

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO**

**Vedran MANZIN**

**VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST  
EKSTRAKTOV LISTOV IN PLODOV OLJKE (*Olea europaea* L.)**

**DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij**

**PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS FROM  
OLIVE FRUITS AND OLIVE LEAVES (*Olea europaea*)**

**GRADUATION THESIS  
University studies**

**Ljubljana, 2010**

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Heleno Abramovič, za somentorico dr. Mihaelo Skrt in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Somentorica: dr. Mihaela Skrt

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vedran Manzin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
UDK 634.63:543.06:547.56(043)=163.6  
KG oljke/*Olea europaea*/cv. Buža/cv. Karbonaca/plodovi oljke/listi oljke/Hrvaška Istra/vegetacijsko obdobje/fenolne spojine/skupni fenoli/antioksidativna učinkovitost/reducirajoči sladkorji  
AV MANZIN, Vedran  
SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/ SKRT, Mihaela (somentorica) / VIDRIH, Rajko (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2010  
IN VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV LISTOV IN PLODOV OLJKE (*Olea europaea*)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 50 str., 16 preg., 18 slik., št. virov  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V okviru diplomskega dela smo pripravili ekstrakte fenolnih spojin iz plodov in listov dveh avtohtonih istrskih (Vodnjan, Hrvaška) sort oljke (Buža in Karbonaca). Vzorce smo zbirali v treh različnih vegetacijskih obdobjih. Ekstrakcijo smo izvedli z uporabo topila etanol/voda (70:30 v/v). Skupne fenolne spojine (SFS) smo v dobljenih ekstraktih določili spektrofotometrično s pomočjo Folin-Ciocalteu metode. Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo raziskali z dvema različnima metodama (analiza sposobnosti lovljenja prostih DPPH• in ABTS•<sup>+</sup> radikalov). Vsebnost skupnih fenolnih spojin se je spreminjala z obdobjem vegetacije. Izkazalo se je, da količina skupnih fenolnih spojin v ekstraktih ni v korelaciji z njihovo antioksidativno učinkovitostjo. Rezultati so pokazali, da sorta oljk vpliva na vsebnost SFS v ekstraktih, med tem ko na njihovo antioksidativno učinkovitost ne vpliva. V plodovih in listih oljke, ki smo jih zbrali v različnih obdobjih vegetacije, smo določili tudi vsebnost reducirajočih sladkorjev. Pri vseh substratih se je izkazalo, da koncentracija reducirajočih sladkorjev pada s procesom dozorevanja.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
UDC 634.63:543.06:547.56(043)=163.6  
CX olives/ *Olea europaea*/cv. Buža/cv. Karbonaca/olive fruits/olive leafs/Croatia Istria/vegetation period/phenolic compounds/ total phenolic compounds/antioxidant activity/ reducing sugars  
AU MANZIN, Vedran  
AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor) / SKRT, Mihaela (co-advisor) / VIDRIH, Rajko (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2010  
TI PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS FROM OLIVE FRUITS AND OLIVE LEAVES (*Olea europaea*)  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO X, 50 p., 16 tab, 18 fig., št. ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In the graduation thesis the phenolic compounds from olive fruits and olive leaves, of two indigenous istrian (Vodnjan, Hrvaška) olive cultivars (Buža and Karbonaca) have been extracted. The samples were collected at three different vegetation periods. The extraction was performed by ethanol : water solvent (70:30 v/v). The concentration of total phenolic compounds (SFS) was determined spectrophotometrically according to Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activity of extracts was determined by using two different methods (scavenging activity of free DPPH• and ABTS•<sup>+</sup> radical). The total phenolic content in our samples appeared to be ripening dependent. It was found, that the concentration of total phenolic compounds was not in correlation with their antioxidant activity. The results showed that cultivar effects the concentration of total phenolic compounds, but has no effect on their antioxidant activity. The content of total reducing sugars in olives and olive leaves, collected in different vegetation periods, was also analyzed. All substrates showed a decreasing trend in the content of total reducing sugars with the ripening.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE.....	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	3
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>4</b>
2.1 OLJKA ( <i>Olea europaea</i> L.).....	4
2.2 ANTIOKSIDANTI.....	5
2.2.1 Prosti radikali in oksidativni stres.....	5
2.2.2 Značilnost antioksidantov.....	6
2.3 FENOLNE SPOJINE.....	8
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>13</b>
3.1 MATERIALI.....	13
3.1.1 Plodovi in listi oljke ( <i>Olea europaea</i> L.).....	13
3.1.2 Komercialni ekstrakt.....	13
3.1.3 Reagenti.....	13
3.1.4 Pribor.....	14
3.2 METODE.....	15
3.2.1 Pridobivanje meteoroloških podatkov.....	15
3.2.2 Določanje skupnih fenolnih spojin (SFS) v plodovih in listih oljke.....	15
3.2.2.1 Ekstrakcija.....	15
3.2.2.2 Folin-Ciocalteu metoda.....	16
3.2.2.3 Priprava umeritvene krivulje.....	16
3.2.3 Analiza DPPH•.....	18
3.2.4 Analiza ABTS• <sup>+</sup> .....	18
3.2.5 Analiza reducirajočih sladkorjev.....	19
3.2.5.1 Priprava umeritvene krivulje.....	19
3.2.6 Statistična analiza.....	21
<b>4 REZULTATI Z RAZPRAVO.....</b>	<b>22</b>
4.1 HIDROMETEOROLOŠKI PODATKI PREISKOVANIH OBDOBIJ.....	22
4.2 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN.....	22
4.3 ANALIZA DPPH•.....	26
4.4 ANALIZA ABTS• <sup>+</sup> .....	35
4.5 ANALIZA REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV.....	39
<b>5 SKLEPI.....</b>	<b>42</b>
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>43</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>45</b>
<b>ZAHVALA.....</b>	<b>50</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Goodwin in Mercer, 1983.).....	9
Preglednica 2: Volumen ( $V$ ) izhodne raztopine galne kisline, vrednosti masnih koncentracij galne kisline v mikrocentrifugirki [ $\gamma_{g.k.}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )] in povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{765}$ ).....	16
Preglednica 3: Masna koncentracija glukoze v raztopini ( $\gamma_{g.r.}$ ) in povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{540}$ ).....	19
Preglednica 4: Podatki za povprečne temperature, povprečne mesečne količine padavin in povprečne mesečne vlažnosti zraka za področje Pule, Hrvaška (2009.)...	22
Preglednica 5: Koncentracije fenolnih spojin ( $\gamma$ ) in izmerjenih absorbanc ( $A_{740}$ ) v ekstraktih plodov in listov oljke.....	23
Preglednica 6: Vsebnost skupnih fenolnih spojin, ki je podana kot masa galne kisline na gram substrata ( $\text{mg/g}$ ) v vzorcih listov in plodov dveh različnih sort oljke (Karbonaca in Buža), v različnih vegetacijskih obdobjih in v vzorcu komercialnega ekstrakta.....	23
Preglednica 7: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za plodove sorte Karbonaca ( $\gamma$ ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije radikala DPPH• glede na vegetacijsko obdobje.....	28
Preglednica 8: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za plodove sorte Buža ( $\gamma$ ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije radikala DPPH• glede na vegetacijsko obdobje.....	29
Preglednica 9: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za liste sorte Karbonaca ( $\gamma$ ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije radikala DPPH• glede na vegetacijsko obdobje.....	30
Preglednica 10: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za liste sorte Karbonaca ( $\gamma$ ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije radikala DPPH• glede na vegetacijsko obdobje.....	31
Preglednica 11: Masna koncentracija troloksa v reakcijski mešanici ( $\gamma_{\text{troloks}}$ ), povprečne vrednosti za absorbanco ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije prostega DPPH• radikala.....	31
Preglednica 12: Vrednosti $ED_{50\% \text{ DPPH}}$ za komercialni ekstrakt, raztopino troloks in za ekstrakte plodov in listov oljke glede na vegetacijsko obdobje.....	32

