

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anita KURAJA

***IN VITRO* TER *IN VIVO* ANTIOKSIDATIVNA
UČINKOVITOST ETANOLNIH IZVLEČKOV
PROPOLISA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

***IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTIOXIDANT
EFFICIENCY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF
PROPOLIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Heleno Abramovič, za somentorico doc. dr. Polono Jamnik in za recenzentko doc. dr. Barbaro Jeršek.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Somentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Reczentka: doc. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anita Kuraja

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 638.135: 547.56 (043)= 163.6
- KG propolis/izvlečki propolisa/fenolne spojine/kvercetin/*in vitro*/ antioksidativna učinkovitost/*in vivo*/ antioksidativna učinkovitost/kvasovke/*Saccharomyces cerevisiae*
- AV KURAJA, Anita
- SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/ JAMNIK, Polona (somentorica)/ JERŠEK, Barbara (recezentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2009
- IN *IN VITRO* TER *IN VIVO* ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST ETANOLNIH IZVLEČKOV PROPOLISA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 64 str., 16 pregl., 16 sl., 67 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V okviru diplomskega dela smo v izvlečkih propolisa slovenskega porekla določili vsebnost celokupnih fenolnih spojin in njihovo *in vitro* ter *in vivo* antioksidativno učinkovitost. Ekstrakcijo fenolnih spojin smo izvedli z uporabo dvoje različnih ekstrakcijskih topil: zmes etanol/voda (70:30 v/v) in zmes etanol/voda (96:4 v/v). Skupne fenolne spojine smo v tako pridobljenih etanolnih izvlečkih določili spektrofotometrično s pomočjo Folin-Ciocalteu metode. *In vitro* dokazovanje antioksidativne učinkovitosti etanolnih izvlečkov propolisa (EIP) in komercialno dostopnega antioksidanta kvercetina je potekalo z uporabo štirih različnih metod: DPPH metoda (sposobnost lovljenja DPPH• radikala), sposobnost redukcije kovinskih ionov, beljenje β-karotena (sposobnost lovljenja peroksilnega radikala v emulziji linolne kisline v vodi), sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala. Izkazalo se je, da izbira topila vpliva na vsebnost celokupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost izvlečka. Ekstrakcija s 70 % etanolom je bila bolj učinkovita od ekstrakcije s 96 % etanolom. V izvlečku, ki smo ga pripravili s 70 % etanolom, smo namreč določili večjo vsebnost fenolnih spojin, in večji antioksidativni potencial. Preverili smo tudi antioksidativno delovanje 70 % EIP in kvercetina *in vivo*, z merjenjem znotrajcelične oksidacije, kjer smo uporabili 2,7-diklorofluorescin. Kot modelni organizem smo uporabili kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Pri *in vitro* metodah so EIP v primerjavi s kvercetinom pokazali slabšo antioksidativno učinkovitost. Pri *in vivo* testu, je 70 % EIP pokazal antioksidativno delovanje, medtem ko ga kvercetin ni.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 638.135: 547.56 (043)= 163.6
- CX propolis/extracts of propolis/phenolic compounds/querletin/*in vitro*/ antioxidant efficiency/*in vivo*/ antioxidant efficiency/yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*
- AU KURAJA, Anita
- AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/ JAMNIK, Polona (co-advisor)/ JERŠEK, Barbara (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2009
- TI *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTIOXIDANT EFFICIENCY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO IX, 64 p., 16 tab., 16 fig., 67 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the context of the graduation work in the extracts of propolis of Slovenian origin the content of total phenolic compounds and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant efficiency was determined. The extraction of phenolic compounds was performed by use of two different extraction solvents: a mixture of ethanol/water (70:30 v/v) and a mixture of ethanol/water (96:4 v/v). The content of total polyphenolic compounds was determined spectrophotometrically according to Folin-Ciocalteu method. *In vitro* detection of antioxidant efficiency of ethanolic extracts of propolis (EEP) and querletin has been determined using four different methods: DPPH method (scavenging activity of DPPH• radical), reducing power assay, β -carotene bleaching assay (peroxyl radical scavenging activity in emulsified linoleic acid in water), superoxide anion scavenging activity. It was found, that the choice of solvent (polarity) affected the content of total phenolic compounds and antioxidant efficiency of the extract. Extraction with 70 % ethanol was more effective than extraction with 96 % ethanol. In extract obtained by 70 % ethanol higher levels of phenolic compounds and also a greater antioxidative potential was determined. We have also checked the antioxidant activity of 70 % EEP and querletin *in vivo*, by measuring the intracellular oxidation, using 2,7-diklorofluorescin. As model organism we used the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *in vitro* methods EEP compared to commercially available antioxidant querletin, showed lower antioxidant efficiency. In *in vivo* test where the level of the intracellular oxidation was measured, 70 % EEP did show antioxidant activity, unlike querletin where that ability was missing.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
	KEY WORDS DOCUMENTATION	III
	KAZALO VSEBINE	IV
	KAZALO PREGLEDNIC	VI
	KAZALO SLIK	VII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1	UVOD.....	1
1.1	NAMEN NALOGE	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV.....	3
2.1	PROPOLIS	3
2.1.1	Splošno o propolisu	3
2.1.2	Pridobivanje propolisa.....	4
2.1.3	Kemijska sestava propolisa	4
2.1.4	Zdravilni učinki propolisa	5
2.2	ANTIOKSIDANTI.....	6
2.2.1	Prosti radikali in oksidativni stres	6
2.2.2	Avtooksidacija	6
2.2.3	Značilnosti antioksidantov.....	7
2.3	FENOLNE SPOJINE	8
2.3.1	Flavonoidi.....	10
3	MATERIALI IN METODE DELA.....	12
3.1	MATERIALI	12
3.1.1	Propolis.....	12
3.1.2	Mikroorganizem	12
3.1.3	Gojišča	12
3.1.3.1	Trdno gojišče YEPD	12
3.1.3.2	Tekoče gojišče YEPD	12
3.1.4	Reagenti.....	13
3.1.5	Pribor in oprema	14
3.2	METODE DELA.....	16
3.2.1	Homogenizacija propolisa	16
3.2.2	Ekstrakcija fenolnih spojin propolisa.....	16

3.2.3	Čiščenje etanolnih izvlečkov propolisa z uporabo ekstrakcije na trdni fazi (SPE).....	16
3.2.4	Določanje skupnih fenolnih spojin v izvlečkih propolisa.....	17
3.2.5	Preverjanje antioksidativnega delovanja izvlečkov propolisa <i>in vitro</i>	19
3.2.5.1	Sposobnost redukcije	19
3.2.5.2	Metoda z radikalom DPPH•	20
3.2.5.3	Beljenje β -karotena	20
3.2.5.4	Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala.....	20
3.2.6	Preverjanje antioksidativnega delovanja izvlečkov propolisa <i>in vivo</i>	21
3.2.6.1	Kultivacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.2.6.2	Določanje znotrajcelične oksidacije.....	21
3.2.7	Statistična obdelava.....	22
4	REZULTATI Z RAZPRAVO.....	23
4.1	SKUPNE FENOLNE SPOJINE.....	23
4.2	PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI IZVLEČKOV PROPOLISA <i>IN VITRO</i>	27
4.2.1	Sposobnost redukcije	27
4.2.2	Metoda z radikalom DPPH•	30
4.2.3	Beljenje β -karotena	34
4.2.4	Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala.....	38
4.3	PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA IZVLEČKOV PROPOLISA <i>IN VIVO</i>	42
5	SKLEPI.....	46
6	POVZETEK	47
7	VIRI.....	49
	ZAHVALA	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin v rastlinah (Robards in sod., 1999)	9
Preglednica 2: Sestava trdnega gojišča (Atlas, 1993)	12
Preglednica 3: Sestava tekočega gojišča (Atlas, 1993)	13
Preglednica 4: Vrednosti za masno koncentracijo klorogenske kisline (γ_{KK}) v epici in povprečne vrednosti za absorbanco (A_{765})	18
Preglednica 5: Vrednosti za A_{765} za 70 % etanolni izvleček in za 96 % etanolni izvleček propolisa po čiščenju s SPE	23
Preglednica 6: Vsebnosti fenolnih spojin v propolisu določena pred in po čiščenju s SPE, ki je podana kot masa klorogenske kisline na g propolisa (mg/g) ter vsebnost fenolnih spojin v izvlečkih propolisa po čiščenju s SPE, ki je podana kot masa klorogenske kisline na mL raztopine izvlečka (mg/mL)	24
Preglednica 7: Vsebnost fenolnih spojin v propolisu (mg klorogenske kisline/g propolisa) glede na geografsko področje (Kumazawa in sod., 2004)	27
Preglednica 8: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina v reakcijski zmesi (γ) in vrednosti izmerjene absorbance (A_{740})	28
Preglednica 9: Sposobnost redukcije izvlečkov propolisa in kvercetina	29
Preglednica 10: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije	31
Preglednica 11: Nakloni premic in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH	33
Preglednica 12: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{470}) v emulziji za izvlečka propolisa in kvercetin pri različnih časih, t	36
Preglednica 13: Vrednosti koeficientov antioksidativne aktivnosti (C_{AO}) v emulziji po 120 minutah inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/ml	37
Preglednica 14: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina (γ) in vrednosti izmerjene absorbance (A_{570})	39
Preglednica 15: Koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi (γ) in sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za izvlečka propolisa in kvercetin	40
Preglednica 16: Vrednosti fluorescenčnih intenzitet (FI) pri različnih koncentracijah fenolnih spojin izvlečka propolisa in kvercetina, v suspenziji celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Propolis (Propolis, 2009)	3
Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Robards in sod., 1999).....	10
Slika 3: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino	18
Slika 4: Koncentracija fenolnih spojin v izvlečkih propolisa (mg/ml).....	25
Slika 5: Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi.....	29
Slika 6: Sposobnost redukcije izvlečkov propolisa in kvercetina	30
Slika 7: Delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa v reakcijski zmesi	32
Slika 8: Delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi	32
Slika 9: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH• radikala ($ED_{50\%}$)	34
Slika 10: Koeficient antioksidativne aktivnosti (C_{AO}) v emulziji v odvisnosti od časa inkubacije za kvercetin in izvlečka propolisa	37
Slika 11: Vrednosti koeficientov antioksidativne aktivnosti (C_{AO}) v emulziji linolne kisline v vodi pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/mL po 120 minutah inkubacije.....	38
Slika 12: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za izvlečka propolisa... 41	41
Slika 13: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za kvercetin.....	41
Slika 14: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za izvlečka propolisa in kvercetin pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 0,025 mg/mL.....	42
Slika 15: Spreminjanje fluorescenčne intenzitete (FI) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin izvlečka propolisa in kvercetina, ki smo ju dodali suspenziji celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
Slika 16: Vrednosti fluorescenčnih intenzitet (FI) glede na kontrolo za fenolne spojine izvlečka propolisa in kvercetina pri koncentraciji 0,05 (mg/mL).....	45

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AH – antioksidant

ATP □ adenzin trifosfat

BHA □ butilirani hidroksianizol

BHT □ butilirani hidroksitoluen

C_{AO} □ koeficient antioksidativne učinkovitosti

dH₂O □ destilirana voda

DPPH □ 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil

$ED_{50\%}$ □ koncentracija fenolnih spojin, ki je odgovorna za 50 % zmanjšanje začetne količine DPPH

EEP □ ethanolic extract of propolis

EIP □ etanolni izvleček propolisa

70 % EIP □ propolis ekstrahiran z zmesjo etanol/voda (70:30 v/v)

96 % EIP □ propolis ekstrahiran z zmesjo etanol/voda (96:4 v/v)

FC □ Folin-Ciocalteu reagent

FS – fenolne spojine

H₂DCF □ diklorofluorescein

H₂DCFDA □ diacetatna oblika diklorofluoresceina

KK □ klorogenska kislina

NADH □ nikotinamid adenin dinukleotid

NBT □ nitro tetrazol modro

PG □ propilgalat

PMS □ fenazin metasulfat

R• □ prosti radikal

RH □ maščobna kislina

ROO• □ peroksilni radikal

ROOH □ peroksid

ROS □ reaktivne kisikove zvrsti

SASA (%) – sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala

SD □ standardni odklon

SPE □ ekstrakcija na trdni fazi

TBHQ □ 2-terciarni-butil-hidrokinon

γ – masna koncentracija

YEPD □ gojišče (kvasni ekstrakt, pepton, glukoza)

1 UVOD

Kakovostna in zdravstveno ustrezna prehrana je temelj zdravega načina življenja. Živimo v času, ko smo svoje prehranjevalne navade zaradi načina pridelave hrane in hitrega tempa življenja popolnoma osiromašili. To je tudi eden izmed pglavitnih razlogov vse večjega povpraševanja in uživanja hrane bogate z antioksidanti, saj ta prispeva k daljšemu in bolj zdravemu življenju.

Zadnja leta vse bolj poudarjamo pomen zdrave hrane, to je hrane, ki je pripravljena brez konzervansov in umetnih aditivov. Zaradi suma, da bi bili lahko nekateri sintetični antioksidanti toksični in visokih stroškov njihove izdelave, obstaja veliko zanimanje za odkrivanje nekaterih naravnih virov antioksidantov. Prav to pa tudi vodi v iskanje možnosti za zamenjavo umetnih aditivov z naravnimi, saj so le ti neškodljivi za človeški organizem. Številne študije so pokazale, da njihova uporaba vodi v preprečevanje nastanka določenih bolezni in izboljšanje fiziološkega ter psihološkega stanja človeka (Moure in sod., 2001).

Tradicionalno igrajo antioksidanti izredno pomembno vlogo, saj predstavljajo nepogrešljivo sestavino v živilski industriji. Oksidacija živil predstavlja enega izmed bolj nezaželenih dejavnikov med samo pridelavo in skladiščenjem hrane. Ne samo, da vodi v nastanek potencialno škodljivih snovi in arome po žarkem, ampak tudi vpliva na manjšo hranilno vrednost ter varnost takega živila. Z uporabo antioksidantov v živilskih izdelkih prizadenemo proces lipidne peroksidacije, s tem pa podaljšamo čas skladiščenja ter izboljšamo kakovost tem izdelkom (Moreira in sod., 2008).

Dodatek antioksidantov pa ne pripomore samo k barvi in aromi nekega živila. Antioksidanti predstavljajo enega izmed pomembnejših dejavnikov za zaščito celic pred propadanjem, zato je izjemnega pomena, da zaužijemo zadostno količino antioksidantov. Človek je vsakodnevno izpostavljen različnim stresom, kar vodi do poškodb celičnih struktur in verižnih reakcij, katerih kopičenje vodi do nastanka določenih bolezni in pospešenega staranja. Znano je preventivno delovanje antioksidantov v boju proti boleznim, ki so povezane z reakcijami prostih radikalov v naših celicah. Zadnje raziskave so pokazale širok spekter delovanja antioksidantov na zdravje človeka; antikancerogeno, antimutageno in antialergeno delovanje.

Med pomembne antioksidante se zagotovo štejejo fenolne spojine, oz. polifenoli. Fenolne spojine so zelo velika in strukturno raznolika skupina spojin, ki se pojavljajo v rastlinah. S sintezo antioksidativnih zaščitnih snovi (predvsem fenolnih spojin) se rastline zaščitijo pred napadi virusov, bakterij, rastlinojedih organizmov in pred nevarnimi sončnimi žarki, ki sprožijo nastanek prostih radikalov (Vrhovšek, 2001). Polifenoli igrajo pomembno vlogo ne samo v rastlinskem svetu, ampak tudi v prehrani človeka (Chaillou in sod., 2009). Znano je, da te snovi posedujejo antikarcinogene, antiinflamatorne, antiaterogene, imunomodulacijske aktivnosti, znižujejo pa tudi krvni pritisk, holesterol in preprečujejo nastanek tromboze.

Propolis predstavlja bogat vir različnih fenolnih spojin, ki se obnašajo kot naravni antioksidanti in je njegova uporaba zaradi pozitivnih vplivov na zdravje človeka vse bolj in bolj prisotna ter popularna v življenju posameznika (Chaillou in sod., 2009). S strani veliko

avtorjev je bilo dokazano, da ima propolis širok spekter delovanja, saj poseduje raznolike biološke in farmakološke aktivnosti (Banskota in sod., 2001; Castaldo in Capusso., 2002).

1.1 NAMEN NALOGE

Diplomsko delo je del širše raziskave, katere namen je bil v izvlečkih propolisa slovenskega porekla določiti vsebnost celokupnih fenolnih spojin in dokazati *in vitro* ter *in vivo* antioksidativno učinkovitost teh. Želeli smo pokazati, da izbira ekstrakcijskega topila vpliva na vsebnost fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost izvlečka ter podati primerjavo s komercialno dostopnim antioksidantom kvercetinom.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da:

- bomo iz propolisa slovenskega porekla pridobili izvlečke, ki bodo glede na vsebnost fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost *in vitro* primerljivi z izvlečki propolisa iz drugih geografskih področij,
- bodo izvlečki propolisa pokazali antioksidativno delovanje *in vivo*,
- izbira topila (polarnost) vpliva na vsebnost celokupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost izvlečka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROPOLIS

2.1.1 Splošno o propolisu

Za čebele je že od nekdaj veljalo prepričanje, da so svete živali in božje poslanke, kajti že od nekdaj so tesno povezane s človeškim življenjem. Pomembne vloge ne igrajo samo pri opravevanju, ampak tudi pri pridobivanju raznovrstnih produktov kot so med, matični mleček, propolis, vosek.

