,4509	0,4511	$0,45096 \pm 0,00009$
Bela gorjušica 2	0	0,6712	0,6705	$0,6709 \pm 0,0003$
	20	0,6254	0,6259	$0,6257 \pm 0,0003$
	40	0,6091	0,6096	$0,6094 \pm 0,0003$
	60	0,5841	0,5849	$0,5845 \pm 0,0004$
	80	0,5587	0,5562	$0,5575 \pm 0,001$
	100	0,5377	0,5389	$0,5383 \pm 0,0006$
	120	0,5084	0,5079	$0,5082 \pm 0,0003$
Lan	0	0,6682	0,6675	$0,6678 \pm 0,0003$
	20	0,5672	0,5689	$0,5680 \pm 0,0009$
	40	0,5177	0,5182	$0,5180 \pm 0,0003$
	60	0,447	0,4479	$0,4475 \pm 0,0004$
	80	0,3807	0,3802	$0,3805 \pm 0,0003$
	100	0,3259	0,3258	$0,32587 \pm 0,00007$
	120	0,2671	0,2682	$0,2676 \pm 0,0006$
BHT	0	0,6648	0,6640	$0,6644 \pm 0,0004$
	20	0,6589	0,6600	$0,6595 \pm 0,0005$
	40	0,6592	0,6576	$0,6584 \pm 0,0008$
	60	0,6509	0,6531	$0,6520 \pm 0,0008$
	80	0,6488	0,6514	$0,650 \pm 0,001$
	100	0,6485	0,6478	$0,6481 \pm 0,0004$
	120	0,6444	0,6426	$0,6435 \pm 0,0009$
Kontrolni vzorec	0	0,6799	0,6792	$0,6796 \pm 0,0004$
	20	0,3853	0,3877	$0,387 \pm 0,001$
	40	0,2028	0,2030	$0,20288 \pm 0,00007$
	60	0,1036	0,1045	$0,1041 \pm 0,0005$
	80	0,0577	0,0598	$0,059 \pm 0,001$
	100	0,0439	0,0469	$0,045 \pm 0,002$
	120	0,0386	0,0394	$0,0390 \pm 0,0004$

Antioksidativni učinek preiskovanih ekstraktov smo izrazili kot koeficient antioksidativne učinkovitosti ( $C_{AO}$ ), ki smo ga izračunali z naslednjo relacijo:

$$C_{AO} = \left[ 1 - \frac{A_{VZ\ 470}^0 - A_{VZ\ 470}^t}{A_{K\ 470}^0 - A_{K\ 470}^t} \right] \times 100$$

...(16)

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

$A_{VZ\ 470}^0$  – absorbanca vzorca v času  $t = 0$  min

$A_{VZ\ 470}^t$  – absorbanca vzorca po določenem času

$A_{K\ 470}^0$  – absorbanca kontrole v času  $t = 0$  min

$A_{K\ 470}^t$  – absorbanca kontrole po določenem času

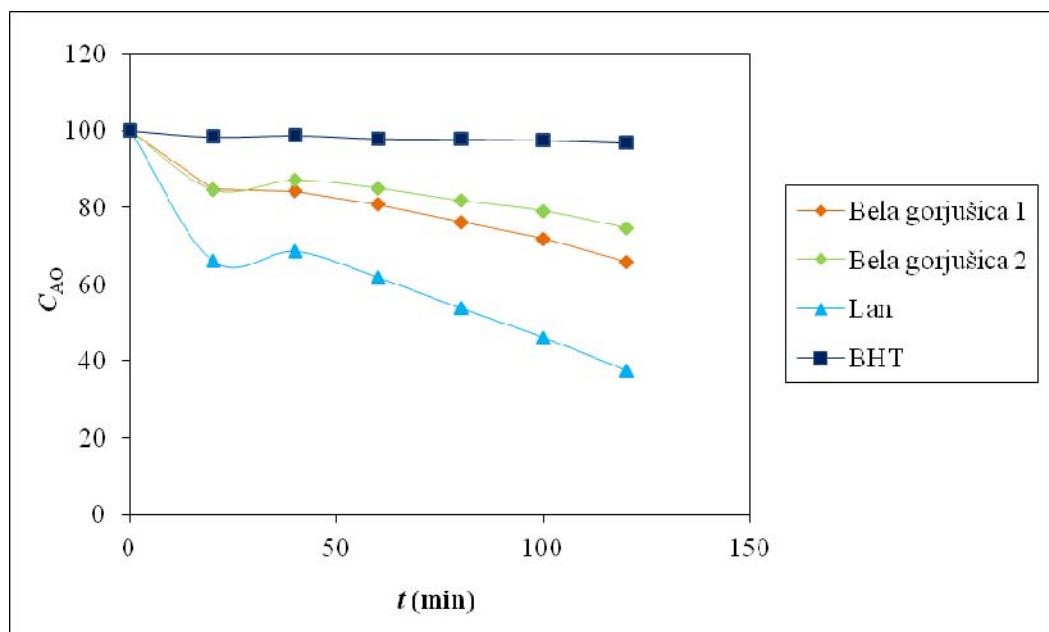
Vrednosti koeficienta antioksidativne učinkovitosti ( $C_{AO}$ ) preiskovanih ekstraktov in BHT po 120 min inkubacije pri temperaturi 50 °C so zbrane v preglednici 8.