Preglednica 13: Masna koncentracija troloksa v reakcijski mešanici ( $\gamma_{\text{troloks}}$ ), povprečne vrednosti za absorbanco ( $\bar{A}_{734}$ ) in % inhibicije ABTS $\cdot^+$ radikala.....	36
Preglednica 14: Vrednosti $ED_{50\% \text{ ABTS}}$ za raztopino troloks in ekstrakte plodov in listov oljke glede na vegetacijsko obdobje.....	37
Preglednica 15: Vrednosti koncentracij fenolnih spojin ( $\gamma$ ), izmerjenih absorbanca ( $A_{740}$ ) in vsebnosti reducirajočih sladkorjev v preiskovanih ekstraktih.....	39
Preglednica 16: Vsebnost reducirajočih sladkorjev v substratih plodov in listov oljke v različnih vegetacijskih obdobjih.....	40

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Oljka ( <i>Olea europaea</i> L.) (Škarica, 1996).....	4
Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Vermerris in Nicholson, 2008).....	9
Slika 3: Strukturna formula olevuropeina (Vermerris in Nicholson, 2008).....	11
Slika 4: Strukturni formuli tirozola in hidroksitirozola (Škarica in sod., 2000).....	11
Slika 5: Shema ekstrakcijskega postopka.....	15
Slika 6: Umeritvena krivulja z galno kislino.....	17
Slika 7: Umeritvena krivulja z raztopino glukoze.....	20
Slika 8: Vsebnost SFS v plodovih dveh sort oljke (Karbonaca in Buža) v različnih vegetacijskih obdobjih.....	24
Slika 9: Vsebnost SFS v listih dveh sort oljke (Karbonaca in Buža) v različnih vegetacijskih obdobjih in v komercialnem ekstraktu.....	25
Slika 10: Odvisnost % inhibicije radikala DPPH• od koncentracije fenolnih spojin ( $\gamma$ ) za ekstrakt plodu sorte Karbonaca pobranega v mesecu septembru.....	27
Slika 11: Odvisnost % inhibicije radikala DPPH• od masne koncentracije troloksa v reakcijski mešanici.....	32
Slika 12: Vrednosti $ED_{50\% \text{ DPPH}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ), dveh sort oljke, v različnih vegetacijskih obdobjih.....	33
Slika 13: Vrednosti $ED_{50\% \text{ DPPH}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) za komercialni ekstrakt in za ekstrakte listov dveh sort oljke, v različnih vegetacijskih obdobjih.....	33
Slika 14: Odvisnost % inhibicije radikala ABTS• <sup>+</sup> od koncentracije fenolnih spojin ( $\gamma$ ) za ekstrakt plodu sorte Buža pobranega v mesecu septembru.....	35
Slika 15: Odvisnost % inhibicije radikala ABTS• <sup>+</sup> od masne koncentracije troloksa v reakcijski mešanici.....	36
Slika 16: Vrednosti $ED_{50\% \text{ ABTS}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ), za ekstrakte plodov dveh sort oljke v različnih vegetacijskih obdobjih.....	37
Slika 17: Vrednosti $ED_{50\% \text{ ABTS}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) za raztopino troloks in ekstrakte listov dveh sort oljke v različnih vegetacijskih obdobjih.....	38



Slika 18: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/kg) v različnih vegetacijskih obdobjih.....40

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AH	antioksidant
ABTS	2,2'- azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kislina)
DNS	3,5-dinitrosalicilna kislina
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
$ED_{50\%}$	koncentracija fenolnih spojin, ki je odgovorna za 50% zmanjšanje začetne količine prostih radikalov
FC	Folin-Ciocalteu
GRAS	Generally Recognized As Safe
LDL	lipoproteini nižje gostote
LOO•	peroksilni radikal
LOOH	peroksid
SFS	skupne fenolne spojine
R•	prosti radikal
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
$\gamma$	masna koncentracija

## 1 UVOD

Običajna presnova lahko povzroča tvorbo znatne količine prostih radikalov, ki se lahko še poveča ob izpostavljenosti stresu, nekaterim kemikalijam, sevanju, vplivu alkohola in cigaret, težkim kovinam, snovem izpušnih plinov ter prekajeni in zapečeni hrani.

V našem organizmu sta dve vrsti antioksidantov: endogeni in eksogeni. Endogene antioksidante tvori človeški organizem, eksogene dobimo s hrano. Meja med njimi ni ostra. Ljudje smo sicer vsejedi (uživamo hrano rastlinskega in živalskega izvora), vendar je rastlinska hrana značilnost našega evolucijskega razvoja. Zaradi tega smo močno odvisni od antioksidativnih snovi rastlinskega izvora, na primer od askorbinske kisline (vitamina C). Ugotovljena je povezava med eksogenimi antioksidanti iz hrane in nastankom raka ter drugih bolezni, ki so povezane z oksidativnim stresom v organizmu (Griffith in sod., 1944; Schilcher in sod., 1990; Hertog in sod., 1995; He in sod., 1995; Goldbohm in sod., 1998; Rechkemmer in Pool-Zobel, 1998). Zato obstaja vse večje zanimanje po naravnih antioksidantih kot bioaktivnih sestavinah hrane.

Sredozemski način prehranjevanja, ki vključuje relativno visok vnos svežega sadja in zelenjave ter rib in oljčnega olja, se najverjetneje tudi zaradi visoke vsebnosti bioaktivnih komponent, kot so vitamini in fenolne spojine, vedno bolj povezuje z zmanjševanjem kardiovaskularnih obolenj in pojavom raka, preprečevanjem oksidacije lipoproteinov nizke gostote (LDL) ter zniževanjem skupnega holesterola in trigliceridov v krvi (Benavente-Garcia in sod., 2000; Martin-Garcia in sod., 2003).