Beseda propolis izhaja iz starogrškega jezika, kjer pomeni *pro* (»pred«) in *polis* (»mestom«) (Sforcin, 2007). Po drugih virih pa naj bi beseda izvirala iz latinske besede *propolisio*, kar pomeni zamašiti oziroma zgladiti. Propolis ali zadelavina je smolast čebelji proizvod, ki ima pri temperaturi 25 - 45 °C plastično konsistenco. Pri višjih temperaturah je lepljiv, pri nizkih pa trši in tudi bolj krhek, ter se ob lomljenju drobi. Barva propolisa je v veliki meri odvisna od njegovega izvora in starosti. Lahko je od zeleno rumene do temno rjave, včasih celo črne barve, pogosto z rdečkastim odsevom (De Castro, 2001). Aroma je prijetna in spominja na smolo, med, vosek in vanilijo (Božnar, 2002).



Slika 1: Propolis (Propolis, 2009)

Uporabi propolisa so namenjali veliko pozornosti že v antičnih časih, saj je bil pomemben in cenjen že v egipčanski, babilonski, arabski, grški in starorimski medicini. Kot pomožno zdravilo se je uporabljal za različna notranja in zunanja vnetja (Sforcin, 2007).

Pripisujejo mu zelo pomembno vlogo pri vzdrževanju higiene čebelje družine, saj ga čebele uporabljajo za ohranjanje čistega in suhega doma (Božnar, 2002; Meglič, 2004). Z njim premažejo notranje stene panja, razpoke in špranje, ter se na ta način zaščitijo pred prepihom in različnimi okužbami (Basim in sod., 2006). Prav tako je znana uporaba propolisa za prevleko notranjosti celic, kamor matica odloži jajčeca in balzimiranje ubitih sovražnikov v panju, saj na ta način preprečijo, da bi njihovi ostanki postali vir okužb (Božnar, 2002).

2.1.2 Pridobivanje propolisa

Propolis je sestavljen iz različnih rastlinskih smol, katere čebele nabirajo na smolastih popkih različnih dreves, predvsem topolov, pa tudi brez, vrb, divjih kostanjev, borov, smrek, hrastov in jelš. Med nabiranjem dodajo čebele k smolam še izločke žlez slinavk obogatene s fermenti in nastalo snov iz sprednjih nožic prestavijo v koška za cvetni prah na zadnjih nožicah. Z napolnjenimi koški se vrnejo v panj, kjer se s precejšnjim trudom znebijo svojega tovora. Prevzamejo ga druge čebele, ki mu dodajo še vosek, da postane snov bolj lepljiva. Čebele nabirajo smole predvsem ob toplih dnevih pozno poleti in jeseni, ko se temperatura zraka dvigne nad 20 °C, kajti takrat so lepljive in se lažje gnetejo. Znano je, da ga največ nabereta kavkaška in italijanska čebela, temna čebela in kranjica pa nekoliko manj. Tako lahko kavkaška čebelja družina nabere od 250-1000 g propolisa na leto, druge čebelje rase pa samo od 50-150 gramov na leto (Castaldo in Capusso., 2002; Meglič, 2004; Smerdu, 1977).

Propolis lahko pridobivamo priložnostno ali načrtno. Priložnostno se pridobiva ob jesenskem čiščenju panja, oziroma njegovih delov. Glede na to, da tak propolis vsebuje različne primesi lesa ali kovin, je uporaba tako pridobljenega propolisa primerna bolj za industrijsko rabo npr. za izdelavo premazov. Pri načrtnem pridobivanju propolisa pa uporabimo rešetke iz umetnih mas, katerih odprtine so manjše od 5 mm. Propolis se z mrež ali rešetk odstrani tako, da te najprej zamrzemo, nato pa propolis enostavno postrgamo. Tako pridobljen propolis ima večjo kakovost v primerjavi s propolisom pridobljenim priložnostno in je tudi primernejši v farmacevtski industriji. Uporablja se za izdelavo različnih tinktur, krem itd. (Meglič, 2004).

2.1.3 Kemijska sestava propolisa

Kakovost propolisa, njegove kemijske, fiziološke in zdravilne lastnosti so odvisne od geografskega porekla propolisa, vrste rastline in letnega časa nabiranja smol (Ahn in sod., 2007; Sobočanec in sod., 2006). Pomembno vlogo pa igrajo tudi vrsta in delovna kondicija samih čebel (Moreira in sod., 2008).

Kemijska sestava propolisa je sledeča: rastlinske smole in balzami (50 %), voski (30 %), eterična olja (10 %), cvetni prah (5 %), druge organske snovi (5 %) ter različni encimi, ki bi lahko bili povezani z njegovo biološko aktivnostjo (De Castro, 2001).

Propolis pa je tudi bogat vir mineralov kot so magnezij, nikelj, kalcij, cink, mangan, železo, ter vitaminov B₁, B₂, B₆, C in E (Castaldo in Capusso., 2002).

Med fenolnimi spojinami, ki so jih identificirali v propolisu, so najbolj značilni derivati hidroksi cimetne kisline in flavonoidi (flavoni, flavanoni (pinocembrin, pinobanksin-3-acetat), flavanoli (kvercetin, galangin)), ki so obenem tudi količinsko najbolj zastopana skupina (Marucci in sod., 2001; Prytyk in sod., 2003; Jasprica, 2007).

2.1.4 Zdravilni učinki propolisa

Pozitivni učinki propolisa na človeško zdravje so znani že več kot 1000 let. Zaradi njegove popularnosti v ljudski medicini, je postal izredno popularen predmet kemijskih in farmacevtskih raziskav (Banskota in sod., 2001). Dandanes je propolis zelo popularen remedij, saj je prav njegova vsestranskost tista, ki mu omogoča široko uporabo v različnih industrijskih panogah; farmacevtski, kemijski in živilski industriji. (Smerdu, 1977; Mohammadzadeh in sod., 2007). Zaradi antioksidativnega delovanja se v živilski industriji uporablja pri konzerviranju nekaterih živil, preventivno proti različnim boleznim, ki so povezane z oksidacijskim stresom v našem organizmu. Veliko študij je potrdilo, da propolis poseduje raznolike biološke in farmakološke aktivnosti (Ahn in sod., 2007, Trusheva in sod., 2007). Biološka in farmakološka učinkovitost propolisa je odvisna od medsebojnega razmerja različnih substanc in načina pridobivanja. Povezana je s flavonoidi, fenolnimi kislinami in njihovimi estri, v nekaterih primerih pa je bilo dokazano, da tudi s terpenoidi (Mendes da Silva in sod., 2006). Znano je delovanje propolisa proti različnim vnetjem sluznice, ustne votline, žrela in dlesni (Prytyk in sod., 2003). Klinične študije pa so tudi pokazale, da uspešno pospešuje epitelizacijo in celjenje ran, zmanjšuje in blaži bolečine, ter se uspešno bojuje proti ranam na želodcu, dvanajstniku ter razjedam na ustju maternice. Njegova uporaba je lahko tako notranja, kot tudi zunanja (Banskota in sod., 2001). Dosegljiv je v obliki različnih mazil, kapsul, medenega pripravka, alkoholnih raztopin (Smerdu, 1977), sirupov etanolnih ekstraktov, vodnih ekstraktov v obliki kapljic (The Lawrence review of natural products).

Številna poročila o propolisu dokazujejo širok spekter njegovega protimikrobnega delovanja. Zadnje *in vitro* študije so pokazale njegovo inhibitorno delovanje proti nekaterim gram pozitivnim bakterijam (rodova *Streptococcus* in *Staphylococcus*), gram negativnim bakterijam (vrste *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), in glivam (vrste *Candida albicans*, *Aspergillus niger*) (Mendes da Silva in sod., 2006; Lu in sod., 2005). Pomembno je tudi to, da propolis sam, še posebej pa v kombinaciji z matičnim mlečkom deluje zelo močno na vrsto virusov, med njimi na virus gripe. Nekateri vzorci mešanice mlečka in propolisa pa so pokazali tudi močen učinek (celo v zelo velikih razredčitvah) na virus Herpes Simplex. Znano je tudi njegovo delovanje na nekatere vrste glivic, ki povzročajo parazitska obolenja ali mikozo. Toda potrebno je poudariti to, da kljub temu, da je bilo protimikrobno delovanje propolisa opisano s strani veliko avtorjev, pa je dejanski

mehanizem delovanja še zmeraj neznan (Banskota in sod., 2001; Castaldo in Capusso., 2002; Smerdu, 1977).

Novejše raziskave pa so pokazale tudi antitumorno delovanje izvlečkov propolisa (Motomura in sod., 2008).

2.2 ANTIOKSIDANTI

2.2.1 Prosti radikali in oksidativni stres

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom. Gre za visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo različne celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami. Nastajanje prostih radikalov je lahko posledica normalnega celičnega metabolizma, ali pa izpostavljenosti različnim stresnim razmeram (ultravijoličnem sevanju, kajenju, stresu, toploti, itd). Njihov nastanek lahko povzročijo tudi nekatere snovi in zdravila kot so aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki. Do nastanka prostih radikalov lahko pride ob fagocitozi, vnetju tkiv in nekaterih somatskih obolenjih (Korošec, 2000; Raspor in sod., 2000). Povzročijo lahko poškodbo lipidov (peroksidacija maščobnih kislin, spremenjena prepustnost membran), proteinov (oksidacija SH-skupin, aktivacija encimov (kolagenaze), inaktivacijo encimov (α_1 . antitripsina), DNK (cepitev verige, povečano porabo nikotinamid adenin dinukleotida, moteno sintezo ATP). Prosti radikali tvorijo nove proste radikale, ki dodatno poškodujejo celične strukture. Ta škoda se v celicah počasi seštevata in vodi do prehitrega staranja, različnih degenerativnih bolezni ter rakastih obolenj (Korošec, 2000 ; Moure in sod., 2001).

Porušeno ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti imenujemo oksidativni stres, do katerega lahko pride iz večih razlogov. Eden izmed njih je porušeno delovanje antioksidativnega obrambnega sistema zaradi mutacij v pripadajočih encimih in/ali pomanjkanja antioksidantov v celici. Drugi razlogi so lahko povečana tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) zaradi izpostavljenosti celic spojinam, ki vodijo v nastanek ROS, ali aktivacija sistemov za nastanek ROS v celici (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). ROS so molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih z enim ali več nesparjenih elektronov. Njihove glavne tarče so lipidi, proteini in molekule DNA, kjer nastane še več ROS. Le ti povzročajo še dodatne poškodbe celičnih organelov, celičnih membran in encimov, katerih kopičenje vodi v celično smrt (Sigler in sod., 1999; Costa in Moradas-Ferreira, 2001). V skupino ROS ne spadajo samo prosti radikali kot so superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), hidroperoksidni ($H_2O_2^{\bullet}$), peroksilni (ROO^{\bullet}) in alkoksilni radikal (RO^{\bullet}), ampak tudi reaktivne kisikove spojine: hipoklorna kislina (HOCl), vodikov peroksid (H_2O_2) in singletni kisik (1O_2) (Gomes in sod; 2005).

2.2.2 Avtooksidacija

Avtooksidacija je verižna reakcija prostih radikalov, ki poteče kot posledica učinkovanja svetlobe, toplote, ionizirajočega sevanja, prisotnosti kovinskih ionov, prostih radikalov in encimov.

Avtooksidacija povzroča v bioloških sistemih različne zaplete povezane z zdravjem in hitrostjo staranja ljudi. Negativen vpliv avtooksidacije pa se kaže tudi pri pridelavi hrane, ki je povezana s senzoričnimi lastnostmi in prehransko vrednostjo samega živila (Štefan in sod., 2007).

Avtooksidacija obsega 4. stopnje (Laguerre in sod., 2007):

Iniciacija ali začetek – iz maščobne kisline se odcepi vodik in nastane prosti radikal.



Propagacija ali razvoj – dobimo peroksilni radikal, kjer prosti radikal $R\cdot$, ki je zelo reaktiven reagira z molekularnim kisikom.



Peroksidni radikal reagira z novo molekulo maščobne kisline, dobimo hidroperoksid in nov prosti radikal.



Terminacija ali konec – nastanek stabilnih spojin (neradikalskih produktov)



Številne *in vitro* raziskave so pokazale, da nasičene maščobne kisline in maščobne kisline z eno dvojno vezjo, kažejo v primerjavi z nenasičenimi maščobnimi kislinami večjo odpornost proti reaktivnim kisikovim vrstam (Štefan in sod., 2007). Pri avtooksidaciji nastaja vse več prostih radikalov in vse več maščobnih molekul se pretvori v hidroperokside, ki so primarni produkti oksidacije maščob. Toda hidroperoksidi niso krivci za žarkost, saj so brez vonja in okusa, ter so nehlapni. Zaradi svoje neobstoynosti se začnejo cepiti, kar vodi do nastanka karbonilnih spojin s kratkimi verigami, ki so odgovorni za žarek vonj in okus. Avtooksidacijo med skladiščenjem zmanjšamo s pakiranjem živil v temno embalažo in inertni plin ter skladiščenjem živil pri čim nižji temperaturi (zmrzovanje, hlajenje) ter z dodatkom antioksidantov (Trošt, 2004).

2.2.3 Značilnosti antioksidantov

Antioksidant je vsaka snov, ki lahko že v nizki koncentraciji glede na koncentracijo substrata, zadrži ali zavre oksidacijo (Halliwell in Gutteridge, 1999). V živilski industriji so antioksidanti tiste sestavine živil, oziroma tisti dodatki živilom, s katerimi preprečimo ali zmanjšamo žarkost živil. Kot tehnološki izboljševalci kakovosti omogočijo podaljšano ohranjanje živil tako v zdravstvenem kot tudi senzoričnem pomenu. Antioksidanti prispevajo k oksidativni stabilnosti živil in s tem podaljšujejo čas skladiščenja. Ta je lahko omejen predvsem zaradi oksidacijskih reakcij, kot je oksidacija lipidov, ki vodi v

nastanek negativnih sprememb barve, teksture, okusa in vonja izdelka. Negativen vpliv oksidacijskih procesov se ne kaže samo v živilskem izdelku, ampak tudi na zdravju človeka, saj je dandanes prisotna pretirana izpostavljenost prostim radikalom, kar še bolj poveča tveganje nastanka degenerativnih bolezni (Murkovic, 2003). Zato so pomembni tudi za človeka, saj zmanjšujejo negativne učinke reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti. S tem onemogočijo nastanek novih prostih radikalov v celici in njenih poškodb, ter na ta način sodelujejo pri obrambi organizma pred nastankom različnih bolezni (Raspor in sod., 2000; Vidrih in sod., 2000; Sies, 1997).

Dejstvo je, da so danes v ospredju antioksidanti naravnega izvora, verjetno zaradi pozitivnih lastnosti na zdravje človeka in pa suma toksičnosti nekaterih sintetičnih antioksidantov. Naravni antioksidanti so predvsem fenolne spojine, ki se lahko pojavljajo v vseh delih rastlin in jih lahko najdemo v številnih živilskih surovinah. V nekaterih razmerah pa lahko tudi antioksidativno učinkovitost pokažejo tudi nefenolne spojine, kot so karotenoidi in fosfolipidi. Med sintetičnimi antioksidanti so najbolj pomembni BHA (butilirani hidroksianizol), BHT (butilirani hidroksitoluen), PG (propilgalat), TBHQ (2-terciarni-butyl-hidrokinon) (Moure in sod., 2001; Skvarča, 2000; Gordon, 2003).

Lastnosti idealnega antioksidanta

- varen za uporabo
- ne vpliva na zeleno barvo in okus
- učinkovit pri nizkih koncentracijah antioksidanta
- enostavna vključitev v izdelek
- odporen na postopke toplotne obdelave
- dostopen po nizkih cenah

Glavni razlogi uporabe antioksidantov

- podaljševanje roka uporabnosti živil
- zmanjšanje izgube hranilnih snovi
- znižanje stroškov (Bernot, 2001)

2.3 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti rastlin. Gre za heterogeno skupino organskih spojin, ki se v rastlinah redko pojavlja prosta, največkrat so vezani na sladkorje, proteine, lipide, terpenoide (Gülcin, 2006). V svoji strukturi imajo vsaj en en aromatski obroč, z eno

ali več –OH skupin (polifenoli) direktno vezanih na aromatski obroč (Robards in sod., 1999). Živali in ljudje nimamo sposobnosti sinteze polifenolnih spojin, dobimo jih lahko samo z vnosom rastlinske hrane (Peterson in Dwyer, 1998).

Zaradi strukturne raznolikosti lahko polifenole razdelimo na več različnih načinov. Najbolj je uveljavljen način, kjer jih razvrstimo v skupine glede na njihov osnovni skelet.

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin v rastlinah (Robards in sod., 1999)

OSNOVNI SKELET	SKUPINA
C ₆	Preprosti fenoli
C ₆ -C ₁	Fenolne kisline
C ₆ -C ₂	Fenilacetne kisline
C ₆ -C ₃	Hidroksicimetne kisline, fenilpropeni, kumarini
C ₆ -C ₄	Naftokinoni
C ₆ -C ₁ - C ₆	Ksantoni
C ₆ -C ₂ - C ₆	Stilbeni, antrakinoni
C ₆ -C ₃ - C ₆	Flavonoidi
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignani, neolignani
(C ₆ -C ₃ -C ₃) ₂	Bioflavonoidi
(C ₆ -C ₃) _n	Lignini
(C ₆ -C ₃ - C ₆) _n	Kondenzirani tanini (flavonoli)

Vsebnost fenolnih spojin je odvisna od vrste rastline, kultivarja, rastišča (vsebnost hranljivih snovi v zemlji), podnebnih razmer (temperatura, svetloba, količina padavin), agrotehnoških dejavnikov in od samega načina predelave (Häkkinen in sod., 1999).