Preglednica 8: Koeficienti antioksidativne učinkovitosti v emulziji ( $C_{AO}$ ) ekstraktov oljnic in BHT po 120 min inkubiranja pri 50 °C

Ekstrakti oljnih pogač	$C_{AO}$ (%)
Bela gorjušica 1	65,9 ± 0,6
Bela gorjušica 2	74,6 ± 0,4
Lan	37,5 ± 0,3
BHT	96,7 ± 0,7

Na sliki 15 smo prikazali časovno odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti. Kot je razvidno iz slike, je sintetični antioksidant BHT v emulziji pokazal najboljšo antioksidativno učinkovitost v primerjavi z ekstrakti oljnic in jo je ohranil v celotnem obdobju inkubacije, to je 120 min. Vrednosti  $C_{AO}$  za ekstrakte preiskovanih pogač so se s časom inkubacije znižale. Najbolj opazno je znižanje  $C_{AO}$  vrednosti za ekstrakt pogače lanu.





Slika 15: Odvisnost koeficientov antioksidativne učinkovitosti v reakcijski emulziji ( $C_{AO}$ ) od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C za ekstrakte oljnic in BHT

Med sortama bele gorjušice se je bolje odrezala bela gorjušica 2, ki je po 120 min inkubacije izkazala vrednost  $C_{AO} = 74,6 \%$ , nekoliko slabše se je odrezala bela gorjušica 1 z  $C_{AO}$  vrednostjo 65,9 % po 120 min inkubacije. Kot najslabši antioksidant pa so se je pokazale spojine v ekstraktu lanu, ki je bil celo 50 % slabši od ekstrakta bele gorjušice 1. Dobljeni rezultati se ne skladajo z rezultati o sposobnosti redukcije in lovljenja DPPH· radikala. Vseeno lahko razberemo glede na dobljene rezultate, da so se ekstrakti (obe sorti bele gorjušice), ki smo jim določili najvišjo koncentracijo spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, odrezali kot najboljši antioksidanti v emulziji, tisti z najmanjšo (lan) pa kot najslabši. Kot standard in primerjavo smo uporabili sintetični antioksidant BHT, ki je pričakovano izkazal po 120 min inkubacije najvišjo antioksidativno učinkovitost med vsemi vzorci (96,7 %).

Porazdelitev antioksidantov med lipidno in vodno fazo v emulziji je odvisna tudi od njihove polarnosti in to vpliva tudi na njihovo antioksidativno učinkovitost. Različno polarne snovi se namreč glede na njihovo topnost v posamezni fazi v različni meri porazdelijo med dvema fazama (Abram in sod., 2010). Manj polarni antioksidanti, kot v našem primeru BHT, v večjem obsegu prehajajo v lipidno fazo in vstopajo v reakcije z ROO· radikali ter tako preprečujejo oksidacijo maščob. Polarne spojine pa ostajajo v vodni

fazi in so manj učinkovite pri preprečevanju procesa oksidacije v emulgirani lipidni kapljici.

#### 4.5 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH PRODUKTOV OKSIDACIJE

Oksidacija je glavni vzrok za kvar olja. Pri oksidaciji večkrat nenasičenih maščobnih kislin nastajajo primarni produkti oksidacije (hidroperoksidi). Pri tem pride v verigi do premestitve dvojne vezi in nastanka konjugiranih dienov. Ko se oksidacija nadaljuje, se primarni produkti pretvorijo v sekundarne produkte - konjugirane triene. Konjugirane diene smo določili z merjenjem absorbance pri valovni dolžini  $\lambda = 232$  nm in konjugirane triene pri  $\lambda = 268$  nm. Nastanek konjugiranih dienov oz. konjugiranih trienov smo izrazili z naslednjo relacijo (ISO 3656, 1989):

$$E_{1\text{cm}(\lambda)}^{1\%} = \frac{A_{\lambda}}{c \cdot d} \quad \dots(17)$$

*(Note: The image contains a watermark '40' and a redacted area over the equation.)*

$E_{1\text{cm}(\lambda)}^{1\%}$  predstavlja absorbanco pri karakteristični valovni dolžini 1% raztopine olja v cikloheksanu (koncentracija olja = 1g olja/100 mL raztopine).