Fenolne spojine predstavljajo veliko skupino molekul z različnimi funkcijami, ki so povezane z rastjo in razvojem rastlin ter njihovo obrambo. Fenolne spojine nastopajo kot signalne molekule, pigmenti, vplivajo na senzorične lastnosti rastlinskih plodov, ščitijo rastlino pred insekti, glivami, bakterijami in virusi. Oljke in pripravki iz oljk predstavljajo potencialni vir naravnih antioksidantov, ki bi se lahko uporabljali v živilski, kozmetični in farmacevtski industriji, s čimer bi lahko zmanjšali uporabo umetnih antioksidantov. Ekonomsko in tehnološko so rastlinski fenoli pomembni, ker prispevajo tudi k okusu, vonju in barvi živil ter pijač.

V zadnjem času tako porabniki, kot tudi proizvajalci stremijo k pripravi živil, ki bi lahko imela oznako »naravno živilo«. Zato potekajo raziskave predvsem v smeri identifikacije in uporabe novih, »naravnih« vrst antioksidantov v živilstvu.

Stranski proizvodi pri pridelavi in predelavi živil rastlinskega izvora so odličen vir naravnih fenolnih spojin. Naravni antioksidanti iz industrijskih ostankov, se lahko uporabljajo v proizvodnji aditivov, ki preprečujejo peroksidacijo maščob in nezaželjene oksidacijske spremembe hrane. Na področju Sredozemlja so listi oljke eden od stranskih produktov gojenja oljk. Predstavljajo okrog 10 % količine industrijsko predelanih oljk. Listi oljke se smatrajo kot cenen material, bogat s polifenoli, ki bi se lahko uporabil kot dodatek z namenom izboljšanja obstojnosti in hranilne vrednosti živil. Na tržišču že nekaj časa obstajajo prehranska dopolnila z ekstrakti oljčnih listov v obliki tablet.

Glavni fenolni sestavini listov in plodov oljke sta olevropein in ligstrozid. Veliko *in vitro* raziskav je potrdilo pozitivne učinke omenjenih polifenolov. Vpliv antioksidantov na zaviranje avtooksidacije je odvisen od mnogih dejavnikov, kot so koncentracija in struktura antioksidanta, pogoji, pri katerih poteka oksidacija in od narave vzorca. Pogosto fenolne spojine izgubijo svojo antioksidacijsko sposobnost pri visokih koncentracijah in reagirajo kot prooksidanti. Pogosto naravni antioksidanti kažejo nižjo antioksidacijsko sposobnost v primerjavi s sintetičnimi, vendar jih zakonodaja kvantitativno ne omejuje, kar je velika prednost. Naravni antioksidanti imajo prednosti in pomanjkljivosti v primerjavi s sintetičnimi.

Tako so naravni antioksidanti bolj sprejemljivi, porabniki jih imajo za bolj varne, posebnih testov o njihovi škodljivosti ni potrebno opraviti, ker veljajo za splošno priznane kot varne – generally recognized as safe (GRAS) sestavine živil. Po drugi strani so taki antioksidanti lahko manj učinkoviti, lastnosti se lahko razlikujejo med različnimi pripravki, lahko spremenijo barvo, ter povzročijo priokus in slabši vonj izdelka. Težnja po cenemem, obnovljivem in bogatem viru naravnih antioksidantov vabi vse večji interes znanstvenikov, zdravnikov in tehnologov.

Kljub naštetim pozitivnim učinkom polifenolov kot naravnih antioksidantov, je potrebno narediti še veliko raziskav na področju praktičnih aspektov pridobivanja naravnih antioksidantov iz rastlin, vključujoč ekstrahiranje ter varnost za potrošnika (Abram in Simčič, 1997; Jemai in sod., 2008; Marsilio in sod., 2001).

## 1.1 NAMEN NALOGE

Cilj diplomskega dela je bil pridobiti ekstrakte fenolnih spojin iz listov in plodov dveh sort oljke (Buža in Karbonaca), zbranih v različnih vegetacijskih obdobjih. V omenjenih ekstraktih smo želeli določiti vsebnost fenolnih spojin in njihovo antioksidativno učinkovitost in ugotoviti, ali na vsebnost fenolnih spojin in njihovo antioksidativno učinkovitost vplivata vegetacijsko obdobje ter sorta.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo naraščanje koncentracije fenolnih spojin v listih in plodovih oljke v teku vegetacije. Predpostavljamo, da na antioksidativno učinkovitost ekstraktov vpliva obdobje vegetacije, v katerem smo pridobili substrat (listi, oljke). Prav tako predvidevamo, da obstaja razlika v vsebnosti fenolnih spojin in antioksidativni učinkovitosti med preiskovanima sortama oljke.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OLJKA (*Olea europaea* L.)

Oljka (*Olea europaea* L., družina *Oleaceae*) je zimzelena, kserofitna rastlina, ki jo človek goji zaradi plodov. Zapisi kažejo, da izvira s Krete (pred 5-7 tisoč let). Njena uporaba se je hitro razširila preko Egipta, Grčije, Palestine do Male Azije. Oljke so omenjene v Bibliji, naslikane v starodavni Egipčanski umetnosti in so imele pomembno vlogo v Grški mitologiji. Od starodavnih časov so se oljke uporabljale kot hrana, kurivo in medicinski pripomoček pri mnogih civilizacijah. Danes ima gojenje oljke komercialni status pri vseh državah s Sredozemsko klimo, uživajo pa se vse bolj tudi v zahodnih državah sveta. Vejica oljke simbolizira mir in modrost po celem svetu (Raina, 2003).



Slika 1: Oljka (*Olea europaea* L.) (Škarica in sod., 1996)

Večina oljk je namenjena pridobivanju olja, čeprav se precejšen del predela za direktno potrošnjo. Po statističnih podatkih (IOOC, 2010) se letno predela okrog 3022500 ton namiznih oljk, od katerih se polovica predela v državah EU. V sredozemskem delu območja Slovenije in Hrvaške je zasajenih skupaj okoli 5600 hektarjev oljk, in sicer 1500 hektarjev v slovenski Istri, 2000 hektarjev v hrvaški Istri in 2100 hektarjev na Kvarnerskih otokih (Krk, Cres, Lošinj in Rab).

Oljke sort Buža in Karbonaca prvič obrodijo po štirih do petih letih. Pridetek je odvisen od klimatskih pogojev in agrotehniških ukrepov. Iz 1 kg plodov oljke sorte Buža je možno pridelati do 1.7 litrov oljčnega olja, iz plodov oljke sorte Karbonaca pa do 2.2 litrov oljčnega olja.