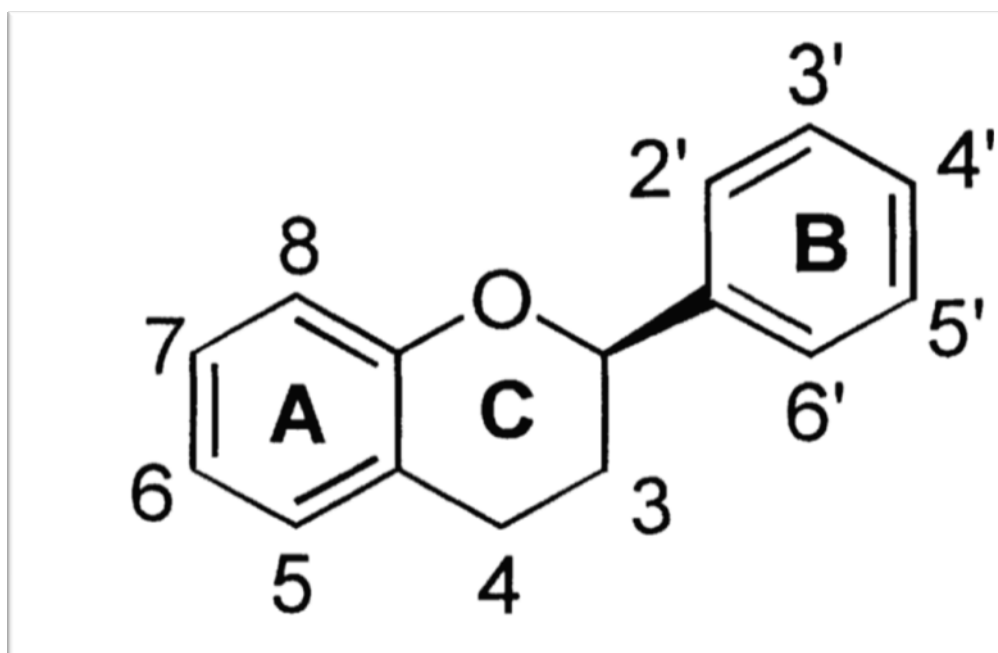
Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin je določena z njihovo kemijsko strukturo. Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin je odvisna od števila in pozicije hidroksilnih skupin ter od prisotnih drugih substituent na benzenovem obroču (Moure in sod., 2001; Robards in sod., 1999).

Fenolne spojine igrajo zelo pomembno vlogo tako v rastlinskem svetu kot tudi v prehrani ljudi. Rastlinam dajejo karakterističen vonj in okus ter farmakološke učinke (Naczk in Shahidi, 2004). Opravljajo funkcijo barvil, koencimov, protimikrobnih agensov in fitoaleksinov (spojine, ki se pojavijo v rastlinah kot odgovor na infekcije). V živilski industriji so pomembne, ker prispevajo k barvi, aromi in ostalim lastnostim določenega prehranskega izdelka (Naczk in Shahidi, 2004). So ena izmed najpomembnejših skupin antioksidantov v naši prehrani.

2.3.1 Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine zgrajene iz 15 ogljikovih atomov, ki so urejeni v $C_6C_3C_6$ strukturo. Gre za nizkomolekularne spojine, ki predstavljajo najpomembnejšo skupino fenolnih spojin (Robards in sod., 1999; Rice-Evans in sod., 1996). So zelo pomembna skupina naravnih antioksidantov, ki se pojavlja v različnem sadju, zelenjavi, listju, cvetovih rastlin, prav tako pa tudi v sokovih, čajih (predvsem belih in zelenih), vinih, kakavu, itn. (Gordon, 2003; Peterson in Dwyer, 1998). Do sedaj je poznanih že več kot 5000 različnih flavonoidov. V rastlinah so zelo razširjeni in imajo vlogo opravljanja večih funkcij. So barvni pigmenti in rastlinam dajejo rdečo, belo in brezbarvno barvo cvetov, sadežev, lubja in korenin. Poleg tega pa ščitijo rastline pred paraziti, insekti, mikrobi, stresnimi dejavniki in pred UV-žarki (Cushnie in Lamb., 2005; Abram, 2000).

V rastlinah so flavonoidi večinoma prisotni kot glikozidi. To pomeni, da imajo na eno ali več hidroksilnih skupin aglikona (nesladkorni del molekule) vezano sladkorno komponento (predvsem glukozo, galaktozo, arabinozo, ramnozo). Sladkorna komponenta je vezana na hidroksilno skupino s hemiacetatno vezjo, ki je zelo labilna. Ponavadi je sladkor vezan na C_3 , lahko pa tudi na C_5 ali C_7 atom (Robards in sod., 1999). Glikozidi so zelo pomembni, saj povečajo polarnost flavonoidni molekuli, kar pa je nujno za skladiščenje v vakuolah. Kot aglikoni, kjer gre za nesladkorni del molekule, se pojavljajo samo katehini.



Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Robards in sod., 1999)

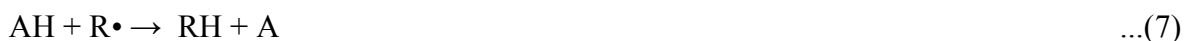
Biološka aktivnost flavonoidov je odvisna od flavonoidnega jedra, ki je sestavljen iz treh polifenolnih obročev A, B in C (slika 2). Benzenov obroč A je kondenziran s šestčlenskimi

obročem C, ki ima na 2 poziciji kot substituento vezan benzenov obroč B (Gordon, 2003; Aherne in O'Brien, 2002).

Fenolne spojine se na oksidativni stres lahko odzovejo na različne načine:

- z lovljenjem prostih radikalov
- s keliranjem kovinskih ionov (železo, baker)
- z odstranjevanjem ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul
- z inhibicijo encimov (lipoksigenaze, ciklooksidade), ki katalizirajo reakcije, pri katerih nastajajo prosti radikali (Abram, 2000; Murkovic, 2003)

Fenolne spojine lovijo proste radikale in s tem preprečujejo oksidacijo lipidov na osnovi dveh reakcij. V prvi reakciji fenolna spojina odda vodik. Ta se veže na prosti radikal maščobne kisline ($R\bullet$). To vodi v nastanek stabilnejše oblike hidroperoksida (RH) pri čemer fenolna spojina preide v obliko relativno stabilnega fenoksilnega radikala ($A\bullet$).



Pri drugi reakciji pa se prosti radikal antioksidanta veže na prosti radikal $R\bullet$, pri čemer nastane stabilna neradikalska spojina RA.



Antioksidant je učinkovit, v kolikor ga dodamo v prvi fazi oksidacije. Učinek antioksidanta je odvisen od vrste antioksidanta, koncentracije antioksidanta, sestavin živila oz. od matriksa v katerem antioksidant učinkuje in razmer med skladiščenjem (Pipan, 1990).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Propolis

Za analize smo uporabili propolis, ki izvira iz Dolenjske regije, letnik 2008. Propolis smo zamrznili in hranili do začetka analiz pri -20 °C.

3.1.2 Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* - ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani). Za poskus smo uporabili tri dni staro kulturo, ki smo jo inkubirali na petrijevih ploščah s trdnim gojiščem YEPD v inkubatorju pri 28 °C.

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 Trdno gojišče YEPD

Za precepljanje in hranjenje kulture smo uporabili trdno gojišče YEPD (preglednica 2). Gojišče smo najprej zaklejili, nato pa sterilizirali 20 minut pri temperaturi 120 °C in tlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga razlili v petrijevke.

Preglednica 2: Sestava trdnega gojišča (Atlas, 1993)

Sestavina	Masa (g)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
brezvodna glukoza (Kemika)	20,0
agar (Biolife)	20,0
dH ₂ O	do 1000 mL

3.1.3.2 Tekoče gojišče YEPD

Tekoče YEPD gojišče (preglednica 3) smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase (kultivacija na stresalniku do stacionarne faze rasti).

Preglednica 3: Sestava tekočega gojišča (Atlas, 1993)

Sestavina	Masa (g)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
brezvodna glukoza (Kemika)	20,0
dH ₂ O	do 1000 mL

3.1.4 Reagenti

- agar (Biolife)
- brezvodna glukoza (Kemika, Zagreb)
- β-karoten (Fluka, Švica)
- β-nikotinamid adenin dinukleotid dinatrijeva sol hidrat (Sigma, Nemčija)
- dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetat (Sigma, Nemčija)
- dikalijev hidrogenfosfat (Merck, Nemčija)
- dinatrijev hidrogenfosfat (Sigma, Nemčija)
- DPPH reagent (Sigma, Nemčija)
- etanol (96, Merck, Nemčija)
- fenazin metasulfat (Sigma, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, Nemčija)
- kalijev dihidrogenfosfat (V) (Kemika, Hrvaška)
- kalijev heksanocianoferrat (II) (Kemika, Hrvaška)
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija)
- kloroform (Merck, Nemčija)
- kvasni ekstrakt (Biolife)
- linolna kislina (Sigma, Nemčija)
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)
- natrijev karbonat (Alkaloid, Makedonija)

- nitro tetrazol modro (Sigma, Nemčija)
- pepton (Oxoid)
- trikloroocetna kislina (Merck, Nemčija)
- Tween 20 detergent (Sigma, Nemčija)
- železov (III) klorid (Carlo Erba Reagenti, Italija)

Za pripravo raztopin smo uporabili bidestilirano vodo.

3.1.5 Pribor in oprema

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- brezprašna komora PIO SMBC 122 (Iskra, Slovenija)
- centrifuge (Eppendorf 5415C, Tehnica Železniki Centric 322A)
- čitalec mikrotiterskih plošč Safire II (Tecan, Švica)
- 2 mL plastične centrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- hladilnik (LTH Škofja Loka)
- 1 mL plastične centrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- inkubator (Sutjeska)
- ladvice za tehtanje
- magnetno mešalo 550 M (Tehnica Železniki, Slovenija)
- mikroskop (Leica ATC 200)
- merilni valji
- petrijeve plošče (Golias)
- pH-meter (Mettler Toledo, Švica)
- rotacijski stresalnik (Mrzel)
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica)
- spektrofotometer (Hewlett- Packard 8453, Združene države Amerike)
- spektrofotometer za merjenje optične gostote MA 9520 (Iskra, Slovenija)
- 96- mestne mikrotiterske ploščice za merjenje fluorescence (Nunc)

- tehtnica AT201 (Mettler Toledo, Švica)
- tehtnica (Sartorius analytic)
- 1000-mL erlenmajerice s stransko kiveto (Shott Duran)
- ultrazvočna kopel (Bandelin, Nemčija)
- zmrzovalnik (-20 °C) (LTH Škofja Loka)
- žličke za tehtanje

3.2 METODE DELA

3.2.1 Homogenizacija propolisa

Pred samim postopkom ekstrakcije smo propolis, ki je bil predhodno hranjen pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, homogenizirali. To smo naredili s trenjem v terilnici, dokler nismo dobili finega prahu, ki smo uporabili v nadaljevanju analize.

3.2.2 Ekstrakcija fenolnih spojin propolisa

Metoda ekstrakcije je bila povzeta po proceduri, ki so jo opisali Prytzyk in sod. (2003) in Salomao in sod (2003). Razmere ekstrakcije so bili sledeči:

- 24 h in 4 h ekstrakcija ob stalnem stresanju pri sobni temperaturi
- ekstrahiranje z dvema različnima topiloma: zmes etanol/voda (70:30 v/v), s katerim pripravimo t.i. 70 % EIP in zmes etanol/voda (96:4 v/v), s katerim pripravimo t.i. 96 % EIP
- dodatek ustreznega ekstrakcijskega topila k propolisu v razmerju 1:10 (5 g propolisa smo dodali 50 mL topila)

Postopek 24 h ekstrakcije smo izvedli tako, da smo v vsako od štirih erlenmajeric zatehtali 5 g propolisa in dodali 50 mL topila. Dva vzorca smo ekstrahirali z zmesjo etanol/voda (70:30 v/v), dva z zmesjo etanol/voda (96:4 v/v). Ekstrakcijo smo izvedli pri sobni temperaturi ob stresanju na stresalniku pri hitrosti 140 m/s. Po treh urah smo topilo odstranili s filtriranjem skozi filter papir. K propolisu smo dodali 50 mL svežega topila in dali ponovno ekstrahirati za 3 h. Postopek smo ponovili še dvakrat, kjer smo oba filtrata združili s prvim. Sledila je evaporacija pri temperaturi $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suhi preostanek po končanem odparevanju ekstrakcijskega topila, smo raztopili v 12 mL 96 % etanola. Sledilo je centrifugiranje (centrifuga z nihajočim rotorjem model Centric 322 B) za 25 minut pri 4000 obr/min. Supernatant, ki smo ga dobili po končanem centrifugiranju pa smo še dodatno prečistili s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi (SPE).

Pri 4 h ekstrakciji je celoten postopek potekal po istem principu, kot je opisano za 24 h ekstrakcijo, le da smo v tem primeru zamenjali topilo s svežim na vsako uro.

3.2.3 Čiščenje etanolnih izvlečkov propolisa z uporabo ekstrakcije na trdni fazi (SPE)

Ekstrakcijo smo izvedli s pomočjo kolone Strata-X. Za boljšo vezavo merjene komponente je bilo najprej potrebno aktivirati kolono. Kolono smo aktivirali z 2 mL metanola. Za tem smo skozi kolono spustili 2 mL pufra amonijevega formiata in s tem uravnotežili kolono. Sledil je nanos $500\text{ }\mu\text{L}$ vzorca EIP. Nezaželene komponente smo iz kolone odstranili s spiranjem z 2 mL 15 % metanola. Temu je sledilo sušenje polnila z

vakuomom približno 3 minute. V zadnji fazi smo opravili elucijo analita, kjer smo analit sprali z 1 mL 96 % etanola. Pridobljeni eluat smo še prefiltrirali skozi 0,22 µm najlonski filter.

Izkazalo se je, da med etanolnimi izvlečki propolisa v vsebnosti fenolnih spojin glede na čas ekstrakcije ni bistvenih razlik. To je bil tudi razlog, zakaj smo se odločili za združitev izvlečka 24 h ekstrakcije z izvlečkom 4 h ekstrakcije. Tako pripravljena vzorca: 70 % EIP in 96 % EIP, smo za nadaljne analize hranili pri -20 °C.

3.2.4 Določanje skupnih fenolnih spojin v izvlečkih propolisa

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). Postopek je potekal tako, da smo v 1 mL plastične centrifugirke odpipetirali reagente v sledečem zaporedju:

- 0,20 mL raztopine ustrezno razredčenega izvlečka
- 0,125 mL F-C reagenta (predhodno razredčenega z bidestilirano vodo v razmerju 1:2)
- 0,125 mL Na₂CO₃ (20 g Na₂CO₃ smo raztopili v 100 mL bidestilirane vode)
- 0,55 mL bidestilirane vode.

Celoten volumen mešanice je v epici znašal 1 mL.

Po 30 minutah smo izmerili absorbanco pri 765 nm (A_{765}).

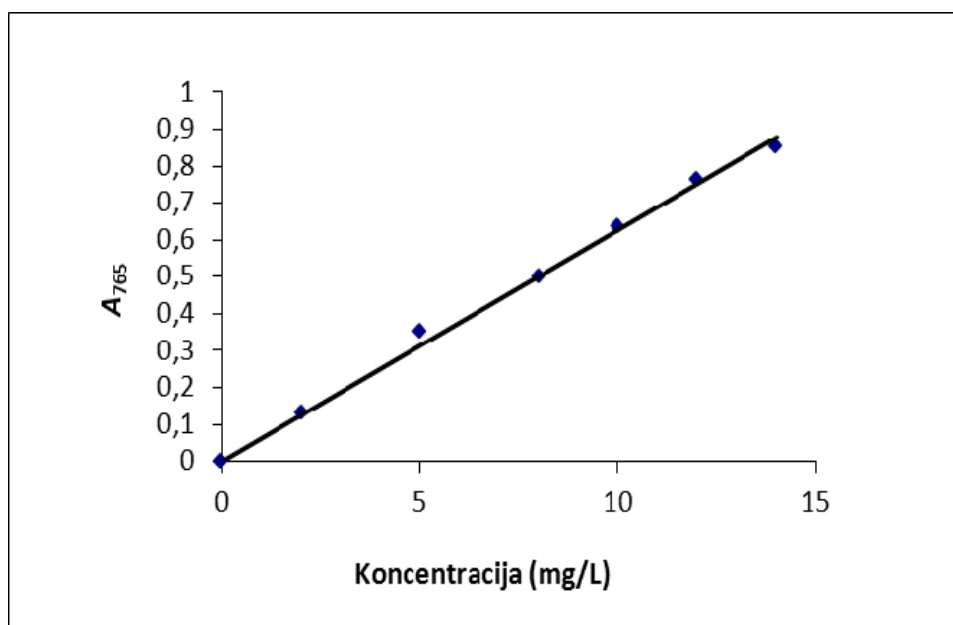
Slepi vzorec smo pripravili na isti način, le da smo namesto 0,2 mL EIP dodali enako količino bidestilirane vode. Meritve so bile opravljene v treh paralelkah.

Za umeritveno krivuljo smo uporabili klorogensko kislino. Za pripravo umeritvene krivulje je bilo potrebno najprej pripraviti standardno raztopino klorogenske kisline (KK). To smo naredili tako, da smo 4 mg KK raztopili v 10 mL 96 % etanola. Ustrezen volumen tako pripravljene raztopine KK, katere masna koncentracija je znašala 0,4 mg/mL, smo odpipetirali v epice, ter dodali 125 µL reagenta F-C, 125 µL Na₂CO₃, dopolnili z bidestilirano vodo do 0,20 mL in po 30 minutah izmerili absorbanco pri 765 nm proti slepemu vzorcu. Tudi tu so bile meritve narejene v treh paralelkah.