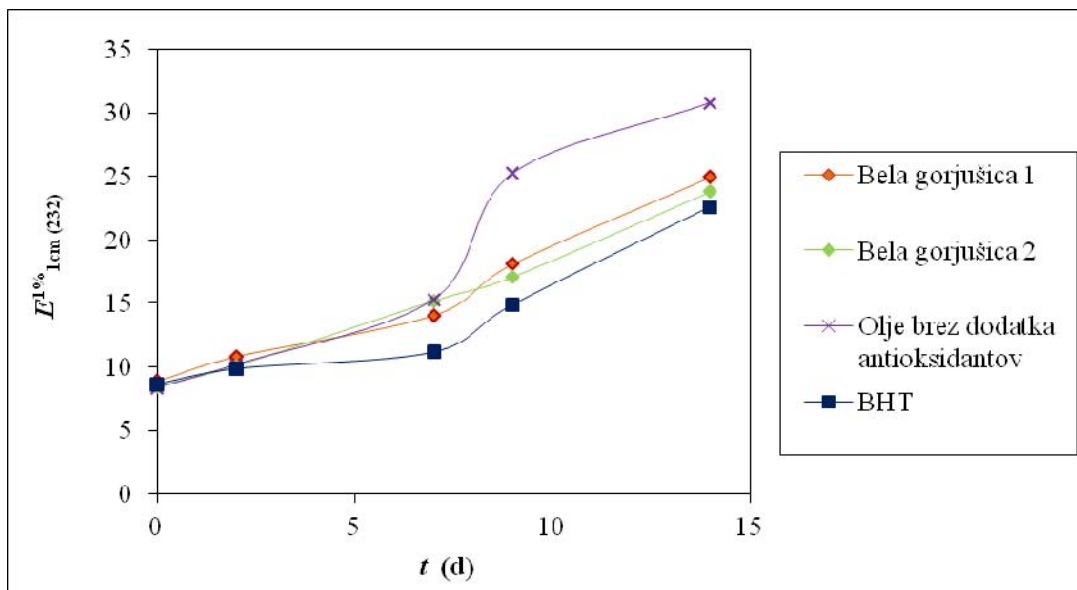
Oksidacijo smo spremljali v olju z dodatkom ekstraktov bele gorjušice 1, bele gorjušice 2, BHT in v olju brez dodanega antioksidanta. Ekstrakta lanu nismo uporabili, saj je bila njegova vrednost fenolnih snovi premajhna, da bi v olju pokazal antioksidativni učinek.

#### 4.6.1 Določanje konjugiranih dienov

V preglednici 9 so podane vrednosti absorbanc, ki smo jo določili v svežih vzorcih olja ter v vzorcih olja, ki smo ga inkubirali 2, 7, 9 in 14 d. Preglednica 9 podaja tudi ustrezne  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  vrednosti.

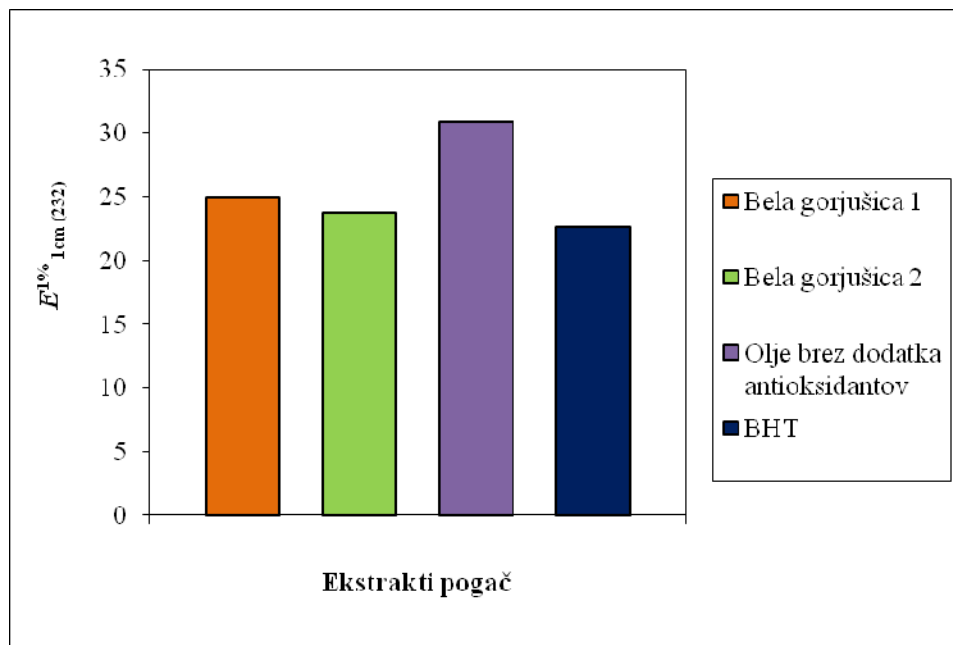
Preglednica 9: Izmerjene in povprečne vrednosti absorbanc  $A_{232}$  ter ustrezne vrednosti  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter v olju brez dodatka antioksidantov v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C