Plodovi in listi oljke predstavljajo potencialno zelo bogat vir nekaterih naravnih antioksidantov, kot so karotenoidi, tokoferoli, flavonoidi ter druge fenolne spojine, med katerimi so najbolj zastopani sekoiridoidni derivati, kot je olevropein in dimetilolevropein. V zgodovini so se listi oljke uporabljali kot ljudsko zdravilo za preprečevanje povišane temperature, mrzlice in drugih bolezni, kot je malarija. Nekatere preiskave poročajo, da ekstrakti listov oljke znižujejo krvni pritisk nekaterih živali, povečujejo krvni pretok srčnih arterij ter preprečujejo krče črevesnih mišic. Grenka sestavina olevropein, ki je glavna sekoiridoidna komponenta oljk in njenih listov, kaže potencialno protivnetno sposobnost in učinkuje proti nekaterim virusom, bakterijam, kvasovkam, plesnim in drugim parazitom.

Oljke predstavljajo tudi bogat vir maščobnih kislin. V oljki se nahajajo maščobne kisline z 12-24 ogljikovih atomov, največ je tistih s 16 in 18 C atomi. Lahko so nasičene in nenasičene. Med nasičenimi maščobnimi kislinami sta za oljke značilni palmitinska in stearinska maščobna kislina. Maščobe bogate z nasičenimi maščobnimi kislinami zvišujejo raven holesterola v krvi, kar je značilno predvsem za palmitinsko kislino.

Nenasičene maščobne kisline imajo v svoji molekuli eno ali več dvojnih vezi med ogljikovimi atomi v verigi. Glede na število dvojnih vezi jih delimo na:

- mononenasičene (oleinska 55-83 %, palmitoleinska 0,3-5 %, gandoleinska do 0,3 %)
- polinenasičene, ki so esencialne maščobne kisline (linolna 3,5-21 %, linolenska do 0,9 %)  
(Škarica in sod., 1996).

## 2.2 ANTIOKSIDANTI

### 2.2.1 Prosti radikali in oksidativni stres

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim samskim elektronom. So visoko reaktivne zvrsti, ki poškodujejo celične strukture vključno z nukleinskimi kislinami. So rezultat normalne celične presnove (dihanja), in posledica dejavnikov okolja: UV in gama žarkov, toplote, kajenja, onesnaženega okolja itn.

Tudi nekatere snovi in zdravila (aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki itd.) povzročajo nastajanje prostih radikalov. Porušeno ravnotežje med prostimi radikali in učinkovitostjo antioksidativnih obrambnih sistemov celice imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov ter z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul (Korošec, 2000).

Da bi lahko definirali proces, ki se odvija v oziroma med celicami, je pomembno razumevanje delovanja prostih radikalov. Prosti radikali se sproščajo v normalnih metabolnih procesih. V teh procesih kisikove molekule izgubljajo elektrone, kar povzroči nestabilno molekulo (prosti radikal). Prosti radikali reagirajo z nekaterimi molekulami (DNK, proteini, maščobne kisline) in s tem lahko povzročajo okvare na celicah (De Macario, 2000).

Povzročijo lahko poškodbo lipidov (peroksidacija maščobnih kislin, spremenjena prepustnost membran), proteinov (oksidacija SH-skupin, aktivacija encimov (kolagenaze), inaktivacija encimov (npr. z inhibitorjem proteaz  $\alpha_1$ -antitripsinom)) ter poškodbo DNK (cepitev verige, povečana poraba nikotinamid adenin dinukleotida, motena sinteza ATP). Kisikovi prosti radikali so udeleženi pri številnih normalnih in patoloških procesih v telesu.

Prosti radikali delujejo znotraj celice in tudi zunajcelično. V verižni reakciji tvorijo nove proste radikale, ki dodatno poškodujejo celične strukture. Viri prostih radikalov v celicah so celično mitohondrijalno dihanje, flavoproteini, lipooksigenaze, hemoglobin, ciklooksigenaze, ksantinska oksidaza, peroksisomi, dvovalentne kovine, sevanje, kajenje, itn.

Pomembna je njihova vloga pri staranju, degenerativnih boleznih, raku, ishemiji, Parkinsonovi in Chronovi bolezni, pri sladkorni bolezni, katarakti, bolezni jeter in ledvic, pri zastrupitvah, pri fizičnih obremenitvah in pri prehrani, v kateri primanjkuje naravnih antioksidantov (vitaminov A, C, E,  $\beta$ -karotena, flavonoidov, itn.), aminokislin, ter elementov v sledovih (Se, Zn, Mn, Cu). Za preprečevanje in popravilo oksidativnih poškodb celic je pomembno vzpostaviti antioksidativni sistem (Korošec, 2000; Moure in sod., 2001).

### 2.2.2 Značilnosti antioksidantov

Antioksidanti so naravne ali sintetične snovi, ki imajo sposobnost, da že v majhnih koncentracijah preprečujejo ali zavirajo nezaželene oksidativne spremembe v bioloških sistemih. Z biološkimi sistemi je mišljena hrana in živi organizmi (Salobir, 2000).

So tiste sestavine živil oz. tisti dodatki živilom, ki so bodisi lovilci prostih radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo ali zmanjšujejo pojav žarkosti živil in druge oksidativne spremembe senzoričnih in prehranskih lastnosti živil (Loliger, 1991). V živilih so take oksidativne spremembe na primer potemnitev narezanega sadja, propadanje vitamina C, vitamina A in drugih na kisik občutljivih vitaminov, arom in barvil, predvsem pa oksidativno kvarjenje maščob. S svojim delovanjem antioksidanti ščitijo pred posledicami oksidativnega kvara.

Količina antioksidantov v hrani je odvisna od tega, katero vrsto rastline izberemo (Velioglu in sod., 1998), od vsebnosti antioksidantov v rastlinah ter od načina predelave. Ena najpomembnejših funkcij nekaterih antioksidativnih snovi (npr. polifenolov) je, da v večji koncentraciji lahko ščitijo rastline pred napadi virusov, bakterij, kvasovk in tudi rastlinojedih organizmov. S trpkimi in grenkimi snovmi se rastline ščitijo tudi pred človekom. Prevelika količina polifenolov lahko človeku celo škodi. Da bi vseeno lahko uživali dele rastlin s polifenoli, se je tekom evolucije pri nekaterih rastlinojedih živalih in tudi pri človeku razvila zmožnost, da s sintezo posebnih beljakovin, ki se pojavljajo v naši slini, preprečimo škodljive učinke polifenolov (Charlton in sod., 1998).

Antioksidanti, ki telo ščitijo pred učinki prostih radikalov so encimi (superoksidna dismutaza, katalaza, glutationska peroksidaza, DNA popravljalni encimi, itn.), vitamini (A, E, C), betakarotenoidi, polifenoli itn.

Nekatere antioksidante sintetizira telo samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (antioksidantni vitamini, kovine v sledovih) (Korošec, 2000).