Preglednica 4: Vrednosti za masno koncentracijo klorogenske kisline (γ_{KK}) v epici in povprečne vrednosti za absorbanco (\bar{A}_{765})

γ_{KK} (mg/L)	\bar{A}_{765}
2	0,131
5	0,351
8	0,498
10	0,635
12	0,762
14	0,853
15	0,891

Iz izmerjenih absorbanc pri ustreznih masnih koncentracijah KK smo narisali umeritveno krivuljo (premica), ki je prikazana na sliki 3. Z linearno regresijo smo določili koeficient premice. Vrednost koeficienta k je znašala $0,0627 \text{ (mg/L)}^{-1}$.



Slika 3: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino

Masno koncentracijo fenolnih spojin v epici in izvlečkih propolisa smo izračunali s pomočjo enačb 9 in 10:

$$Y_{v\ epici} = \frac{A_{765}}{k} \quad \dots(9)$$

$$Y_{izvl} = \frac{Y_{v\ epici}}{V_{epice}} \times V_{pip} \quad \dots(10)$$

kjer je:

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

k – naklon premice oz. umeritvene krivulje s klorogensko kislino,

V_{epice} – volumen reakcijske zmesi v epici - 0,20 mL

V_{pip} - volumen odpipetiranega izvlečka.

Vsebnost fenolnih spojin v propolisu smo izrazili v mg klorogenske kisline na gram propolisa (mg_{KK}/g propolisa), ki smo jo izračunali iz koncentracije skupnih fenolnih spojin v izvlečku in mase zatehtanega propolisa.

3.2.5 Preverjanje antioksidativnega delovanja izvlečkov propolisa *in vitro*

3.2.5.1 Sposobnost redukcije

Metoda temelji na redukciji železovih (III) ionov (Fe^{3+}) do železovih (II) ionov (Fe^{2+}) ob prisotnosti antioksidanta v preiskovanem vzorcu, kar zasledujemo spektrofotometrično (Juntachote in sod., 2006; Moreira in sod., 2008).

Sposobnost redukcije smo povzeli po metodi, ki so jo opisali Juntachote in sodelavci (2006). Postopek dodajanja reagentov je potekal po sledečem načinu:

- v plastične epruvete smo odpipetirali 0,5 mL raztopine EIP
- 2,5 mL fosfatnefa pufru (pH= 6,8)
- 2,5 mL 1 % raztopine kalijevega heksanocianoferata (II)
- 2,5 mL 20 % raztopino trikloroocetne kisline

Vse skupaj smo dobro premešali in odpipetirali 2 mL mešanice v plastične epice, centrifugirali v Eppendorfovi centrifugi 5415c za 10 minut pri 1300 obr/min. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali 1,5 mL supernatanta, dodali 2,5 mL bidestilirane vode, 1 mL 1 % raztopine železovega (III) klorida, dobro premešali ter po 25 minutah izmerili absorbanco proti slepemu vzorcu (96 % etanol) pri 740 nm (A_{740}). Vsako meritev smo

opravili v treh pararelkah. Za primerjavo smo opravili meritve s komercialno dostopnim flavonoidom kvercetinom.

3.2.5.2 Metoda z radikalom DPPH•

Sposobnost za lovljenje prostih radikalov smo določili s pomočjo DPPH• metode. Metoda temelji na spektrofotometričnem sledenju izginjanja barve stabilnega prostega radikala 2,2-difenil-1-pikril-hidrazila (DPPH•), ki absorbira svetlobo pri 517 nm. DPPH• radikal v reakciji z antioksidativno komponento preide v neobarvano spojino, kar se tudi vidi v spremembi barve raztopine iz močno vijolične v blede rumeno in zmanjšanju absorbance (Prior in sod., 2005). Sam postopek je povzet po metodi, ki so jo opisali Brand-Williams in sodelavci (1995). Najprej smo pripravili etanolno raztopino DPPH• in sicer tako, da smo 1,97 mg DPPH• raztopili v 50 mL 96 % etanola in dali za 5 minut na ultrazvočno kopel. Naprej smo postopali tako, da smo odpipetirali 2,9 mL sveže pripravljene raztopine DPPH• in dodajali 0,1 mL raztopine EIP. Po 30 minutah smo merili absorbanco pri 517 nm (A_{517}) proti slepemu vzorcu (96 % etanol). Izmerili pa smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca, pri katerem smo k 2,9 mL raztopine DPPH• namesto 0,1 mL raztopine EIP dodali 96 % etanol.

3.2.5.3 Beljenje β -karotena

Določanje antioksidativne učinkovitosti z β -karotenom je bilo v skladu s postopkom, ki so ga opisali Moure in sodelavci (2000). Metoda je potekala tako, da smo v bučko zmešali 2 mL kloroformne raztopine β -karotena, 40 μ L linolne kisline, 400 μ L detergenta Tween 20, dobro premešali in dali na rotavapor odpareti topilo.

K preostanku, ki smo ga dobili po odparevanju, smo počasi dodajali 100 mL bidestilirane vode nasičene s kisikom in vse skupaj stresali dobrih pet minut. Dobili smo rumeno-oranžno emulzijo, ki smo jo razporedili po 5 mL v epruvete ter dodali 0,2 mL raztopine EIP. Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici je bila 0,05 mg/mL. Pripravili smo tudi kontrolni vzorec, ki je namesto raztopin EIP vseboval isto količino 96 % etanola. Poleg tega smo za primerjavo pripravili emulzijo, ki je vsebovala komercialno dostopni kvercetin.

Za tem smo pripravljene vzorce emulzije dali na vodno kopel pri 50 °C za 120 minut ter na vsakih 20 minut merili absorbanco pri 470 nm (A_{470}) proti slepemu vzorcu. Slepni vzorec je tako kot predhodno omenjena emulzija vseboval vse reagente razen β -karotena. Vsako meritev smo opravili v dveh ponovitvah.

3.2.5.4 Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala

Sposobnost lovljenja superoksidnega aniona temelji na spektrofotometrični metodi, ki sta jo opisala Roback in Gryglewski (1988) z majhnimi modifikacijami. Superoksidni anionski radikali se generirajo v PMS-NADH sistemih in povzročijo redukcijo reagenta NBT,

katerega reducirano obliko določamo spektrofotometrično pri 570 nm (Gülcin 2006). Reagente, ki smo jih uporabili pri sami metodi so bili pripravljene v 0,1 M fosfatnem pufru (pH = 7,4). Sam postopek je potekal tako, da smo v plastične epruvete odpipetirali:

- 0,5 mL raztopine EIP (za kontrolo 0,5 mL 96 % etanola) različnih koncentracij
- 0,5 mL NBT reagenta
- 0,5 mL NADH reagenta
- 0,5 mL PMS reagenta

Vse skupaj smo dobro premešali in po 5 minutah od dodatka reagenta PMS izmerili absorbanco pri 560 nm (A_{560}) proti slepemu vzorcu, ki je vseboval 0,5 mL fosfatnega pufru in vse našteje reagente razen PMS.

Vse meritve so bile opravljene v dveh ponovitvah.

3.2.6 Preverjanje antioksidativnega delovanja izvlečkov propolisa *in vivo*

3.2.6.1 Kultivacija kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*

3 dni staro kulturo kvasovk vrste *S. cerevisiae* smo iz trdnega gojišča YEPD precepili v 400 mL tekočega gojišča YEPD v 1000-mL erlenmajericah s stransko kiveto do optične gostote (OD_{650}) 0,3. Sledila je kultivacija kvasovk na stresalniku pri 28 °C in 220 obr/min. do začetka stacionarne faze rasti, kjer smo 100 mL brozge centrifugirali 3 minute pri 4000 obr/min, odstranili supernatant ter sediment 1x sprali s kalijevim fosfatnim pufrom (pH = 7,0). Celice smo nato resuspendirali v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0) do koncentracije $1 \cdot 10^8$ celic/mL.

Suspenziji celic (20 mL) smo dodali določen volumen 70 % izvlečka propolisa, tako da smo dosegli koncentracije fenolnih spojin v suspenziji (0,01; 0,03; 0,05; 0,25 mg/mL) in pa kvercetin s koncentracijo fenolnih spojin 0,05 mg/mL.

Po 1-h izpostavitvi celic izvlečku propolisa pri različnih koncentracijah fenolnih spojin in kvercetina pri koncentraciji 0,05 mg/mL pri 28 °C in 220 obr/min smo preverili njihovo antioksidativno delovanje v celici, in sicer z merjenjem znotrajcelične oksidacije.

3.2.6.2 Določanje znotrajcelične oksidacije

Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* smo ocenili z uporabo barvila diklorofluorescein (H_2DCF). Spojina, ki jo dodamo v obliki diacetata (H_2DCFDA), prehaja v celico s pasivnim transportom, kjer se deacetilira do H_2DCF s pomočjo nespecifičnih esteraz. V tej obliki se barvilo zadržuje v celici in se v prisotnosti oksidantov oksidira do fluorescentne oblike (DCF). Nastanek fluorescentne oblike barvila je indikator znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997).

V 2-mL Eppendorf centrifugirko smo prenesli 2 ml celične suspenzije in centrifugirali 5 minut pri 14000 obr./min. Po odstranitvi supernatanta smo sediment 2x sprali s kalijevim fosfatnim pufrom (pH= 7,8). Sedimentu smo nato dodali 990 μL kalijevega fosfatnega pufra (pH= 7,8) ter inkubirali 5 minut pri 28 $^{\circ}\text{C}$. Po končani inkubaciji smo dodali 10 μL 1 mM raztopine sveže pripravljene H_2DCFDA . Centrifugirke smo prenesli na stresalnik in inkubirali v temi 15 min pri $T = 28^{\circ}\text{C}$. Sledil je prenos vzorcev suspenzije (200 μL) v mikrotitersko ploščico in merjenje fluorescence na čitalcu mikrotiterskih plošč Safire II. Valovna dolžina vzbujanja je bila 488 nm, emisije pa 520 nm.

3.2.7 Statistična obdelava

Povprečna vrednost

Rezultate meritev smo podali kot povprečne vrednosti vseh meritev znotraj določene metode, v skladu z enačbo (11) (Košmelj, 2001).

$$\bar{x} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right) \quad \dots(11)$$

kjer je:

n – število vzorcev,

x_i – vrednosti i -te meritve.

Standardni odklon

Za oceno variabilnosti rezultatov smo uporabili standardni odklon (SD), ki smo ga izračunali s pomočjo enačbe (12) (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \dots(12)$$

kjer je:

x_i – vrednosti i -te meritve,

n – število vzorcev,

\bar{x} – povprečna vrednost.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 SKUPNE FENOLNE SPOJINE

Iz homogeniziranega propolisa, ki izvira iz Dolenjske regije, smo z metodo solventne ekstrakcije pripravili izvlečke fenolnih spojin. Želeli smo ugotoviti kako izbira topila (polarnost) vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin v izvlečkih propolisa. S tem namenom smo za ekstrakcijo uporabili dve različni ekstrakcijski topila: zmes etanol/voda (70:30 v/v) in pripravili t.i. 70 % EIP in zmes etanol/voda (96:4 v/v) in pripravili t.i. 96 % EIP. Izvlečka, ki smo ju pripravili z ekstrakcijo z omenjenima topiloma, smo še dodatno prečistili s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi (SPE).

V izvlečkih propolisa smo določili skupne fenolne spojine spektrofotometrično s Folin-Ciocalteu reagentom. Točna sestava reagenta ni znana, je pa sprejeto, da vsebuje fosfomolibdenski/fosfovolframov kislinski kompleks. Metoda temelji na prenosu elektronov iz fenolnih komponent in ostalih reduciranih zvrsti na molibden v alkalnem mediju, pri čemer nastane modro obarvan kompleks, ki absorbira svetlobo pri 765 nm (Magalhaes in sod., 2008). Izmerjena absorbanca je premosorazmerna s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili s pomočjo klorogenske kisline. Vsebnost fenolnih spojin smo izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline.

V preglednici 5 so podane vrednosti za A_{765} za 70 % EIP in za 96 % EIP po čiščenju s SPE.

Preglednica 5: Vrednosti za A_{765} za 70 % etanolni izvleček in za 96 % etanolni izvleček propolisa po čiščenju s SPE

Izvlečki propolisa	A_{765} (par. 1)	A_{765} (par. 2)	A_{765} (par. 3)	$\bar{A}_{765} \pm SD$
70 % EIP	0,404	0,400	0,405	$0,403 \pm 0,002$
	0,422	0,423	0,423	$0,422 \pm 0,0006$
	0,427	0,440	0,433	$0,434 \pm 0,005$
96 % EIP	0,309	0,313	0,311	$0,311 \pm 0,002$
	0,405	0,403	0,407	$0,405 \pm 0,003$
	0,381	0,388	0,377	$0,382 \pm 0,008$

V preglednici 6 so podane vrednosti za koncentracijo fenolnih spojin v izvlečkih po čiščenju s SPE. Te vrednosti smo izračunali iz vrednosti za \bar{A}_{765} , ki so podane v preglednici 5, s pomočjo enačb 9 in 10, ter izrazili kot masa klorogenske kisline na mL raztopine izvlečka. Učinek ekstrakcije smo podali kot dobit, ki je izražena kot vsebnost fenolnih spojin (masa klorogenske kisline v mg) na g propolisa. Da bi pokazali vpliv SPE na dobit ekstrakcije, smo za primerjavo v preglednici 6 podali vrednosti za vsebnost fenolnih spojin

v propolisu, ki smo jo določili, ne da bi izvedli čiščenje s SPE in vrednosti za vsebnost fenolnih spojin v propolisu, ki smo jo določili po čiščenju s SPE.

Preglednica 6: Vsebnosti fenolnih spojin v propolisu določena brez izvedbe čiščenja s SPE in po čiščenju s SPE, ki je podana kot masa klorogenske kisline na g propolisa (mg/g) ter koncentracija fenolnih spojin v izvlečkih propolisa po čiščenju s SPE, ki je podana kot masa klorogenske kisline na mL raztopine izvlečka (γ) (mg/mL)

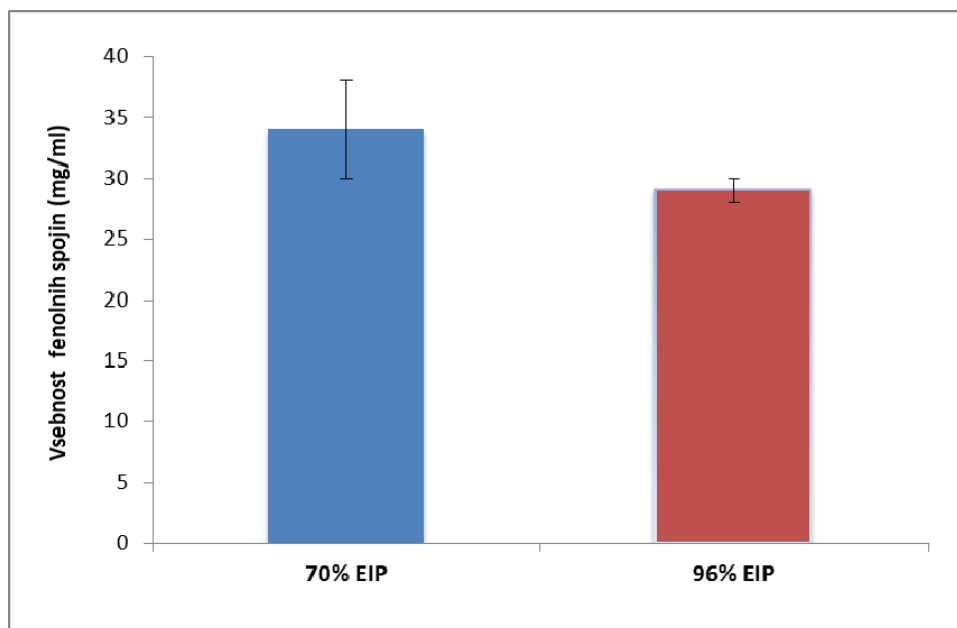
Izvečki propolisa	Vsebnost fenolnih spojin (brez SPE) (mg/g)	Vsebnost fenolnih spojin (čiščenje s SPE) (mg/g)	γ (čiščenje s SPE) (mg/mL)
70 % EIP Paralelka 1	281,4	154,3	32,1
Paralelka 2	278,0	161,7	33,7
Paralelka 3	323,4	165,9	34,6
<i>Povprečna vrednost \pm SD</i>	<i>294 \pm 26</i>	<i>161 \pm 6</i>	<i>34 \pm 1</i>
96 % EIP Paralelka 1	258,9	119,1	24,8
Paralelka 2	246,9	154,9	32,3
Paralelka 3	281,8	146,2	30,5
<i>Povprečna vrednost \pm SD</i>	<i>263 \pm 18</i>	<i>140 \pm 19</i>	<i>29 \pm 4</i>

SPE je tehnika, ki se pogosto uporablja za čiščenje vzorca, v katerem imamo kasneje namen določiti posamezne komponente s pomočjo kromatografskih tehnik ali kake druge analize metode. Pri SPE separacijskem postopku vzorec prefiltriramo skozi trdno fazo, ki zadrži raztopljene snovi, ki so zaželeni in jih kasneje eluiramo z majhnim volumnom ustreznega topila (Supelco, 1998). Vsebnost fenolnih spojin, ki smo jo določili ne da bi izvedli čiščenje izvlečka s SPE in izrazili na gram propolisa, je (294 ± 26) mg/g za primer ekstrakcije z zmesjo etanol/voda (70:30 v/v) in (263 ± 18) mg/g za ekstrakcijo z zmesjo etanol/voda (96:4 v/v). Kot je prikazano v preglednici 6, je ta vrednost nekoliko višja od vsebnosti fenolnih spojin, ki smo jo določili ob izvedbi čiščenja s SPE, kjer omenjena vsebnost za primer ekstrakcije z zmesjo etanol/voda (70:30 v/v) znaša (161 ± 6) mg/g in (140 ± 19) mg/g za ekstrakcijo z zmesjo etanol/voda (96:4 v/v) 70 %.