Ekstrakti oljnih pogač	$t$ (d)	$A_{232}$ 1. paralelka	$A_{232}$ 2. paralelka	$A_{232}$	$E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$
Bela gorjušica 1	0	0,5346	0,6103	$0,57 \pm 0,04$	8,87
	2	0,3700	0,4438	$0,41 \pm 0,04$	10,82
	7	0,3289	0,4987	$0,41 \pm 0,08$	14,07
	9	0,5297	0,3639	$0,45 \pm 0,08$	18,12
	14	0,5323	0,6289	$0,58 \pm 0,05$	24,95
Bela gorjušica 2	0	0,5557	0,5874	$0,57 \pm 0,02$	8,44
	2	0,4317	0,4354	$0,434 \pm 0,002$	10,06
	7	0,3933	0,4738	$0,43 \pm 0,02$	15,18
	9	0,4377	0,3703	$0,40 \pm 0,03$	17,08
	14	0,6052	0,6564	$0,63 \pm 0,03$	23,79
Olje brez dodatka antioksidantov	0	0,5699	0,5206	$0,55 \pm 0,03$	8,34
	2	0,4250	0,4144	$0,420 \pm 0,005$	10,17
	7	0,4265	0,3656	$0,40 \pm 0,03$	15,31
	9	0,6899	0,5087	$0,60 \pm 0,09$	25,25
	14	0,6774	0,7639	$0,72 \pm 0,04$	30,81
BHT	0	0,5325	0,5453	$0,539 \pm 0,006$	8,66
	2	0,4583	0,3838	$0,42 \pm 0,04$	9,86
	7	0,2934	0,2526	$0,27 \pm 0,02$	11,17
	9	0,4707	0,3524	$0,41 \pm 0,06$	14,92
	14	0,5379	0,6727	$0,61 \pm 0,07$	22,63



Slika 16: Odvisnost  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter olja brez dodatka antioksidantov v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C

Na sliki 16, kjer je prikazana odvisnost  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  od časa inkubacije, vidimo da vrednosti  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  naraščajo s časom inkubacije, kar pomeni, da se je s časom zvečala koncentracija dienov kot primarnih produktov oksidacije. Zaradi povišane temperature (50 °C) inkubacije v določenem času (14 d) je oksidacija napredovala v večji meri, kot v olju, ki bi ga inkubirali pri sobni temperaturi. Višja vrednost  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  pomeni nižjo antioksidativno učinkovitost preiskovanega antioksidanta. Če primerjamo krivulje, ki so prikazane na sliki 16 vidimo, da je oksidacija v najmanjši meri napredovala v olju, ki mu je bil dodan BHT. Predvsem v prvih 7 d inkubacije so vrednosti  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  v omenjenem olju le nekoliko narasle. Po sedmem dnevu skladiščenja se je  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  vrednost izraziteje povečala. V vzorcih olja, ki so vsebovali preiskovane ekstrakte, se je vrednost  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  le nekoliko bolj zvečala kot v primeru olja z dodanim BHT. Zanimivo pa je, da v oljih z dodanimi ekstrakti po sedmem dnevu inkubacije ni opazna sprememba v hitrosti naraščanja  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$ . V olju, ki ni vsebovalo dodanih antioksidantov, je v prvih sedmih dneh vrednost  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  naraščala z enako hitrostjo, kot v oljih, ki so vsebovala ekstrakte. Za tem pa je  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  skokovito narasla in dosegla znatno višjo vrednost kot v vzorcih olja z dodanimi antioksidanti.



Slika 17:  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter olja brez dodatka antioksidantov po 14-dnevni inkubaciji pri temperaturi 50 °C