Kako antioksidanti preprečujejo oksidacijo, je odvisno od vrste antioksidanta. Antioksidanti so lahko encimski ali neencimski sistemi, topni v vodi ali v maščobah (Briviba in Sies, 1994). Antioksidacijski sistemi varujejo živilo na eni strani in organizem na drugi strani pred učinki prostih radikalov in jih danes lahko delimo v tri skupine: (Gutteridge in Halliwell, 1994):

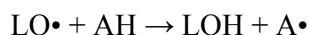
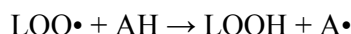
1. Primarni antioksidanti nastajajo v organizmu ali jih tvorijo mikroorganizmi, to so predvsem encimi, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, ceruloplazmin. Med primarne antioksidante prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije.

2. Sekundarni antioksidanti nevtralizirajo na novo nastale proste radikale in preprečujejo, da bi vstopali v verižne reakcije in tvorili nove proste radikale. Njihova značilnost je, da reagirajo s kovinskimi ioni, ki so katalizatorji oksidacije, odvzemajo kisik iz medija, razgrajujejo hidroperokside do komponent, ki niso radikali, absorbirajo UV svetlobo in nenazadnje deaktivirajo aktivni kisik. Sekundarne antioksidante razvrščamo v dve podskupini:

- a) Odjemalci kisika (askorbinska kislina, karotenoidi, polifenoli, sulfiti itn.)
- b) Odjemalci radikalov (polifenoli, karotenoidi, tokoferoli)

3. Terciarni antioksidanti so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice (encimi, ki »popravljajo« poškodbe DNK; metionin sulfoksid reduktaza).

Za fenolne antioksidante (AH) predpostavljajo, da zaustavljajo oksidacijo lipidov z oddajo vodikovega atoma lipidnim radikalom ( $\text{LOO}\cdot$ ,  $\text{LO}\cdot$ ) (Shahidi in Naczk, 1995). Učinkovitost antioksidantov je tem večja, čim manjša je jakost vezi A-H. Pri tem nastali fenoksilni radikal ( $\text{A}\cdot$ ) ne sme sprožiti novih radikalnih reakcij.



...1

Fenolni antioksidanti so dobri donorji vodika ali elektronov, poleg tega so njihovi radikali relativno stabilni zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov v aromatskem obroču (Shahidi in Naczk, 1995).

Po Gutteridgeu in Halliwellu (1994) se nezadostnost oz. neučinkovitost antioksidacijskega delovanja v metabolizmu človeka in živali izrazi v boleznih kot rast rakavih tkiv, ateroskleroza, revmatoidni artritis, diabetes, očesne mrežnice, prezgodnji porod, okvare jeter, okvare respiratorne funkcije, in okvare živčnega sistema. Z ustreznim uživanjem sekundarnih antioksidantov v organizmu lahko vzpostavimo ravnotežje in preprečimo nastanek s tem povezanih bolezni. Naravni antioksidanti so tisti, ki so proizvedeni iz mikroorganizmov oz. so izolirani iz rastlin. Nekatere prednosti in pomanjkljivosti naravnih antioksidantov v primerjavi s sintetičnimi so:

Prednosti:

- sprejemljivejši za potrošnika, saj le-ta verjame v kakovost naravnega proizvoda;
- če je antioksidant sestavina hrane, dodatno testiranje ni potrebno, saj ga uvrščamo v kategorijo varnih proizvodov (generally recognized as safe (GRAS) (Raspor in sod., 2000).

Pomanjkljivosti:

- funkcionalne lastnosti različnih pripravkov antioksidanta se razlikujejo, če ta ni dovolj standardiziran;
- varnost običajno ni znana;
- pri uporabi lahko spremeni značilno barvo in okus izdelka (Madhavi in sod., 1996).

Škodljivi vplivi, ki se pojavljajo v vsakdanjem življenju, so manj nevarni ob primerni prehrani, ki je dovolj bogata z antioksidanti in uravnotežena glede na vnos elementov v sledovih, ki so osnova za izgradnjo endogenih antioksidantov. Antioksidanti omogočajo tudi ustrezno delovanje popravljalnih mehanizmov (tudi na nivoju popravljanja DNK), ter ustrezno uravnavanje genetsko programirane celične smrti (apoptoza), s čimer se bistveno zmanjša tveganje za mutacije in nastanek rakastih novotvorb. Pri uporabi antioksidantov je potrebno najti kompromis v količini in sestavi, vse pa je v tesni povezavi z njihovimi vplivi na zdravje (COST, 2000).

### 2.3 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več –OH skupin, direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi so običajne spojine z več –OH skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime - polifenoli (Abram in Simčič, 1997; Strack, 1997).

Delujejo antioksidativno in znatno zmanjšujejo škodljivo delovanje reaktivnih molekul, kot so reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in nekatere dušikove spojine, pri fizioloških procesih v človeškem organizmu. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti rastlin, ki ščitijo rastline pred škodljivimi vplivi sončnih žarkov, imajo pa tudi nekaj pomembnih vlog za rastlino. Ob okužbi rastline ali ob napadu škodljivcev se z geni določena izgradnja sekundarnih metabolitov rastline zelo pospeši.

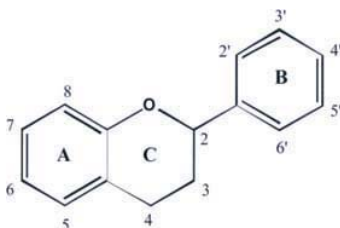
Če je koncentracija sekundarnih metabolitov v rastlini zelo visoka, bi ti lahko poškodovali tudi lastno rastlinsko tkivo. V rastlinah se zato antioksidanti v večjih količinah ne kopičijo v citoplazmi celic, ampak v ločenih predelih, včasih ločeno v vakuolah, ali pa celo v tkivih, v katerih ni več živih celic. Vsebnost antioksidativnih snovi v rastlinah je seveda lahko odvisna tako od genetskih kot tudi od ekoloških dejavnikov (Hertog in sod., 1995).

Pri poimenovanju fenolnih spojin je v literaturi vlada precejšnja zmeda in zato se priporoča uporaba razdelitve po številu C atomov v molekuli (Preglednica 1)(Goodwin in Mercer, 1983).

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Goodwin in Mercer, 1983.)