Folin-Ciocalteu je sicer pogosto uporabljena vendar nespecifična metoda, s katero določimo vsebnost skupnih fenolnih spojin. Na analizo in s tem tudi na verodostojnost rezultata lahko vplivajo različne reducirajoče substance, ki so poleg fenolnih spojin prisotne v izvlečku. To so reducirajoči sladkorji, nekatere aminokisliline, organske kisline ter drugi reducenti (Prior in sod., 2005). Ker te substance naj nebi vzpostavile interakcij na trdni fazi pri SPE čiščenju, jih v eluatu ni. To je eden izmed možnih razlogov, zakaj je rezultat ob čiščenju s SPE tolikokrat nižji od rezultata, ki ga dobimo, ne da bi izvedli

čiščenje s SPE. Rezultati analiz v nadaljevanju naloge se nanašajo na izvlečke po čiščenju s SPE.

Pri ekstrakciji z zmesjo etanol/voda (70:30 v/v) smo v izvlečkih propolisa dobili nekoliko višjo vsebnost fenolnih spojin kot v izvlečkih propolisa, ki smo jih pridobili s topilom zmes etanol/voda (96:30 v/v), vendar se vrednosti med seboj v okviru napake določitve signifikantno nista razlikovali, kar je tudi razvidno iz preglednice 6 in slike 4 .



Slika 4: Koncentracija fenolnih spojin v izvlečkih propolisa (mg/mL)

Tako je koncentracija skupnih fenolnih spojin v 70 % EIP znašala (34 ± 1) mg/mL, v 96 % EIP pa (29 ± 4) mg/mL. Topnost fenolnih spojin v ekstrakcijskem topilu je odvisna od strukture, stopnje polimerizacije, interakcij z drugimi sestavinami ter od polarnosti topila. Vse to lahko doprinese k slabši topnosti oz. težji ekstrakciji fenolnih spojin v določenem topilu. Ker vemo, da se »podobno topi v podobnem«, bodo v manj polarno topilo iz substrata prešle manj polarne snovi in obratno, v topilu z višjo polarnostjo bodo prevladovale bolj polarne snovi.

Pričakovali smo, da bodo razlike v vsebnostih skupnih fenolnih spojin med 70 % EIP in pa 96 % EIP nekoliko večje, in da se bo pokazal večji vpliv izbire ekstrakcijskega topila na vsebnost celokupnih fenolnih spojin v izvlečku, vendar glede na zgoraj dobljene rezultate lahko sklepamo, da razlika v polarnosti izbranih topil le deloma vpliva na vsebnost celokupnih fenolnih spojin v izvlečku. Vpliv polarnosti topila na dobiti ekstrakcije so potrdili v različnih študijah. Tako Suja in sodelavci (2006) navajajo, da na vsebnost ekstrahiranih fenolov vpliva polarnost topila, saj so v svoji raziskavi, ki so jo opravili na ekstraktih sezamovih pogač, pri ekstrakciji z bolj polarnim topilom dosegli večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin.

Glede na to, da je bilo narejenih kar nekaj študij na propolisu iz drugih geografskih področij, smo prav tako želeli narediti primerjavo v vsebnosti celokupnih fenolnih spojin med našimi izvlečki in tistimi zbranimi iz drugih geografskih področij. Številni avtorji kot so Russo in sodelavci (2004), Mendes da Silva in sodelavci (2006) ter Gomez–Caravaca in sodelavci (2006) navajajo, da na vsebnost celokupnih fenolnih spojin ne vplivajo samo vrsta čebel, sezona obiranja smol, pač pa predvsem geografsko in botanično poreklo propolisa. To so dokazali tudi Kumazawa in sodelavci (2004), ki so naredili širšo raziskavo na tem področju, saj je raziskava zajemala propolis zbran iz 14 različnih geografskih območij. V preglednici 7 so prikazane vsebnosti skupnih fenolnih spojin, ki so jih določili v omenjeni raziskavi. Na tem mestu je potrebno omeniti to, da so v omenjeni raziskavi za standard vzeli galno kislino, medtem ko smo mi vsebnost celokupnih fenolnih kislin izrazili v ekvivalentih klorogenske kisline. Da bi bila primerjava smiselna, smo vrednosti, ki so jih v svoji raziskavi podali Kumazawa in sodelavci (2004), ustrezno preračunali in v preglednici 7 izrazili v ekvivalentih klorogenske kisline. Kot lahko vidimo, so v kitajskem in avstralskem propolisu ter v propolisu, ki izvira iz ZDA določili največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin, ta vrednost je znašala med 396 - 463 mg/g. Najnižjo vsebnost so določili v propolisu s Tajske (48 ± 11) mg/g. V objavi omenjene raziskave ne omenjajo čiščenja s SPE. Zato menimo, da je bolj smiselno primerjati vrednosti iz preglednice 7 z rezultati določitve skupnih fenolnih spojin v naši raziskavi, ki smo jo opravili na propolisu, ne da bi izvedli SPE izvlečka (preglednica 6). Vsebnost celokupnih fenolnih spojin v slovenskem propolisu je primerljiva z vsebnostjo fenolnih spojin v propolisu iz večine držav, ki so ga raziskali Kumazawa in sodelavci (2004).

Preglednica 7: Vsebnost fenolnih spojin v propolisu (mg klorogenske kisline/g propolisa) glede na geografsko področje (Kumazawa in sod., 2004)

Geografsko področje	Vsebnosti fenolnih spojin (mg/g)
Argentina	328 ± 14
Avstralija	416 ± 25
Brazilija	186 ± 9
Bolgaria	341 ± 4
Čile	325 ± 17
Kitajska	463 ± 14
Madžarska	375 ± 0,3
Nova Zelandija	367 ± 9
Severna Afrika	154 ± 7
Tajska	48 ± 11
Ukrajina	348 ± 12
Urugvaj	290 ± 13
ZDA	396 ± 24
Uzbekistan	269 ± 10

4.2 PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI IZVLEČKOV PROPOLISA *IN VITRO*

Da bi dobili celovito sliko o antoksidativni učinkovitosti izvlečkov propolisa, smo izvedli štiri metode določitve, ki zajamejo različne reakcijske mehanizme antioksidativnega učinkovanja fenolnih spojin.

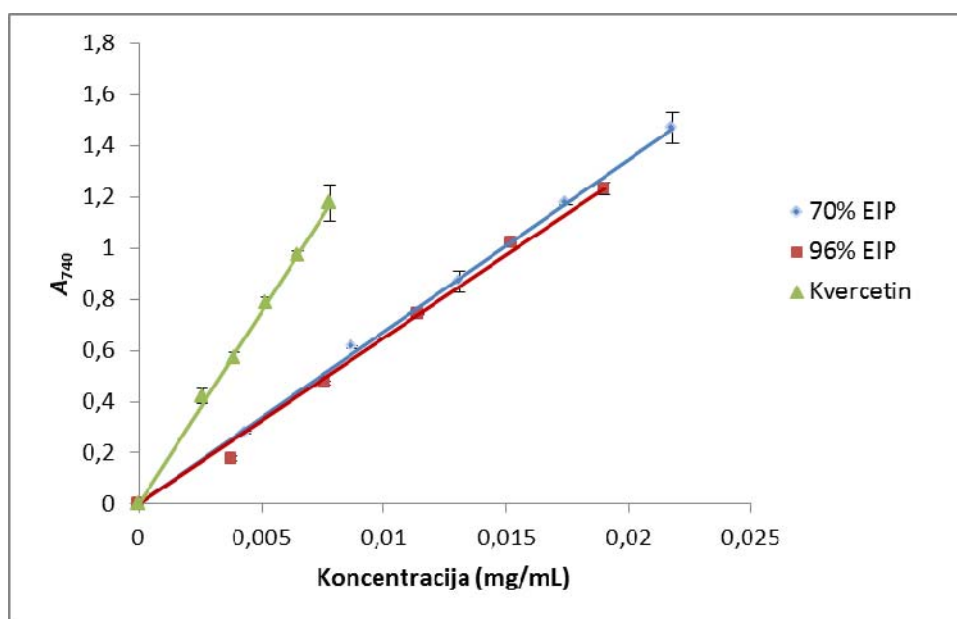
4.2.1 Sposobnost redukcije

Redukcijska sposobnost določene spojine je specifičen pokazatelj njene potencialne antioksidativne učinkovitosti. Izkazalo se je, da prisotnost reducentov, v našem primeru antioksidantov, ki jih vsebujejo izvlečki propolisa, povzroči pri omenjeni metodi v preiskovanih vzorcih redukcijo Fe^{3+} v Fe^{2+} . Vsebnost nastalega iona Fe^{2+} smo določili z merjenjem absorbance pri 740 nm. Prisotnost reducenta v reakcijski zmesi zviša vrednost A_{740} . To smo lahko spremljali tudi vizuelno kot spreminjanje barve reakcijske zmesi iz rumene v različne odtenke zeleno-modre. Izmerjene vrednosti za A_{740} in pa povprečna vrednost absorbanc pri preiskovanih koncentracija antioksidantov so podane v preglednici številka 8.

Preglednica 8: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina v reakcijski zmesi (γ) in vrednosti izmerjene absorbance (A_{740})

Izvečki propolisa	γ (mg/mL)	A_{740} (par.1)	A_{740} (par. 2)	$\bar{A}_{740} \pm SD$
70 % EIP	0,0044	0,280	0,277	$0,279 \pm 0,002$
	0,0087	0,613	0,616	$0,615 \pm 0,002$
	0,0131	0,870	0,899	$0,884 \pm 0,02$
	0,0174	1,178	1,174	$1,176 \pm 0,002$
	0,0218	1,470	1,512	$1,491 \pm 0,02$
96 % EIP	0,0038	0,178	0,170	$0,174 \pm 0,004$
	0,0076	0,473	0,468	$0,470 \pm 0,003$
	0,0114	0,742	0,745	$0,743 \pm 0,001$
	0,0152	1,020	1,010	$1,016 \pm 0,005$
	0,0190	1,233	1,216	$1,224 \pm 0,009$
Kvercetin	0,0026	0,441	0,399	$0,421 \pm 0,02$
	0,0039	0,588	0,560	$0,574 \pm 0,01$
	0,0052	0,803	0,774	$0,789 \pm 0,02$
	0,0065	0,962	0,986	$0,974 \pm 0,02$
	0,0078	1,126	1,226	$1,176 \pm 0,07$

Pri tej metodi smo zasledovali odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin EIP in kvercetina v reakcijski zmesi. Iz slike 5, kjer je omenjena odvisnost prikazana, je razvidno, da A_{740} linerano narašča s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi.



Slika 5: Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi

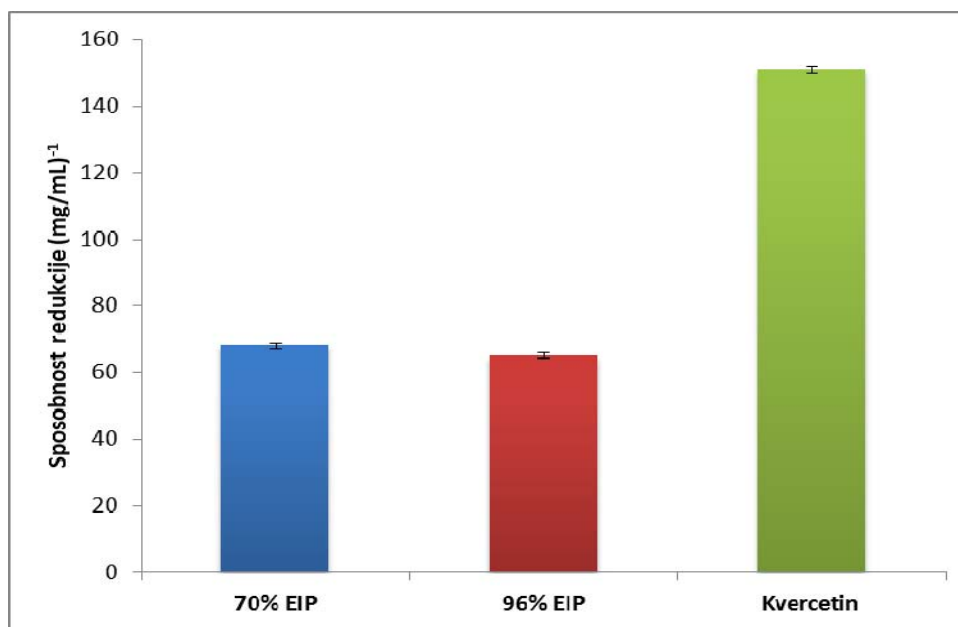
Redukcijsko sposobnost preiskovanih izvlečkov in kvercetina smo kvantitativno ovrednotili kot naklone premic prikazanih na sliki 5. Naklone premic smo določili z metodo linearne regresije. Vrednosti omenjenih naklonov, oziroma sposobnost redukcije so podane v preglednici 9.

Preglednica 9: Sposobnost redukcije izvlečkov propolisa in kvercetina

Izvečki propolisa	Sposobnost redukcije (mg/mL) ⁻¹ (par. 1)	Sposobnost redukcije (mg/mL) ⁻¹ (par. 2)	Sposobnost redukcije ± SD (mg/mL) ⁻¹ povp. vr.
70 % EIP	67,5	68,7	68 ± 1
96 % EIP	65,1	64,4	65 ± 1
Kvercetin	148,6	152,4	151 ± 1

Iz slike 6 lahko opazimo, da je imel kvercetin v primerjavi s preiskovanima izvlečkoma daleč najvišjo vrednost naklona premice, se pravi največjo redukcijsko sposobnost, ki znaša $(151 \pm 1) \text{ (mg/mL)}^{-1}$. Za izvlečka propolisa lahko opazimo, da je 70 % EIP pokazal nekoliko višjo redukcijsko sposobnost, ki je znašala $(68 \pm 1) \text{ (mg/mL)}^{-1}$ kot 96 % EIP s sposobnostjo redukcije $(65 \pm 1) \text{ (mg/mL)}^{-1}$. Na sestavo izvlečka in posledično na njegovo antioksidativno učinkovitost vpliva izbira ekstrakcijskega topila. To pomeni, da z zmesjo

etanol/voda (70:30 v/v) iz propolisa ekstrahiramo tiste fenolne spojine, ki so bolj uspešne pri redukciji ustreznega substrata, kot pa fenolne spojine v izvlečkih propolisa, ki smo jih pridobili z zmesjo etanol/voda (96:30 v/v).



Slika 6: Sposobnost redukcije izvlečkov propolisa in kvercetina

4.2.2 Metoda z radikalom DPPH•

Ena izmed metod, ki smo jo prav tako uporabili za določanje antioksidativne učinkovitosti izvlečkov in kvercetina je tudi metoda, ki temelji na reakciji stabilnega radikala (DPPH•) z antioksidanti. Izkazalo se je, da so preiskovani antioksidanti pokazali sposobnost za lovljenje prostega radikala, saj so uspešno vstopali v reakcijo z radikalom DPPH•. To smo zasledovali spektrofotometrično kot znižanje A_{517} . Pri interpretaciji rezultatov sta pomembna dva parametra: delež preostalega (ki ni reagiral z antioksidantom) radikala DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije in parameter $ED_{50\%}$.

Delež preostalega radikala DPPH• smo izračunali po enačbi:

$$\text{delež preostalega DPPH} \bullet = \frac{A_{vz 517} - A_{sl 517}}{A_{K 517}} \times 100\% \quad \dots(13)$$

kjer je:

$A_{vz 517}$ - absorbanca vzorca,

$A_{sl 517}$ - absorbanca slepega vzorca,

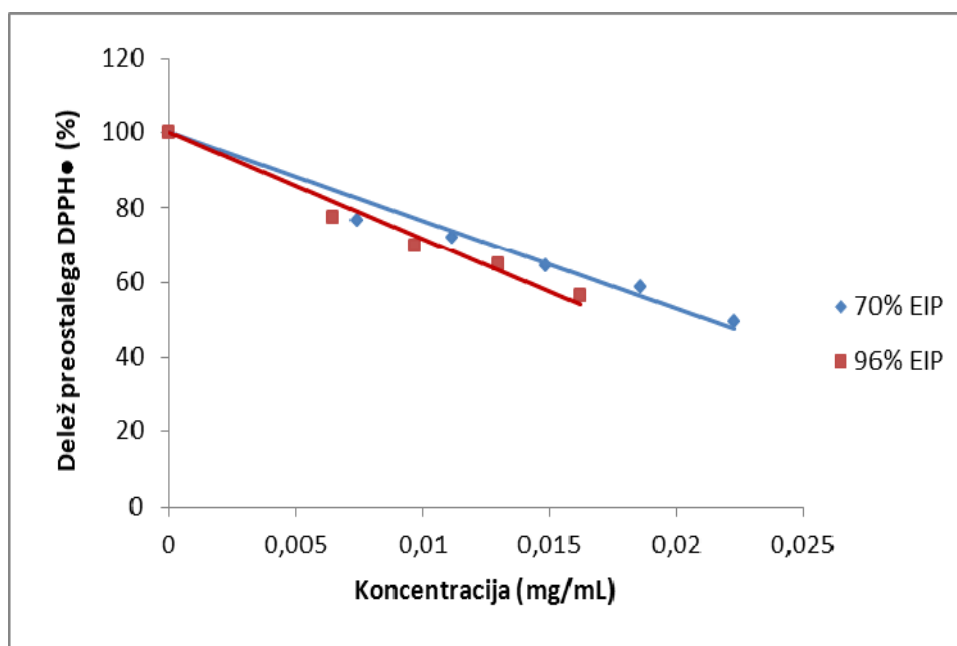
A_{k517} - absorbanca kontrole.

Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina, pri kateri smo določali A_{517} ter deleži preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije so podane v preglednici 10.

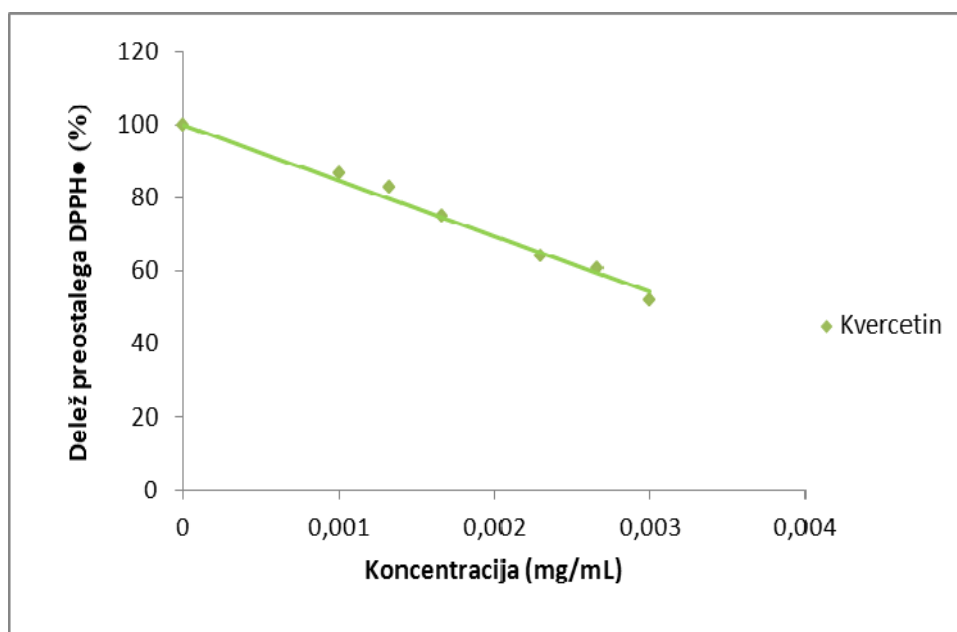
Preglednica 10: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije

Izvlečki propolisa	γ (mg/mL)	A_{517} (po 30 min)	DPPH (%)
70 % EIP	0	0	100,0
	0,0074	0,825	76,6
	0,0112	0,773	71,8
	0,0149	0,694	64,4
	0,0185	0,630	58,5
	0,0223	0,531	49,3
96 % EIP	0	0	100,0
	0,0065	0,832	77,2
	0,0097	0,752	69,8
	0,0130	0,696	64,7
	0,0162	0,605	56,2
Kv ercetin	0	0	100,0
	0,0010	0,938	86,8
	0,0013	0,899	83,1
	0,0017	0,776	75,1
	0,0023	0,663	64,2
	0,0027	0,625	60,5
	0,0030	0,526	51,9

Na sliki 7 je za izvlečka propolisa prikazana odvisnost deleža preostalega radikala DPPH• po 30 minutah inkubacije od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Za primerjavo je na sliki 8 prikazan delež preostalega radikala DPPH• po 30 minutah inkubacije v odvisnost od koncentracije kvercetina. Iz slik 7 in 8 vidimo, da z višanjem koncentracije fenolnih spojin, delež preostalega DPPH• radikala linearno pada. Iz tega se da sklepati, da so preiskovane fenolne spojine uspešni lovilci prostega radikala.



Slika 7: Delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa v reakcijski zmesi



Slika 8: Delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo podali kot koncentracijo fenolnih spojin, ki je odgovorna za 50 % zmanjšanje začetne količine DPPH• ($ED_{50\%}$). $ED_{50\%}$ smo izračunali po enačbi 14.

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

kjer je:

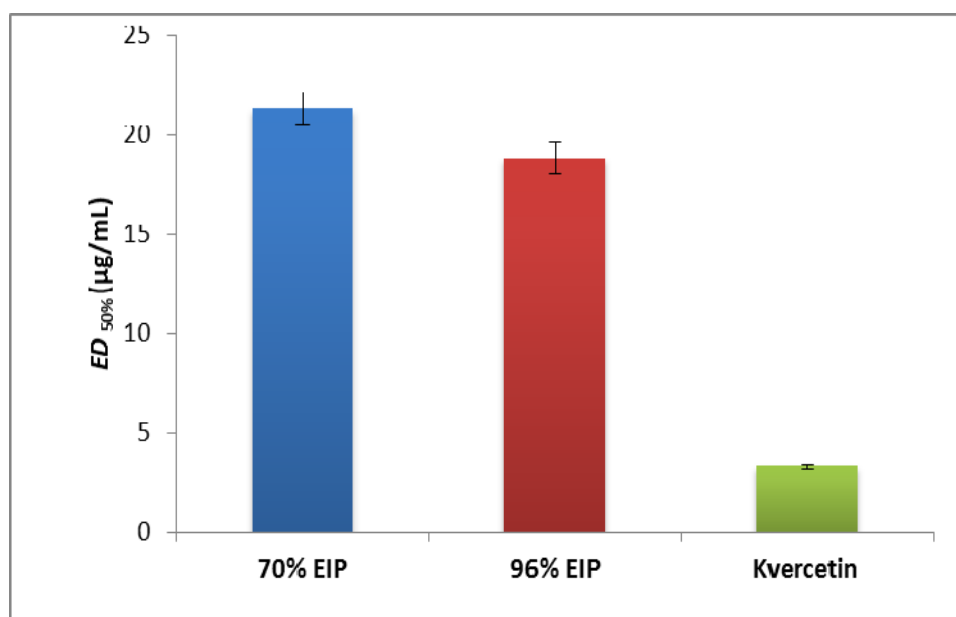
k – smerni koeficient oz. naklon premice na slikah 7 in 8.

Smerni koeficient premice na slikah 7 in 8 smo določili z metodo linearne regresije. Vrednosti smernih koeficientov oz. naklonov premic in pa koncentracij, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje količine DPPH• so podane v preglednici 11. Pomembno je vedeti, da boljša kot je sposobnost lovljenja DPPH• radikalov, večji je naklon premice, s tem pa nižja $ED_{50\%}$ vrednost.

Kot lahko vidimo iz rezultatov v preglednici 11, je najboljšo sposobnost lovljenja radikalov pokazal kvercetin, saj je imel največji naklon premice, s tem pa najnižjo $ED_{50\%}$ vrednost ($3,3 \pm 0,1$) $\mu\text{g/mL}$. Sledila sta mu preiskovana izvlečka, kjer je $ED_{50\%}$ vrednost za 96 % EIP znašala (19 ± 1) $\mu\text{g/mL}$ in za 70 % EIP (21 ± 1) $\mu\text{g/mL}$.

Preglednica 11: Nakloni premic in koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH

Izvečki propolisa	Naklon premice (k)	$ED_{50\%}$ ($\mu\text{g/mL}$)
70 % EIP	-2347 ± 88	21 ± 1
96 % EIP	-2658 ± 120	19 ± 1
Kvercetin	-15174 ± 381	$3,3 \pm 0,1$



Slika 9: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH• radikala ($ED_{50\%}$)

$ED_{50\%}$ vrednosti za oba izvlečka v okviru napake določitve sovpadata, vendar je kljub temu zanimivo to, da je 70 % EIP v nasprotju z redukcijsko sposobnostjo pokazal nekoliko nižjo učinkovitost v lovljenju prostega radikala od 96 % EIP. Kar verjetno pomeni to, da je izvleček, ki smo ga pridobili z bolj polarnim topilom, se pravi zmesjo etanol/voda (70:30 v/v), vseboval manjšo količino spojin odgovornih za ta učinek (sposobnost lovljenja radikala DPPH•).

Kumazava in sodelavci (2004) so v svoji raziskavi preverili sposobnost lovljenja radikala DPPH• in ugotovili, da so preiskovani izvlečki propolisa pri koncentraciji fenolnih spojin 31 µg/mL (izraženo v ekvivalentih KK) pokazali v povprečju 54 % sposobnost lovljenja radikala DPPH• z minimalno vrednostjo 10 % in maksimalno vrednostjo 80 %. Če upoštevamo, da s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi delež prostega radikala DPPH• pada (slika 7), torej se sposobnost lovljenja radikala DPPH• viša, in da sta preiskovana izvlečka pri koncentraciji okoli 20 µg/mL (preglednica 11) pokazala 50 % sposobnost lovljenja radikala DPPH•, lahko zaključimo, da sta izvlečka iz slovenskega propolisa v primerjavi z izvlečki propolisa v raziskavi Kumazave in sod. (2004) dokaj uspešna v lovljenju DPPH• radikala.

4.2.3 Beljenje β-karotena

Metoda beljenja β-karotena temelji na razbarvanju β-karotena zaradi reakcije s produkti avtooksidacije emulgirane linolne kisline (peroksilni radikal) v vodi. Antioksidativno učinkovitost dodanih antioksidantov, ki tekmujejo z β-karotenom pri reakciji s peroksilnim radikalom zaznamo kot upočasnjen proces razbarvanja β-karotena. Razbarvanje β-karotena

merimo kot znižanje absorbance v vidnem spektru. Znižanje absorbance je ob dodatku antioksidanta manjše (Moure in sod., 2000; Prior in sod., 2005).

Pri metodi beljenje β -karotena smo antioksidativno učinkovitost preiskovanih izvlečkov in kvercetina določili tako, da smo spektrofotometrično zasledovali časovno odvisnost razgradnje β -karotena. Hitrost razpada β -karotena v kontrolnih vzorcih (β -karoten v emulziji brez antioksidanta) smo primerjali z vzorci, ki so bili zaščiteni z izvlečkom oz. kvercetinom. Koncentracija fenolnih spojin v emulziji je znašala 0,05 mg/ml. V preglednici 12 so podane vrednosti A_{470} pri različnih časih, t .

Antioksidativne učinkovitosti EIP in kvercetina smo izrazili kot koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AO}), ki smo ga izračunali po enačbi:

$$C_{AO} = \left(1 - \frac{A_{VZ470}^0 - A_{VZ470}^x}{A_{K470}^0 - A_{K470}^x} \right) \times 100 \% \quad \dots(15)$$

kjer je:

A_{VZ470}^0 - absorbanca vzorca, ki je bil zaščiten z izvlečkom oz. kvercetinom ob času $t = 0$,

A_{VZ470}^x - absorbanca vzorca, ki je bil zaščiten z izvlečkom oz. kvercetinom ob času $t = x$,

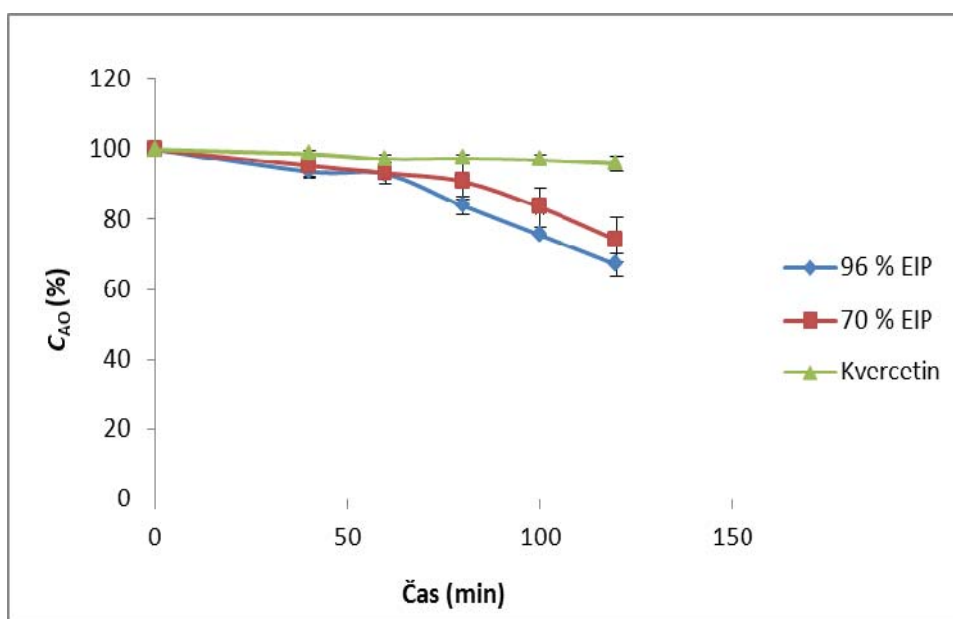
A_{K470}^0 - absorbanca kontrole ob času $t = 0$,

A_{K470}^x - absorbanca kontrole ob času $t = x$.

Preglednica 12: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{470}) v emulziji za izvlečka propolisa in kvercetin pri različnih časih, t

Izvečki propolisa	t (min)	A_{470} (par. 1)	A_{470} (par. 2)	$\bar{A}_{470} \pm SD$
70 % EIP	0	0,528	0,519	$0,524 \pm 0,005$
	40	0,516	0,512	$0,514 \pm 0,002$
	60	0,502	0,501	$0,502 \pm 0,001$
	80	0,480	0,490	$0,485 \pm 0,005$
	100	0,425	0,454	$0,440 \pm 0,02$
	120	0,374	0,410	$0,392 \pm 0,02$
96 % EIP	0	0,533	0,526	$0,529 \pm 0,004$
	40	0,511	0,506	$0,508 \pm 0,002$
	60	0,502	0,499	$0,500 \pm 0,001$
	80	0,450	0,463	$0,457 \pm 0,006$
	100	0,402	0,404	$0,403 \pm 0,001$
	120	0,335	0,382	$0,359 \pm 0,02$
Kvercetin	0	0,520	0,510	$0,515 \pm 0,005$
	40	0,532	0,514	$0,523 \pm 0,009$
	60	0,520	0,512	$0,516 \pm 0,004$
	80	0,519	0,510	$0,515 \pm 0,005$
	100	0,510	0,509	$0,509 \pm 0,001$
	120	0,501	0,500	$0,500 \pm 0,001$

Na sliki 10 smo za preiskovana izvlečka in kvercetin spremljali vrednosti C_{AO} v odvisnosti od časa. Opazimo lahko, da v primeru kvercetin vrednosti C_{AO} to je antioksidativna učinkovitost s časom pada zelo počasi, medtem ko izvlečkoma pada dosti hitreje, kar smo opazili tudi med izvedbo samega eksperimenta, kot intenzivnejše bledenje oranžne barve β -karotena.

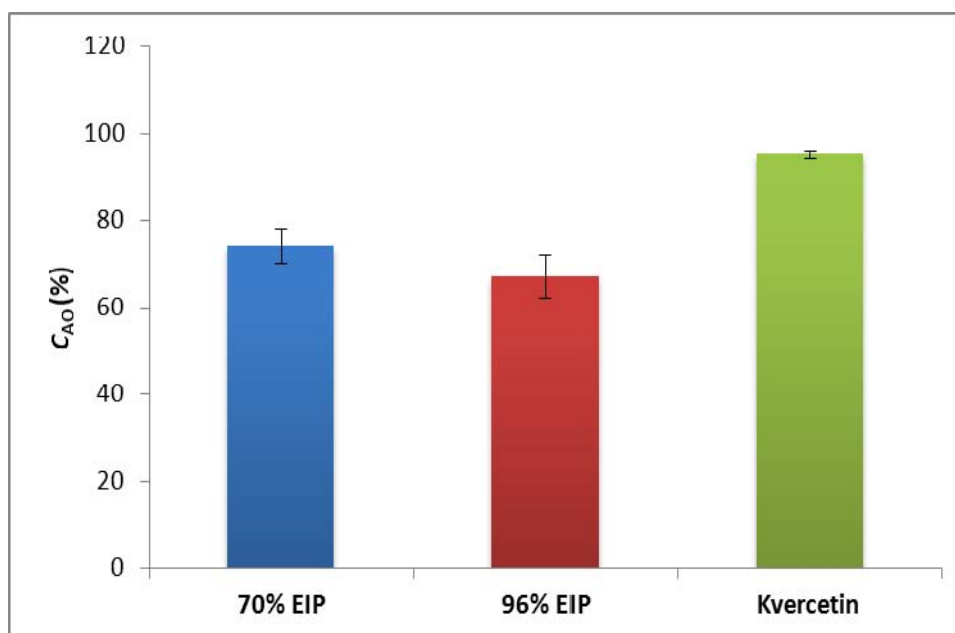


Slika 10: Koeficient antioksidativne aktivnosti (C_{AO}) v emulziji v odvisnosti od časa inkubacije za kvercetin in izvlečka propolisa

V preglednici 13 so podane vrednosti C_{AO} po 120 minutah inkubacije pri 50° C, na sliki 11 pa smo jih ponazorili tudi grafično. Razvidno je, da imajo EIP kar visoko antioksidativno učinkovitost, saj je njihov koeficent znašal preko 60 %. Najvišjo antioksidativno učinkovitost je pokazal kvercetin (95 ± 1) %, sledil mu je 70 % EIP (74 ± 4) % in temu 96 % EIP, kjer je vrednost za C_{AO} znašala (67 ± 5) %.