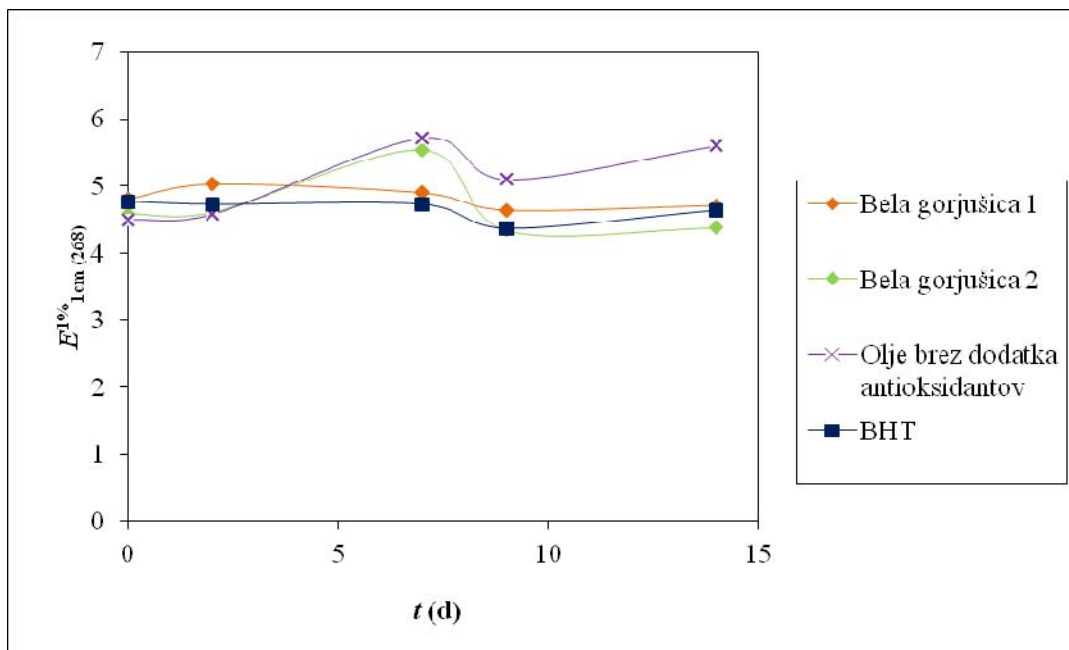
Iz primerjave vrednosti  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  v vzorcih olja z dodanimi antioksidanti po 14 d inkubaciji, ki jo podaja slika 17, je moč razbrati, da so vrednosti  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)}$  v olju med seboj dokaj podobne. Najbolje se je po pričakovanjih izkazal komercialni BHT z vrednostjo  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)} = 22,63$ , med analiziranimi ekstrakti oljnic sta ekstrakta bele gorjušice 2 z  $E^{1\%}_{1\text{cm}(232)} = 23,79$  in bele gorjušice 1 z vrednostjo 24,95 dosegla le nekoliko višji vrednosti. Kar pomeni, da je oksidacija v olju z dodatkom ekstraktov napredovala le nekoliko hitreje kot v olju z BHT. To pomeni, da je antioksidativna učinkovitost preiskovanih ekstraktov dokaj primerljiva z BHT. Najslabšo oksidativno stabilnost pa je po pričakovanjih prikazal vzorec olja brez antioksidantov. Glede na dobljene rezultate je razvidno, da so bile razlike med antioksidanti (ekstrakt bele gorjušice in BHT) manjše, kot pa se je izkazalo pri metodi beljenja  $\beta$ -karotena.

## 4.6.2 Določanje konjugiranih trienov

V preglednici 10 smo zapisali vrednosti za absorbanco, ki smo jo določili v svežih vzorcih ter v vzorcih olja, ki smo ga inkubirali 2, 7, 9 in 14 d. Preglednica 10 podaja tudi ustrezne  $E^{1\%}_{1\text{cm}(268)}$  vrednosti.

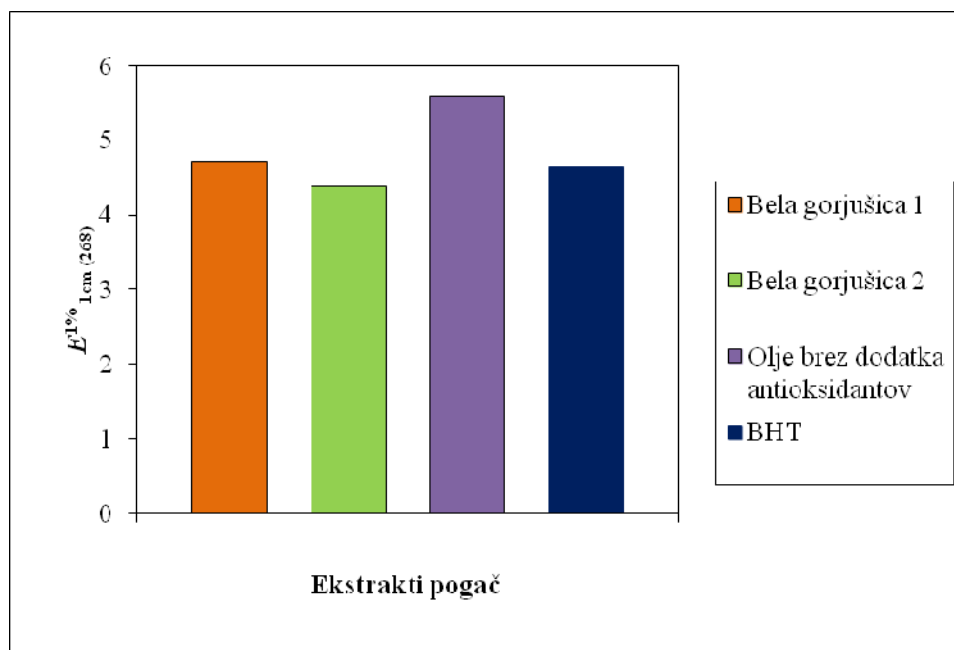
Preglednica 10: Izmerjene in povprečne vrednosti absorbancc  $A_{268}$  in ustrezne vrednosti  $E^{1\%}_{1\text{cm}(268)}$  v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter v olju brez dodatka antioksidantov v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C