Št. C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C <sub>6</sub>	Fenoli
7	C <sub>6</sub> C <sub>1</sub>	Fenolne kisline
8	C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	Fenilacetne kisline
9	C <sub>6</sub> C <sub>3</sub>	Hidroksicimetne kisline Fenilpropani Kumarini Izokumarini Kromoni
10	C <sub>6</sub> C <sub>4</sub>	Naftokinoni
13	C <sub>6</sub> C <sub>1</sub> C <sub>6</sub>	Ksantoni
14	C <sub>6</sub> C <sub>2</sub> C <sub>6</sub>	Stilbeni Antrakinoni
15	C <sub>6</sub> C <sub>3</sub> C <sub>6</sub>	Flavonoidi
18	(C <sub>6</sub> C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignani Neolignani
30	(C <sub>6</sub> C <sub>3</sub> C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoidi
n	(C <sub>6</sub> C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> (C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> (C <sub>6</sub> C <sub>3</sub> C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Lignini Melanini kondenzirani tanini

Flavonoidi so ena izmed najbolj razširjenih skupin vodotopnih fenolnih spojin. Zgrajeni so iz 15 C atomov. Osnovno strukturno formulo flavonoidov oziroma 2-fenilbenzopirana prikazuje slika 2 (Abram, 2000).



Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Vermerris in Nicholson, 2008)

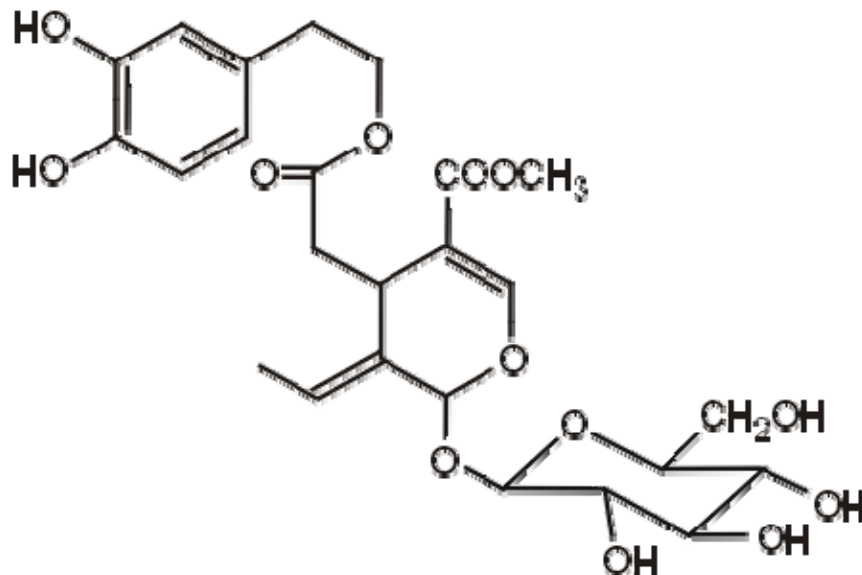
Med flavonoide spadajo tako spojine, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega C<sub>3</sub> obroča, kot tudi po različnih substituentah na obročih A, B, C, zato ne preseneča, da je do sedaj poznanih več kot 5000 različnih flavonoidov (Abram in Simčič, 1997). V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. Zaradi svojega grenkega okusa odganjajo parazite in, ker lahko absorbirajo UV svetlobo, delujejo kot zaščita rastline pred UV žarki (Jovanovic in sod., 1997). Flavonoidom kot antioksidantom pripisujejo predvsem zmožnost lovljenja radikalov, za kar je pomembna stabilnost radikala antioksidanta. Če pogledamo flavonoide, ki imajo nasičen C obroč, tako kot flavanoli in sorodne spojine, vidimo, da je za antioksidacijsko učinkovitost pomembno število vseh –OH skupin v molekuli. Zato estri z galno kislino vezano na C3 močno povečajo antioksidacijsko učinkovitost takih spojin. Ne samo, da so zmožni loviti proste radikale, temveč so tudi dobri agensi za vezavo Cu<sup>2+</sup> ionov, ki so nujni za začetek peroksidacije lipidov (Morel in sod., 1997). Flavonoidi so antioksidanti, ki lahko preprečijo peroksidacijo lipidov na več načinov (Briviba in Sies, 1994):

- z lovljenjem radikalov ( O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, HO•, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> in Fe(OH)<sub>3</sub>•),
- z vezavo kovinskih ionov,
- z lovljenjem lipidnih peroksilnih radikalov in
- z inhibicijo encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek prostih radikalov

Tako oljčni listi, kot tudi oljke predstavljajo izjemno bogat vir fenolnih spojin. Glavne fenolne spojine v oljčnih listih lahko razdelimo v 5 skupin:

- olevropeozidi (oleuropein in verbaskozid)
- flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin in diosmetin)
- flavonoli (rutin)
- flavan-3-oli (katehin)
- substituirani fenoli (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska kislina in kavna kislina) (Benavente-Garcia in sod., 2000)

Med fenolnimi spojinami vsebujejo oljčni listi največ olevropeina, sledijo hidroksitirozol in flavanon-7-glukozidi luteolina, apigenina in verbaskozida. Hidroksitirozol je prekurzor olevropeina, verbaskozid pa je konjugiran glikozid hidroksitirozola in kavne kislina (Benavente-Garcia in sod., 2000). Olevropein (slika 3) je glikozid, spojina hidroksitirozolnega estra elenolne kisline z β-D-glukopiranozo.



Slika 3: Strukturna formula oleuropeina (Vermerris in Nicholson, 2008)

Koncentracija oleuropeina je v plodovih najvišja na prehodu pomladi v poletje. Z dozorevanjem njegova koncentracija pada, saj potekajo reakcije encimske hidrolize, pri čemer nastane aglikon 3,4-dihidroksifeniletanol elenolna kislina (3,4-DHPEA-EA) (Amiot in sod., 1986.; Capasso in sod., 1996), ki se kasneje prek vrste reakcij razgradi do končnih oblik - elenolne kisline in hidroksitirozola (Montedoro in sod., 1992a; Montedoro in sod., 1992b; Montedoro in sod., 1993; Brenes in sod., 1999).

Podobno je pri ligstrozidu, ki je spojina tirozolnega estra elenolne kisline z  $\beta$ -D-glukopiranozo. Pri dozorevanju oljčnih plodov (in tudi v procesu stiskanja olja ter kasneje v samih oljčnih oljih) tako nastajata še dve fenolni spojini in sicer tirozol ter hidroksitirozol. Njuna struktura je prikazana na sliki 4.



Tirozol

Hidroksitirozol

Slika 4: Strukturni formuli tirozola in hidroksitirozola (Škarica in sod., 2000)

Tirozol in olevropein imata tudi močno biološko antioksidativno delovanje (Saija in sod., 1999), saj inhibirata strjevanje krvničk in kopičenje tromboksana v krvi (Petroni in sod., 1995). Dokazano je, da olevropein, tirozol in hidroksitirozol delujejo tudi antimikrobno. Inhibirajo namreč razvoj enterotoksina B iz bakterije *Staphylococcus aureus*, ovirajo razvoj spor bakterije *Bacillus cereus*, tirozol reagira tudi kot mikotoksini. Tirozol, olevropein pa tudi flavonoid luteolin preprečujejo oksidacijo lipoproteinov nizke gostote (LDL) *in vitro*. Olevropein daje oljki odpornost proti boleznim in napadom insektov. Tako kot ostali polifenoli je odgovoren tudi za grenak okus oljk (Castelli in sod., 1999; Visioli in sod., 1999).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Plodovi in listi oljke (*Olea europaea* L.)