Preglednica 13: Vrednosti koeficientov antioksidativne aktivnosti (C_{AO}) v emulziji po 120 minutah inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/mL

Izvečki propolisa	C_{AO} (%) (par. 1)	C_{AO} (%) (par. 2)	$\bar{C}_{AO} \pm SD$ (%)
70 % EIP	69,7	78,6	74 ± 4
96 % EIP	62,4	71,8	67 ± 5
Kvercetin	93,8	96,3	95 ± 1



Slika 11: Vrednosti koeficientov antioksidativne aktivnosti (C_{AO}) v emulziji linolne kisline v vodi pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/mL po 120 minutah inkubacije

Glede na to, da sta priskovana izvlečka fenolnih spojin iz propolisa pokazala v emulziji β -karotena in linolne kisline sicer nižjo, a vendarle primerljivo antioksidativno sposobnost kvercetinu, lahko sklepamo, da fenolne spojine v izvlečkih reagirjo uspešno s peroksilnim radikalom ter na ta način inhibirajo proces oksidacije linolne kisline.

Izvlečki propolisa v raziskavi, ki jo je opravil Kumazava in sodelavci (2004) so v emulziji pri koncentraciji fenolnih spojin 15 $\mu\text{g/mL}$ pokazali v povprečju 55 % antioksidativno učinkovitost. Ker nimamo podatka, kako se C_{AO} spreminja s koncentracijo fenolnih spojin izvlečka v emulziji (splošnem je sicer znano, da C_{AO} raste s s koncentracijo fenolnih spojin v emulziji), je težko primerjati antioksidativno učinkovitosti izvlečkov slovenskega propolisa, ki je bila opravljena pri koncentraciji fenolnih spojin 50 $\mu\text{g/mL}$ z izvlečki propolisa v raziskavi Kumazave in sodelavcev (2004).

4.2.4 Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala

Superoksidni anionski radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nastaja v mnogih procesih in je ena izmed bolj reaktivnih kisikov zvrsti. Nastaja lahko pri redukciji kisika v dihalni verigi, avtooksidaciji znotrajceličnih spojin ter pri različnih drugih znotrajceličnih procesih. Povzroči lahko inaktivacijo antioksidativnih in mitohondrijskih encimov, kot so glutation peroksidaza, katalaza, mitohondrijska NADH reduktaza, peroksidaza in ATP-aza (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 1999). V našem primeru je nastanek $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalov, ki nastanejo v PMS-NADH sistemu odgovoren za redukcijo reagenta NBT. Reducirano obliko NBT smo merili spektrofotometrično pri 570 nm po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi. Vrednosti izmerjenih absorbanc so podane v preglednici 14.

Preglednica 14: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov propolisa in kvercetina (γ) in vrednosti izmerjene absorbance (\bar{A}_{570})

Izvlečki propolisa	γ (mg/mL)	A_{570} (par.1)	A_{570} (par. 2)	$\bar{A}_{570} \pm SD$
70 % EIP	0	0,621	0,569	0,60 \pm 0,03
	0,017	0,526	0,447	0,49 \pm 0,04
	0,033	0,426	0,397	0,41 \pm 0,02
	0,050	0,411	0,361	0,39 \pm 0,02
	0,067	0,406	0,373	0,39 \pm 0,02
	0,084	0,398	0,373	0,39 \pm 0,01
96 % EIP	0	0,643	0,489	0,57 \pm 0,08
	0,015	0,577	0,469	0,52 \pm 0,05
	0,029	0,555	0,432	0,49 \pm 0,06
	0,044	0,501	0,388	0,45 \pm 0,06
	0,058	0,473	0,360	0,42 \pm 0,06
	0,073	0,442	0,341	0,39 \pm 0,05
Kvercetin	0	0,623	0,447	0,54 \pm 0,09
	0,005	0,493	0,314	0,40 \pm 0,09
	0,010	0,176	0,245	0,21 \pm 0,04
	0,015	0,154	0,194	0,17 \pm 0,02
	0,020	0,207	0,158	0,18 \pm 0,02
	0,025	0,176	0,130	0,15 \pm 0,02

Pri metodi določitve sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala reagent NBT in pa spojine z antioksidativno učinkovitostjo v naših vzorcih tekmujejo za superoksidni anionski radikal. Bolj kot je antioksidant učinkovit, več $O_2^{\cdot-}$ radikala bo ujel in manj NBT se bo reduciralo. Posledica tega je nižja vrednost za A_{570} , kot pa v primeru, če v reakcijski zmesi ni lovilca $O_2^{\cdot-}$ radikala. Znižanje absorbance je sorazmerno sposobnosti za lovljenje $O_2^{\cdot-}$ radikala, s tem pa tudi antioksidativni učinkovitosti preiskovanega vzorca.

Sposobnost lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikala (SASA) smo izračunali s pomočjo enačbe:

$$SASA = \left(1 - \frac{A_{VZBTO}}{A_{KBTO}}\right) \times 100 \% \quad \dots(16)$$

kjer je:

$A_{vz\ 570}$ - absorbanca vzorca, ki je bil zaščiten z izvlečkom oz. kvercetinom,
 $A_{k\ 570}$ - absorbanca kontrole.

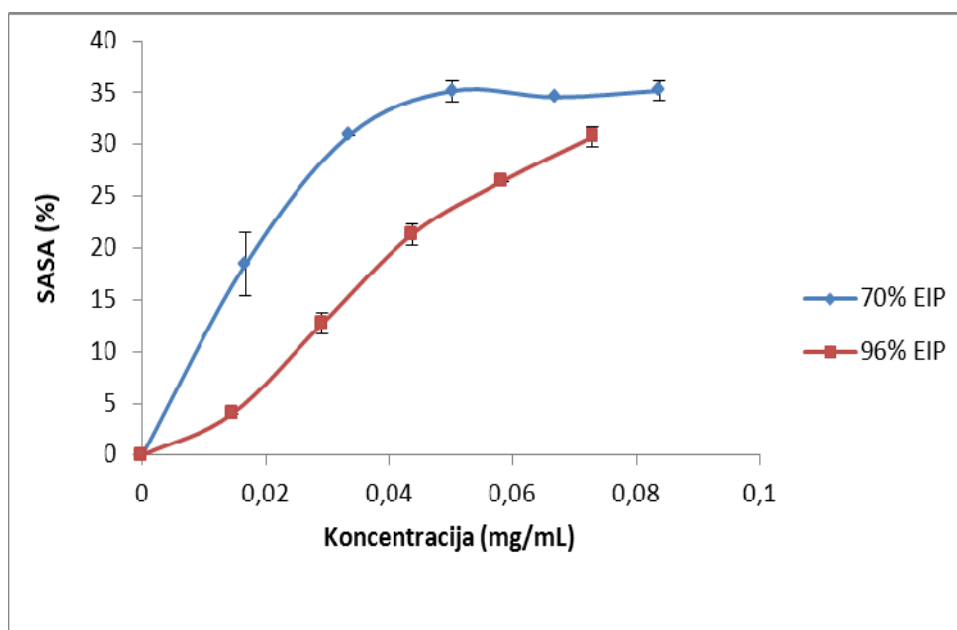
V preglednici 15 so za izvlečke propolisa in kvercetina podane vrednosti SASA pri preiskovanih koncentracijah fenolnih spojin v reakcijski zmesi.

Preglednica 15: Koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi (γ) in sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za izvlečka propolisa in kvercetin

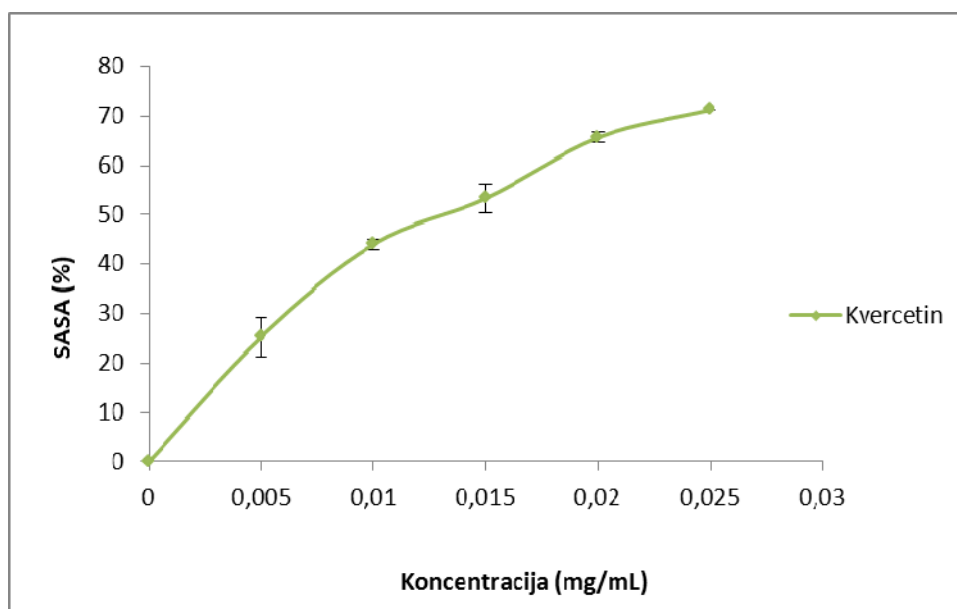
Izvlečki propolisa	γ (mg/mL)	SASA (par.1)	SASA (%) (par. 2)	$\overline{\text{SASA}} \pm \text{SD}$ (%)
70 % EIP	0,017	15,3	21,6	18 \pm 3
	0,033	30,4	31,4	31 \pm 0
	0,050	33,9	36,5	35 \pm 1
	0,067	34,6	34,6	35 \pm 0
	0,084	34,6	35,8	35 \pm 1
96 % EIP	0,015	4,0	4,0	4 \pm 0
	0,029	13,7	11,7	13 \pm 1
	0,044	22,1	20,6	21 \pm 1
	0,058	26,5	26,4	26 \pm 0
	0,073	31,3	30,2	31 \pm 1
Kvercetin	0,005	29,7	20,9	25 \pm 4
	0,01	45,1	43,1	44 \pm 1
	0,015	56,5	50,2	53 \pm 3
	0,02	64,6	66,7	66 \pm 1
	0,025	70,9	71,8	71 \pm 0

Na sliki 12 je za izvlečka propolisa prikazana odvisnost SASA od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Tudi pri tej metodi smo za primerjavo vzeli kvercetin in na sliki 13 prikazali koncentracijsko odvisnost SASA od kvercetina.

Iz grafov, ki so prikazani na slikah 12 in 13 lahko vidimo, da sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala narašča s koncentracijo fenolnih spojin. Opazimo tudi to, da vrednost SASA narašča do določene vrednosti, za tem pa se vrednost SASA s koncentracijo ne spreminja več. To pomeni, da se kljub zviševanju koncentracije fenolnih spojin sposobnost lovljenja $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalov ne veča več. Omenjeni pojav je najbolj očiten za 70 % EIP.



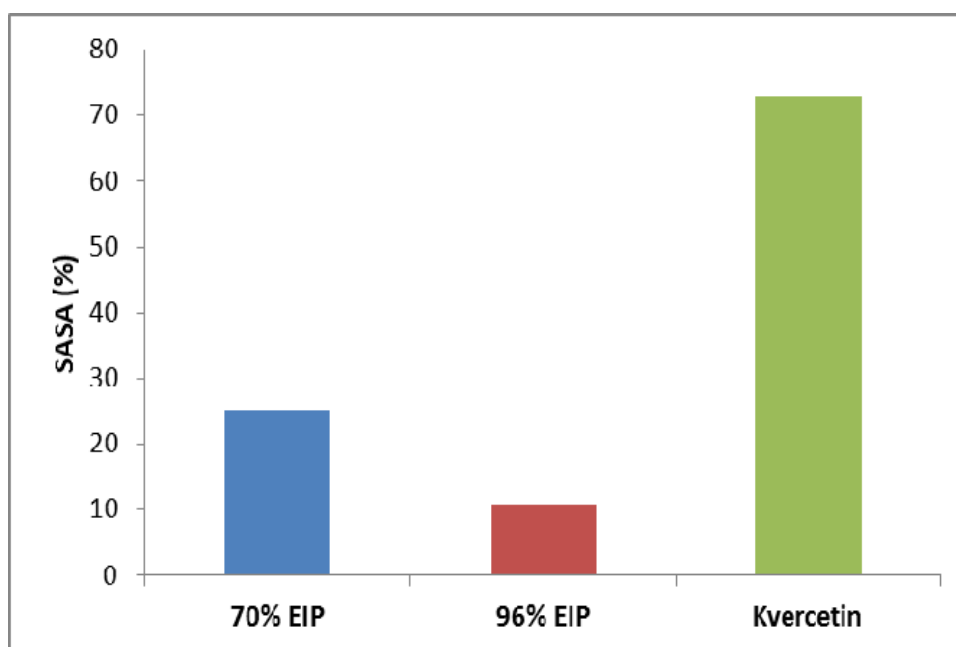
Slika 12: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za izvlečka propolisa



Slika 13: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za kvercetin

Kvercetin je pokazal najboljšo sposobnost lovljenja radikalov. Sledila sta mu je 70 % EIP in pa 96 % EIP, kjer je bila ta sposobnost veliko slabša.

Parametre krivulj, ki so prikazane na sliki 12 in 13 smo določili s pomočjo nelinearne regresijske analize. Da bi bolj nazorno predstavili primerjavo v sposobnosti preiskovanih zvrsti za lovljenje $O_2^{\cdot -}$ radikalov, smo iz parametrov omenjene regresijske analize izračunali vrednost SASA za izvlečke propolisa in kvercetina pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 0,025 mg/mL in prikazali na sliki 14. Iz slike 14 vidimo, da ima kvercetin s 73 % sposobnostjo lovljenja radikala daleč najboljšo antioksidativno učinkovitost. Sledila sta 70 % EIP in 96 % EIP, kjer je bila ta učinkovitost znatno nižja od kvercetina. Pri isti koncentraciji fenolnih spojin (0,025 mg/mL) je bila vrednost SASA za 70 % EIP 25 %, za 96 % EIP pa 11 %.



Slika 14: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za izvlečka propolisa in kvercetin pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 0,025 mg/mL

4.3 PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA IZVLEČKOV PROPOLISA *IN VIVO*

Želeli smo preveriti hipotezo, ali bosta 70 % EIP in pa kvercetin, ki smo ju dodali suspenziji celic kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* pokazala *in vivo* antioksidativno delovanje, kot sta ga pokazala pri *in vitro* metodah.

Antioksidativno delovanje izvlečka propolisa in kvercetina v celicah kvasovk smo preverili z merjenjem fluorescenčne intenzitete barvila diklorofluorescein. Nižja kot je bila

izmerjena fluorescenčna intenziteta (FI), nižja je bila znotrajcelična oksidacija, s tem pa boljše antioksidativno delovanje našega izvlečka.

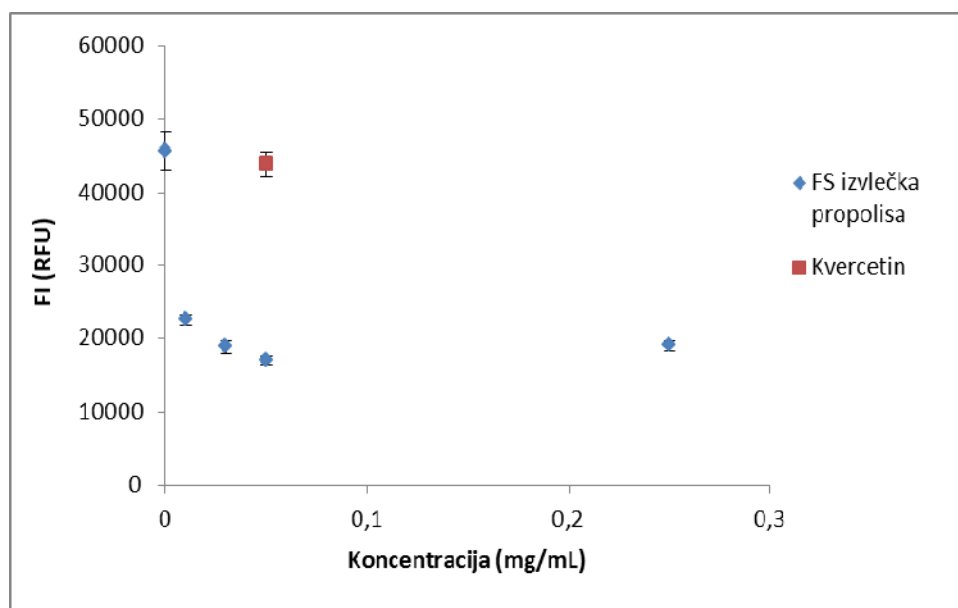
Celice kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* smo izpostavili različnim koncentracijam fenolnih spojin izvlečka propolisa (0,01; 0,03; 0,05; 0,25 mg/mL) in pa koncentraciji kvercetina (0,05 mg/mL). Meritve pa smo opravili tudi za kontrolo, kjer smo imeli samo kulturo *Saccharomyces cerevisiae*, brez kakršnih koli dodatkov.

Kot je razvidno iz preglednice 16 in slike 15 smo pri metodi spremljali fluorescenčno intenziteto (FI) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin izvlečka propolisa in pa kvercetina.