Ekstrakti oljnih pogač	$t$ (d)	$A_{268}$ 1. paralelka	$A_{268}$ 2. paralelka	$A_{268}$	$E^{1\%}_{1\text{cm}(268)}$
Bela gorjušica 1	0	0,2898	0,3318	$0,31 \pm 0,02$	4,81
	2	0,1685	0,2098	$0,19 \pm 0,02$	5,03
	7	0,1159	0,1721	$0,14 \pm 0,03$	4,90
	9	0,1365	0,0927	$0,12 \pm 0,02$	4,64
	14	0,1127	0,1044	$0,109 \pm 0,004$	4,71
Bela gorjušica 2	0	0,3179	0,3078	$0,313 \pm 0,05$	4,59
	2	0,1983	0,1987	$0,1985 \pm 0,0002$	4,61
	7	0,1473	0,1679	$0,16 \pm 0,01$	5,53
	9	0,1102	0,0955	$0,103 \pm 0,007$	4,34
	14	0,1127	0,1193	$0,116 \pm 0,003$	4,38
Olje brez dodatka antioksidantov	0	0,3078	0,2809	$0,29 \pm 0,01$	4,50
	2	0,1917	0,1868	$0,189 \pm 0,003$	4,58
	7	0,1564	0,1392	$0,148 \pm 0,009$	5,72
	9	0,1142	0,1276	$0,121 \pm 0,007$	5,10
	14	0,1265	0,1350	$0,131 \pm 0,004$	5,60
BHT	0	0,2955	0,2981	$0,297 \pm 0,001$	4,77
	2	0,2195	0,1842	$0,2 \pm 0,02$	4,73
	7	0,1230	0,1082	$0,116 \pm 0,007$	4,73
	9	0,1371	0,1040	$0,12 \pm 0,02$	4,37
	14	0,1149	0,1320	$0,124 \pm 0,009$	4,64



Slika 18:  $E^{1\%}_{1\text{cm}(268)}$  v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter olja brez dodatka antioksidantov v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C

Iz slike 18 lahko vidimo, da vrednosti  $E^{1\%}_{1\text{cm}(268)}$  v preiskovanem obdobju inkubacije v vzorcih olja, ki vsebujejo dodane antioksidante, praktično ne narastejo. Nekoliko naraste vrednost  $E^{1\%}_{1\text{cm}(268)}$  v olju brez dodatka antioksidantov. Sklepamo lahko, da so se v tem olju zaradi povišane temperature (50 °C) v določenem času (14 d) tvorili konjugirani trieni kot sekundarni produkti oksidacije. Vsekakor pa so konjugirani trieni v primerjavi z dieni nastajali bistveno bolj počasi.



Slika 19:  $E_{1\text{cm}(268)}^{1\%}$  v olju z dodatkom ekstraktov oljnic in BHT ter olja brez dodatka antioksidantov po 14 dnevni inkubaciji pri temperaturi 50°C

Pri analizi konjugiranih trienov smo ponovno podali grafično primerjavo med  $E_{1\text{cm}(268)}^{1\%}$  vrednostmi po 14 d inkubacije za olja z ekstrakti in olje z BHT, ki je prikazana na sliki 19. Vidimo, da so preiskovani antioksidanti pokazali dokaj primerljivo sposobnost v zaviranju nastanka sekundarnih produktov oksidacije. Uporaba BHT kot primerjave je bila upravičena, saj je komercialno znan kot dober antioksidant. Olje brez dodatka antioksidantov je po pričakovanjih vsebovalo največ konjugiranih trienov.

Naši ekstrakti so pri metodi določanja konjugiranih dienov in trienov po pričakovanjih pokazali antioksidativen učinek, saj je v primerjavi z oljem brez dodatka antioksidantov nastalo manj produktov oksidacije, kar nakazujejo nižje vrednosti  $E_{1\text{cm}(232)}^{1\%}$  in  $E_{1\text{cm}(268)}^{1\%}$ . Glede na rezultate te analize lahko ugotovimo, da so naši ekstrakti dobri antioksidanti, saj so po antioksidativnem učinku primerljivi s komercialnim antioksidantom BHT.