Za analize smo uporabili plodove in liste dveh avtohtonih istrskih sort Buža in Karbonaca. Plodove in liste oljke obeh omenjenih sort smo pobirali na področju južne Istre (Vodnjan) v mesecu avgustu, septembru in oktobru leta 2009. Vzorce smo takoj po pobiranju vakuumsko zapakirali in zamrznili na -20 °C.

##### 3.1.2 Komercialni ekstrakt

- Olive Leaf 1500, ekstrakt divje oljke (*Olea europaea* L.),
- ena kapsula ustreza 1,5 g posušenih listov,
- proizvajalec: Blooms health products, Australia

##### 3.1.3 Reagenti

- etanol (96%, Merck, Nemčija)
- DPPH• reagent (Sigma, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Švica)
- tekoči dušik (Messer Griesheim, Nemčija)
- fenol (Sigma, Nemčija)
- natrijev sulfit (analitske čistosti, Zorka Šabac, Srbija)
- 3,5-dinitrosalicilna kislina (Fischer scientific company, ZDA)
- kalij-natrijev tartarat tetrahidrat (Merck, Nemčija)
- Troloks (Sigma, Nemčija)
- kalijev peroksodisulfat (Sigma, Nemčija)
- ABTS reagent (Sigma, Nemčija)

### 3.1.4 Pribor

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- tehtnica (Mettler Toledo AT201, Švica)
- ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52, Nemčija)
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, Združene države Amerike)
- magnetno mešalo (IKA® RH basic KT/C, Nemčija)
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija)
- centrifuga (Tehtnica Centric 322B, Slovenija)
- vodna kopel (Büchi B-480, Švica)
- vodna kopel (Julabo MP-5, Julabo labortechnik, Nemčija)
- hladilnik z zmrzovalnikom (Gorenje HZS 2926, Slovenija)
- stresalnik (Tehtnica Vibromix 314 EVT, Slovenija)
- mešalnik (IKA® MS3 basic, Nemčija)



## 3.2 METODE

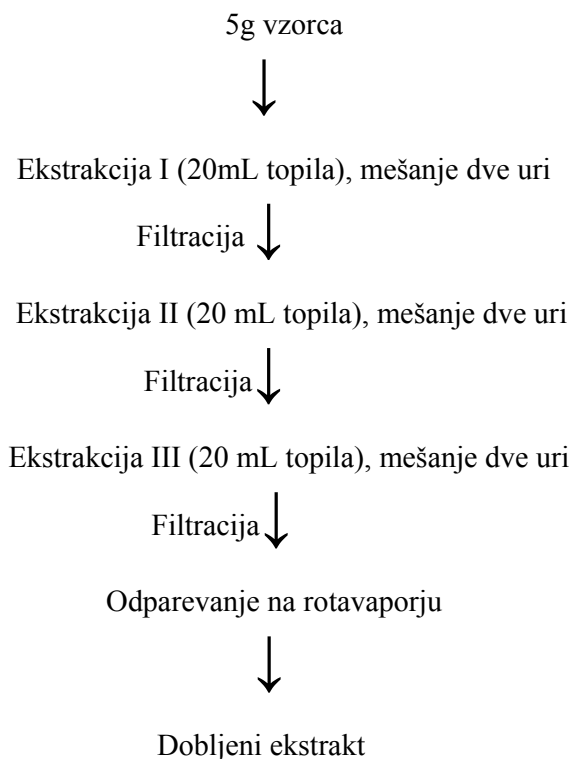
### 3.2.1 Pridobivanje meteoroloških podatkov

S pomočjo podatkov iz državnega hidrometeorološkega zavoda (Zagreb, Hrvaška) smo spremljali hidrometeorološke podatke v vseh treh preiskovanih obdobjih (avgust, september, oktober).

### 3.2.2 Določanje skupnih fenolnih spojin (SFS) v plodovih in listih oljke

#### 3.2.2.1 Ekstrakcija

Zatehtali smo približno 5g listov in izkoščičenih plodov oljke, prelili s tekočim dušikom ter strli v terilnici. Vzorce smo ekstrahirali s topilom etanol:voda (70:30 v/v) pri sobni temperaturi. Ekstrakcija je bila izvedena v treh stopnjah in sicer tako, da smo vsakič topilo odfiltrirali in nadomestili s svežim. Filtrate smo nato združili. Vsaka od treh stopenj ekstrakcije je trajala dve uri. Postopek ekstrakcije je bil opravljen po modificirani metodi, ki je opisana v literaturi (Matthäus, 2002) in je shematsko prikazan na sliki 5.



Slika 5: Shema ekstrakcijskega postopka

Suhi preostanek po odparevanju ekstrakcijskega topila smo raztopili v 15 mL 96 % etanola.

### 3.2.2.2 Folin-Ciocalteu metoda

Postopek določanja skupnih fenolnih spojin v preiskovanih ekstraktih je povzet po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). V plastične mikrocentrifugirke smo odpipetirali:

- 0,20 mL ustrezno razredčenega vzorca
- 0,125 mL Folin-Ciocalteu reagenta (razredčen z vodo v razmerju 1:2, v/v)
- 0,125 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata
- 0,55 mL bidestilirane vode

Celotni volumen mešanice je znašal 1 mL. Vsebino mikrocentrifugirke smo premešali in centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih/minuto. Po 40 minutah smo merili absorbanco pri 765nm ( $A_{765}$ ).

V komercialnem ekstraktu smo določili SFS tako, da smo zatehtali 5g komercialnega ekstrakta. Potem smo izvedli ekstrakcijo po opisanem postopku (slika 5). Dobljeni ekstrakt smo raztopili v 15 mL 96 % etanola, ter v skladu s Folin-Ciocalteu metodo izmerili absorbanco.