Preglednica 16: Vrednosti fluorescenčnih intenzitet (FI) pri različnih koncentracijah fenolnih spojin izvlečka propolisa in kvercetina, v suspenziji celic kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*

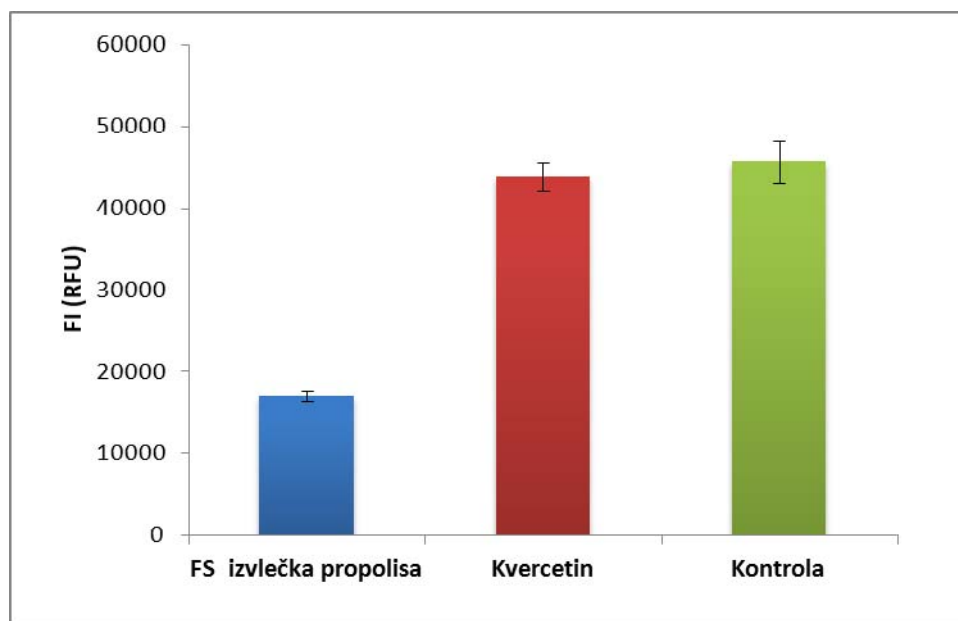
	γ (mg/mL)	0-kontrola	0,01	0,03	0,05	0,25
Fenolne spojine izvlečka propolisa	Flourescenčna intenziteta (RFU)	46578	23137	17964	17334	18269
		47688	22744	18146	16307	18912
		42233	21401	19457	16712	19783
		42583	22684	19743	17485	/
		46352	/	/	16703	/
		48228	/	/	16237	/
	/	/	/	17830	/	
	Povprečje flourescenčnih intenzitet (RFU) \pm	45610 \pm	22492 \pm	18828 \pm	16944 \pm	18998 \pm
	SD	2578	754	903	612	760
Fenolne spojine kvercetina	Flourescenčna intenziteta (RFU)	/	/	/	43094	/
		/	/	/	41873	
		/	/	/	45248	/
		/	/	/	45124	/
		Povprečje flourescenčnih intenzitet (RFU) \pm				43835 \pm
	SD				1639	

S slike 15 vidimo, da dodatek EIP znižuje znotrajcelično oksidacijo glede na kontrolo, saj se je fluorescenčna intenziteta s koncentracijo dodanega EIP zniževala. Razvidno je, da se je znotrajcelična oksidacija najbolj znižala pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/mL, kar pomeni, da ima naš izvleček pri tej koncentraciji največje antioksidativno delovanje (najnižje FI vrednosti). Pri 5x višji koncentraciji fenolnih spojin izvlečka propolisa (0,25 mg/mL) pa so vrednosti FI zopet višje.



Slika 15: Spreminjanje fluorescenčne intenzitete (FI) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin izvlečka propolisa in kvercetina, ki smo ju dodali suspenziji celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

V sklopu metode pa smo prav tako opravili primerjavo v antioksidativnem delovanju med kvercetinom in EIP pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/mL. Kot lahko vidimo s slike 16, kvercetin za razliko od fenolnih spojin izvlečka propolisa v suspenziji ni znižal znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo, saj se njune FI vrednosti pri koncentraciji 0,05 mg/mL v okviru eksperimentalne napake niso kaj dosti razlikovale. To pomeni, da ob dodatku kvercetina celicam kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ta v celicah ni deloval antioksidativno.



Slika 16: Vrednosti fluorescenčnih intenzitet (FI) glede na kontrolo za fenolne spojine izvlečka propolisa in kvercetina pri koncentraciji 0,05 (mg/mL)

Kar se je pri celotni metodi izkazalo za zanimivo je to, da kvercetin v *in vivo* razmerah ni pokazal antioksidativnega delovanja, za razliko od *in vitro* testov, kjer je bil daleč najbolj antioksidativno učinkovit.

Na podlagi zgoraj dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da EIP v celicah kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* zniža znotrajcelično oksidacijo, za razliko od kvercetina, kjer se antioksidativno delovanje ni pokazalo.

V literaturi navajajo nasprotujoče rezultate o *in vitro* ter *in vivo* antioksidativni učinkovitosti flavonoidov (Lotito in Frei, 2004). Za kvercetin pa navajajo celo prooksidativno učinkovanje v eritrocitih (Galati in sod., 2002).

5 SKLEPI

Glede na rezultate opravljenih analiz smo prišli do sledečih zaključkov:

- Iz propolisa slovenskega porekla smo pridobili izvlečke, ki so vsebovali fenolne spojine.
- Dobit ekstrakcije, ki je izražena kot vsebnost fenolnih spojin v propolisu, je ob izvedbi čiščenja z ekstrakcijo na trdnem nosilcu nižja kot pred čiščenjem s SPE.
- Izbira topila (polarnost) vpliva na vsebnost celokupnih fenolnih spojin v izvlečku, saj se je več fenolnih spojin ekstrahiralo z bolj polarnim topilom (zmes etanol/voda (70:30 v/v)).
- Preiskovani izvlečki so v primerjavi s tistimi iz drugih geografskih področij pokazali primerljivo vsebnost fenolnih spojin. Razlogov za morebitne razlike je lahko več. Prvi med njimi sta botanično in geografsko poreklo propolisa. Naslednji razlog je čiščenje etanolnih izvlečkov, kjer je lahko prišlo tudi do delne odstranitve fenolnih spojin ter drugih reducirajočih spojin, ki sicer dajo višji rezultat.
- Izvlečkom propolisa smo z različnimi *in vitro* metodami doličitve sposobnosti redukcije kovinskih ionov, lovljenja DPPH• radikala in superoksidnega anionskega radikala ter zaviranja oksidacije linolne kisline emulgirane v vodi (beljenje β -karotena), dokazali antioksidativno učinkovitost, ki je v primerjavi z antioksidativno učinkovitostjo komercialno dostopnega flavonoida kvercetina signifikantno nižja.
- Izbira topila ne vpliva samo na vsebnost celokupnih fenolnih spojin, ampak tudi na antioksidativno učinkovitost izvlečka. Izvleček, ki smo ga pripravili z bolj polarnim topilom (zmes etanol/voda (70:30 v/v)) je v primerjavi s tistim, ki smo ga pripravili z manj polarnim topilom (zmes etanol/voda (96:4 v/v)) pokazal boljšo redukcijsko sposobnost, večjo sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala ter večjo učinkovitost pri zaviranju oksidacije linolne kisline emulgirane v vodi. Izjema je DPPH• metoda, kjer se je 96 % izvleček izkazal kot učinkovitejši.
- Izvlečki propolisa niso pokazali samo *in vitro* pač pa tudi *in vivo* antioksidativno učinkovitost. Komercialno dostopni antioksidant kvercetin za razliko od *in vitro* metod, kjer je v primerjavi z izvlečkoma pokazal daleč najboljše antioksidativno delovanje, v *in vivo* razmerah antioksidativno delovanje sploh ni bilo zaznano.

Rezultati raziskovalnega dela so potrdili vse naše delovne hipoteze.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo v izvlečkih propolisa slovenskega porekla želeli določiti vsebnost celokupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost z različnimi *in vitro* metodami ter *in vivo* testom merjenja stopnje znotrajcelične oksidacije. Prav tako smo izvedli primerjavo antioksidativne učinkovitosti izvlečkov s komercialno dostopnim antioksidantom kvercetinom.

Propolis smo najprej ustrezno homogenizirali in za tem izvedli ekstrakcijo fenolnih spojin. Ekstrahirali smo z dvoje različnih ekstrakcijskih topil; zmes etanol/voda (70:30 v/v) in zmes etanol/voda (96:4 v/v). Pripravljene izvlečke smo z uporabo ekstrakcije na trdnem nosilcu še dodatno očistili.

Določitev vsebnosti celokupnih fenolnih spojin je potekala spektrofotometrično, s pomočjo Folin-Ciocalteu metode v izvlečkih propolisa pred in po šiščenju s SPE. Vsebnost celokupnih fenolnih spojin smo izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline. Dobit ekstrakcije, ki je izražena kot vsebnost fenolnih spojin (v mg) na gram propolisa, je pred SPE višja kot po čiščenju in različna glede na polarnost ekstrakcijskega topila. Dobit ekstrakcije z zmesjo etanol/voda (70:30 v/v) (294 ± 26) mg/g in z zmesjo etanol/voda (96:4 v/v) (263 ± 18) mg/g, ki smo jo določili, ne da bi izvedli čiščenje s SPE, je primerljiva z literaturnimi podatki. Dobit ekstrakcije po SPE znaša za ekstrakcijo z zmesjo etanol/voda (70:30 v/v) in (161 ± 6) mg/g in (140 ± 19) mg/g za ekstrakcijo z zmesjo etanol/voda (96:4 v/v). Pri čiščenju etanolnih izvlečkov s SPE odstranimo različne nečistoče, med njimi tudi reducirajoče spojine (aminokislina, sladkorji), ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom in zvišajo rezultat, morda pa je prišlo tudi do delne odstranitve fenolnih spojin.

V nadaljevanju smo določili antioksidativno učinkovitosti EIP in kvercetina *in vitro*, kjer smo izvedli štiri analize metode:

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

Vse metode, ki smo izvedli, so pokazale antioksidativni potencial EIP. Pri vseh predhodno omenjenih metodah je bilo možno zaslediti, da je 70 % EIP pokazal boljšo antioksidativno učinkovitost, kot 96 % EIP. Izjema je bila le DPPH• metoda, kjer je 70 % EIP pokazal slabšo antioksidativno učinkovitost zaradi domnevno nižje vsebnosti spojin odgovornih za ta učinek.

Namen naloge ni bil zgolj medsebojna primerjava antioksidativne učinkovitosti izvlečkov glede na ekstrakcijsko topilo, pač pa primerjava z izbranim komercialno dostopnim flavonoidom kvercetinom. Le ta je pri vseh zgoraj omenjenih metodah pokazal boljši antioksidativni potencial kot izvlečka.

V drugem delu diplomskega dela pa smo še preverili antioksidacijsko delovanje 70 % EIP in kvercetina *in vivo*, kjer smo kot modelni organizem uporabili kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Metoda je zajemala merjenje znotrajcelične oksidacije s pomočjo barvila 2,7-diklorofluoresceina, ki se je v prisotnosti oksidantov oksidiral do fluorescentne oblike. Nastanek fluorescentne oblike barvila pa je bil tudi indikator znotrajcelične oksidacije.

Naš izvleček ni pokazal samo *in vitro*, pač pa tudi *in vivo* antioksidativno učinkovitost. Za razliko od *in vitro* metod, kjer je kvercetin v primerjavi z izvlečkoma pokazal daleč najboljše antioksidativno delovanje, ga v *in vivo* pogojih sploh ni pokazal.

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 fakultete, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Aherne S.A., O'Brien N.M. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18: 75-81
- Ahn M.R., Kumazawa S., Usui Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F., Naqkayama T. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101: 1383-1392
- Atlas R.M. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 1006-1007
- Banskota A.H., Tezuka Y., Kadota S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15:561-571
- Basim E., Basim H., Ozcan M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77: 992-996
- Bernot Sotenšek M. 2001. Antioksidativna učinkovitost ekstraktov rožmarina v zamrznjenih sesekljanih puranjih rezkih. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 17-22
- Božnar M. 2002. Zaklad iz čebeljega panja. Ljubljana, Kmečki glas: 31-33
- 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
- Castaldo S., Capasso F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, Suppl.1: S1-S6
- Chaillou L.L., Nazareno M.A. 2009. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 8: 1422-1427
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 217-246
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 5: 343-356
- De Castro S.L. 2001. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *ARBS- Annual Review of Biomedical Sciences*, 3:49-83

Galati G., Sabzevari O., Wilson J.X., O' Brien P.J. 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the pheroxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 177: 91-104

Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.F.C. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65: 45-80

Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Cartero A., Fernandez-Gutierrez A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1220-1234

Gordon M.H. 2003. Antioxidants. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 261-289

Gülcin I. 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217: 213-220

Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58: 966-968

Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 6: 2274-2279

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.

Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29, 11: 1297-1301

Jasprica I., Mornar A., Debeljak Ž., Bubalo A.S., Medić-Šarić M., Mayer L., Romić Ž, Bućan K., Balog T., Sobočanec S, Šverko V. 2007. *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 548-554

Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S., Bauer F. 2006. The antioxidative properties of Holy basil and Galalangal in cooked ground pork. *Meat Science*, 72: 446-456

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-22

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

Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84: 329-339

- 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*, 46:244-282
- Lotito S.B., Frei, B. 2004. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radical. Biology and Medicine*, 36: 201-211.
- Lu L.C., Chen Y.W., Chou C.C. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 213-220
- Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J. L.F.C. 2008. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613:1-19
- Marucci M.C., Ferres F., Garcia-Viguera C., Bankova V.S., De Castro S.L., Dantas A.P., Valente P.H.M., Paulino N. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 105-112
- Meglič M. 2004. Čebelji pridelki. Brdo pri Lukovici, Čebelarska zveza Slovenije: 57-64
- Mendes da Silva J.F., De Souza M.C., Matta S., De Andrade M., Nova Vidal F.V. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99: 431-435
- Mohammadzadeh S., Shariatpanahi M., Hamed M., Ahmadkhaniha R., Samadi N., Ostad S.N. 2007. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*, 103: 1097-1103
- Moreira A., Dias L.G., Pereira J.A., Estevinho L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3482-3485
- 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
- Motomura M., Kwon K.M., Suh S.J., Lee Y.C., Kim Y.K., Lee I.S., Kim M.S., Kwon D.Y., Suzuki I., Kim C.H. 2008. Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26:61-67
- Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 8. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4507-4514
- Naczki M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111

Peterson J., Dwyer J. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18: 1995-2018

Pipan V. 1990. Kakovost zamrznjenih mesnih sekljancev po dodatku antioksidantov. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 40-40

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

Propolis. 2006. *The Lawrence Review of Natural Products*, May 2006: 1-4

Propolis. 2009. Ohio, Gypsy Bees Company <http://www.gypsybees.com/propolispage.htm> (september 2009): 1 str.

Prytyk E., Dantas A., Salomao K., Pereira A., Bankova V.S., De Castro S., Aquino Neto F.R. 2003. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 88: 189-193

Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioprosesi pridobivanja antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-66

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

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

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

Russo A., Cardile V., Sanchez F., Troricoso N., Vanella A., Garbarino J.A. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*, 76: 545-558

Salomao K., Dantas A.P., Borba C.M., Campos L.C., Machado D.G., Aquino Neto F.R., De Castro S.L. 2004. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 87-92

Sforcin J.M. 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 1-14

Sies H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82:291-295

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

Skvarča M. 2000. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179-190

Smerdu F. 1977. Kako deluje? Zdravila, strupi, droge. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 248-248

Sobočanec S., Šverko V., Balog T., Šarić A., Rusak G., Likić S., Kušić B., Katalinić V., Radić S., Marotti T. 2005. Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:8018-8026

Suja K.P., Jayalekshmy A., Arumughan C. 2005. Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry*, 91:312-219

Supelco. 1998. Guide to solid phase extraction. Pade, Sigma-Aldrich Company (January 1998)

<http://209.85.129.132/search?q=cache:7pAdscDPg9sJ:www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf+guide+solid+phase+extraction&cd=1&hl=en&ct=clnk> (avgust 2009): 12 str.

Štefan L., Tepšić T., Zavidović T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. 2007. Lipid peroxidation-causes and consequences. *Medicina*, 43: 84-93

Trošt K. 2004. Študija oksidacije in encimskega temnenja sokov iz citrusov. Diplomsko naloga. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 25-30

Trusheva B., Trunkova D., Bankova V. 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1, art. nr. 13, doi 10.1186/1752-153X-1-13

Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114

Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8, 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-107

ZAHVALA

Najprej bi se rada iskreno zahvalila mentorici doc. dr. Heleni Abramovič za vso pomoč, trud in posvečen čas pri pisanju diplomske naloge. Predvsem pa bi se ji rada zahvalila za razumevanje in njeno potrpežljivost v trenutkih, ko sem to največ potrebovala.

Hvala somentorici doc. dr. Poloni Jamnik za njene nasvete in pregled diplomskega dela.

Zahvaliti bi se želela tudi recezentki doc. dr. Barbari Jeršek.

Zahvala gre tudi dr. Tomažu Polaku.

Za neprecenljivo pomoč pri izvajanju praktičnega dela v laboratoriju hvala gospe Jani Martinuč, še posebej pa Petri Terpinc, univ. dipl. inž. živ. tehn., ki me je naučila da se z vztrajnostjo daleč pride.

Največja zahvala pa gre moji sestrici Brigiti, ki mi je v težkih trenutkih stala ob strani, me bodrila, ter mi vlivala moči za naprej.

Posebna zahvala pa gre gospodu Tomažu, brez katerega tega diplomskega dela ne bi bilo.

HVALA VAM!