## 5 SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo v razmaščenih pogačah bele gorjušice 1, bele gorjušice 2 in lanu določali vsebnost fenolnih spojin ter jih primerjali med seboj. Z različnimi metodami smo nato v različnih sistemih določali tudi njihovo antioksidativno učinkovitost.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo naslednje:

- Pogače obeh sort bele gorjušice in lanu vsebujejo fenolne spojine.
- Pogača bele gorjušice 1 (sorta Achilles) vsebuje več skupnih spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, kot pogača bele gorjušice 2 (seme proizvajalca Dejana Rengeo).
- Sorti bele gorjušice vsebujeta več skupnih spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, od pogače lanu
- Za ekstrakte oljnic smo z različnimi metodami dokazali, da so antioksidativno učinkoviti – ekstrakti so pokazali sposobnost reduciranja kovinskih ionov, lovljenja radikalov, zaviranja oksidacije linolne kisline v vodni emulziji in zaviranja oksidacije v olju.
- Ekstrakti učinkujejo antioksidativno in v različnih sistemih – v homogenem sistemu polarnega topila, v heterogenem sistemu emulzije in homogenem lipidnem sistemu.
- Vsi ekstrakti so v svoji antioksidativni učinkovitosti primerljivi s komercialnima antioksidantoma askorbinsko kislino in BHT.

## 6 POVZETEK

V diplomskem delu smo iz razmaščenih ostankov po stiskanju (pogač) dveh sort bele gorjušice in lanu ekstrahirali fenolne spojine. Za ekstrakcijo smo uporabili topilo (zmes metanol/voda – 70:30 v/v). V ekstraktih smo določili koncentracijo skupnih spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom. Zanimala nas je primerjava v vsebnosti teh spojin med različnima sortama bele gorjušice in primerjava med različnimi vrstami oljnic. Nato smo z različnimi metodami določili antioksidativno učinkovitost vseh ekstraktov.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili z Folin-Ciocalteu metodo in jo izrazili kot maso klorogenske kisline na kilogram razmaščene pogače ( g KK/kg). Analiza je pokazala, da med različnima sortama bele gorjušice ni bistvene razlike v koncentraciji spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, saj vsebuje bela gorjušica 1 ( $29 \pm 4$ ) g KK/kg, bela gorjušica 2 pa ( $27 \pm 5$ ) g KK/kg, medtem ko je vsebnost spojin v pogači lanu najmanjša in znaša ( $0,97 \pm 0,06$ ) g KK/kg.

Antioksidativno učinkovitost smo dokazali z različnimi metodami (sposobnost reduciranja kovinskih ionov, sposobnost lovljenja DPPH· radikala, antioksidativna učinkovitost v vodni emulziji linolne kisline in določitev primarnih in sekundarnih produktov oksidacije) v treh različnih sistemih (homogeni sistem polarnega topila, heterogeni sistem emulzije in homogeni lipidni sistem). Izkazalo se je, da vsi ekstrakti učinkujejo antioksidativno v vseh sistemih in so v vseh testih primerljivi s komercialnima antioksidantoma, askorbinsko kislino in BHT. Ekstrakt lanu je bil dosti boljši reducent od askorbinske kisline pri analizi sposobnosti redukcije, medtem ko sta se ekstrakta obeh sort bele gorjušice v primerjavi z askorbinsko izkazala le nekoliko slabše. Tudi pri analizi sposobnosti lovljenja DPPH· radikala je najboljši lovilec le-tega ekstrakt lanu, celo boljši od komercialnega antioksidanta BHT, katerega smo analizirali zaradi primerjave z našimi ekstrakti oljnic. Obe beli gorjušici sta pokazali nekoliko slabšo sposobnost lovljenja DPPH· radikala. V emulziji je bila antioksidativna učinkovitost naših ekstraktov slabša od BHT, medtem ko je bila pri določanju konjugiranih trienov bela gorjušica 2 celo nekoliko boljša od BHT.

Rezultati so pokazali, da ekstrakt, ki vsebuje največ spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, nima hkrati tudi najboljše antioksidativne učinkovitosti. Poleg tega ugotavljamo, da je ekstrakt, ki se je pri določeni metodi pokazal kot najbolj učinkovit, pri drugi metodi izrazil najslabšo učinkovitost. Tako se je ekstrakt iz pogače lanu izkazal kot

najboljši reducent in lovilec DPPH· radikala, vendar je v emulziji najmanj uspešno zaviral oksidacijo linolne kisline.

## 7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož 26. – 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. Farmaceutski vestnik, 48: 573 – 589
- Abram V., Abramovič H., Skrt M., Kač M., Poklar Ulrih N. 2010. Antioksidacijska učinkovitost fenolnih spojin. Kemija v šoli in družbi, 22, 2: 14-19
- Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave – funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi 2008, Ljubljana, 17. – 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., Bersat 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 source, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56: 317 – 333

- Briviba K., Sies H. 1994. Nonenzymatic antioxidant defense system V: Natural antioxidants in human health and disease. Frei B. (ed.). San Diego, Academic Press: 107 – 128
- Cohen A. 2011. Blagodejno zeleno gnojenje. Ljubljana, Delo in dom: 1 str.  
<http://www.deloindom.si/prst/blagodejno-zeleno-gnojenje>
- Čeh B. 2009. Oljnice: pridelava, kakovost olja ter možnost uporabe za biomaziva in biodizel. Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije; Ljubljana, Fakulteta za strojništvo: 47 – 48, 52 - 53
- Dabrowski K.J., Sosulski F.W. 1984. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 128 – 130
- Elisseva E. 2006. Field of many flowering flax plants with blue sky. Canada, 123RF.com: 1 str.  
[http://www.123rf.com/photo\\_9734668\\_field-of-many-flowering-flax-plants-with-blue-sky.html](http://www.123rf.com/photo_9734668_field-of-many-flowering-flax-plants-with-blue-sky.html) (januar 2006)
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58: 966 - 968
- Halliwell B., Aeschbach R., Lörliger J., Aruoma O.I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 7: 601 – 617
- Hribar J., Simčič M., Vidrih R. 2008. Stranski proizvodi v predelavi rastlinskih živil. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi 2008, Ljubljana, 17. – 18. april 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 160 – 161
- ISO 3656. Animal and vegetable fats and oils – Determination of ultraviolet absorbance. International standard. 2<sup>nd</sup> ed. 1989: 4 str.
- Johnsson P. 2004. Phenolic compounds in flaxseed (chromatographic and spectroscopic analyses of glucosidic conjugates). Licentiate thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences: 17 – 17

- Jovanovič S.V., Simič M. G. 2000. Antioxidants in nutrition V: Reactive oxygen species. Chiueh C.C. (ed.). New York, The New York Academy of Sciences: 326 – 334
- Jovanovič S.V., Steenken S., Simič M.G., Hara Y. 1997. Antioxidant properties of flavonoids reduction potentials and elektron transfer reactions of flavonoid radicals. V: Flavonoids in health and disease. Rice-Evans C.A., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 137 – 161
- Juntachote T., Bergohofer E., Siebenhandl S., Bauer F. 2006. The antioxidative properties of holy basil and galangal in cooked ground pork. *Meat Science*, 72: 446 – 456
- Kehrer J.P., Smith C. V. 1994. Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in ethiology of human diseases. V: Natural oxidants in human health and disease. Frei B. (ed.). San Diego, Academic Press: 25 – 62
- Kocjan Ačko D. 1999. Pozabljene poljščine. Ljubljana, Kmečki glas: 83 – 100, 135 – 142
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. – 27. oktober 2000. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11 – 21
- Kozłowska H., Rotkiewicz D.A., Zadernowski R. 1983. Phenolic acids in rapeseed and mustard. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 6: 1119 - 1123
- Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. – 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33 - 39
- Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 224 – 282

- Matthäus B. 2002. Antioxidant activity of extracts isolated from residues of oilseeds, such as rapeseed or sunflower. *Agro Food Industry Hi Tech*, 13: 22 – 25
- Morel I., Cillard P., Cillard J. 1997. Flavonoid-metal interactions in biological systems. V: *Flavonoids in human health and disease*. Rice-Evans C.A., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker. Inc.: 164 – 179
- 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*. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4507 – 4514
- Oomah B.D., Kenaschuk E.O., Mazza G. 1995. Phenolic acids in flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2016 - 2019
- 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
- Ramachandran S., Singh K.S., Larroche C., Soccol C.R., Pandey A. 2006. Oil cakes and their biotechnological applications: A review. *Bioresource Technology*, 98: 2000 – 2009
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioproces pridobivanja antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. – 27. oktober 2000. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53 – 65
- Špringer J. 2003. Lan, navadni (*Linum usitatissimum*). Murska Sobota, Pomurske lekarne: 1 str.  
<http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1520> (marec 2003)

Terpinc P., Abramovič H. 2010. A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. *Food Chemistry*, 121: 366 – 371



## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Heleni Abramovič za pomoč pri nastajanju diplomskega dela, za njeno potrpežljivost in razumevanje.

Hvala tudi Petri Terpinc in vsem ostalim zaposlenim na Katedri za kemijo in Katedri za tehnologije rastlinskih živil, za veliko pomoč pri praktičnem delu diplomske naloge v laboratoriju.

Lepo se zahvaljujem prof. dr. Rajku Vidrihu za pregled diplomske naloge.

Zahvala gre tudi recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću.

Najlepša hvala mami in očetu, bratu, tetam in stricem, nenazadnje tudi vsem sošolcem in sošolkam ter prijateljem za vso podporo v času študija, predvsem v zadnjem obdobju, ko mi je bilo najtežje.

Skupaj z vsemi, ki se jim še enkrat lepo zahvaljujem, mi je uspelo napraviti nov, neprecenljiv korak v življenju.