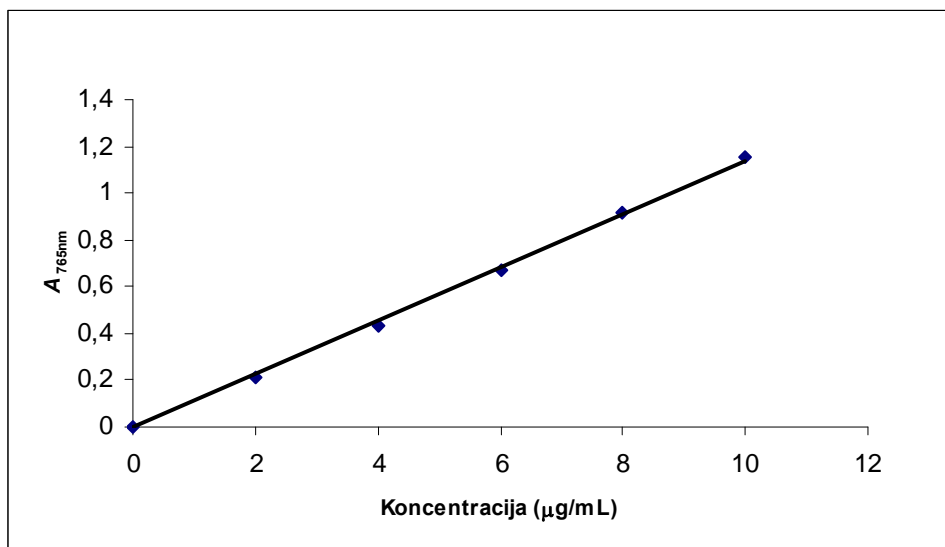
### 3.2.2.3 Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. V 10 mL bučko smo zatehtali 10 mg galne kisline in razredčili do oznake z 96 % etanolom. Koncentracija galne kisline v pripravljeni izhodni raztopini je bila 1 mg/mL. V mikrocentrifugirke smo dodali različno izbrane volumne izhodne raztopine in v skladu s Folin-Ciocalteu metodo izmerili absorbanco. V preglednici so podane vrednosti izmerjenih absorbanco in vrednosti masnih koncentracij galne kisline v reakcijski mešanici ( $\gamma_{g.k.}$ ).

Preglednica 2: Volumen ( $V$ ) izhodne raztopine galne kisline, vrednosti masnih koncentracij galne kisline v reakcijski mešanici ( $\gamma_{g.k.}$ ) in povprečne vrednosti za absorbanco ( $A_{765}$ ).

$V$ ( $\mu\text{L}$ )	$\gamma_{g.k.}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}_{765}$
20	2	0,209
40	4	0,430
60	6	0,666
80	8	0,919
100	10	1,150

Iz izmerjenih absorbanc pri ustreznih masnih koncentracijah galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili smerni koeficient premice. Vrednost koeficienta  $k$  je  $0,1136 \pm 0,001$ .



Slika 6: Umeritvena krivulja z galno kislino

Masno koncentracijo SFS smo izračunali po enačbi:

$$\gamma_{\text{g.k.}} = A_{765} / k$$

...2

Vsebnost SFS v vzorcih smo izrazili kot maso galne kisline na gram vzorca. Izračunali smo jo iz koncentracije SFS v reakcijski mešanici, razredčitve ekstrakta in mase vzorca.

### 3.2.3 Analiza DPPH•

Analizo sposobnosti lovljenja prostih radikalov smo povzeli po metodi, ki so jo opisali Brand-Williams in sodelavci (1995). Metoda temelji na spektrofotometričnem sledenju spremembe barve stabilnega prostega radikala 2,2 difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH•), ki absorbira svetlobo pri 517 nm. Postopek je potekal tako, da smo v kiveto najprej odpipetirali 2,9 mL pripravljene etanolne raztopine DPPH• (0,1 mmol/L), nato smo dodali 0,1 mL raztopine ekstrakta oziroma raztopine troloksa ter po 30 minutah merili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm ( $A_{517}$ ) proti slepem vzorcu (96 % etanol). Raztopino troloksa smo pripravili tako, da smo 6,35 mg troloksa raztopili v 10 mL 70% etanola. Vsako meritev smo opravili v treh paralelkah. Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca ( $A_{k517}$ ), kjer smo k 2,9 mL raztopine DPPH• dodali 0,1 mL 96 % etanola.

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo izrazili kot delež inhibicije (%):

$$\% \text{ inhibicije DPPH}\bullet = [(A_{k517} - A_{517}) / A_{k517}] \times 100 \quad \dots 3$$

### 3.2.4 Analiza ABTS•<sup>+</sup>

Analizo sposobnosti lovljenja prostih radikalov smo povzeli po metodi, ki so jo opisali Re in sodelavci (1999). Metoda temelji na spektrofotometričnem sledenju spremembe barve, stabilnega radikala 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonske kisline) (ABTS•<sup>+</sup>), ki absorbira svetlobo pri 734 nm. Raztopino ABTS smo pripravili 16 ur pred začetkom analize, in sicer tako, da smo v 25 mL merilno bučko zatehtali 96,02 mg ABTS reagenta in 16,56 mg kalijevega peroksidsulfata ter dopolnili do oznake z bidestilirano vodo. Nadaljnji postopek je potekal tako da smo v stekleno epruveto odmerili 6 mL pripravljene raztopine ABTS-a, nato dodali še 0,06 mL raztopine ekstrakta oz. raztopine troloksa, premešali, termostatirali na 30°C, in po 6 minutah merili absorbanco pri valovni dolžini 734 nm ( $A_{734}$ ). Pripravljeno raztopino ABTS-a smo pred začetkom analize primerno razredčili (do  $A_{734} = 0.70 \pm 0.02$ ), kot je bilo opisano v literaturi. Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca ( $A_{k734}$ ), kjer smo k 6 mL pripravljene raztopine ABTS-a dodali 0,06 mL 96 % etanola. Vsako meritev smo opravili v treh paralelkah.

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo izrazili kot delež inhibicije (%):

$$\% \text{ inhibicije ABTS}\bullet^+ = [(A_{k734} - A_{734}) / A_{k734}] \times 100 \quad \dots 4$$

### 3.2.5 Analiza reducirajočih sladkorjev

Vsebnost reducirajočih sladkorjev smo določali po modificiranem postopku, ki sta ga opisala Wood in Bhat (1988). Raztopino z dinitrosalicilno (DNS) kislino smo pripravili tako, da smo 2,5 g 3,5-dinitrosalicilne kisline, 0,5 g fenola, 0,125 g natrijevega sulfita in 50 g kalij natrijevega tartrata raztopili v 125 mL vroče, 2 % raztopine NaOH ter razredčili do 125 mL z destilirano vodo. Iz tako pripravljene raztopine z DNS kislino smo k 0,1 mL primerno razredčenega ekstrakta in 1,4 mL bidestilirane vode dodali 3 mL raztopine z 3,5-dinitrosalicilno kislino. Reakcijsko mešanico smo pokrito inkubirali 5 minut pri 100°C. Po 5 minutah smo reakcijsko mešanico ohladili na sobno temperaturo ter izmerili absorbanco pri valovni dolžini 540 nm ( $A_{540}$ ). Slep vzorec smo pripravili po istem postopku, le da smo namesto ekstrakta v epruveto odmerili 0,1 mL 96 % etanola. Vsaka meritev je bila opravljena v treh paralelkah.

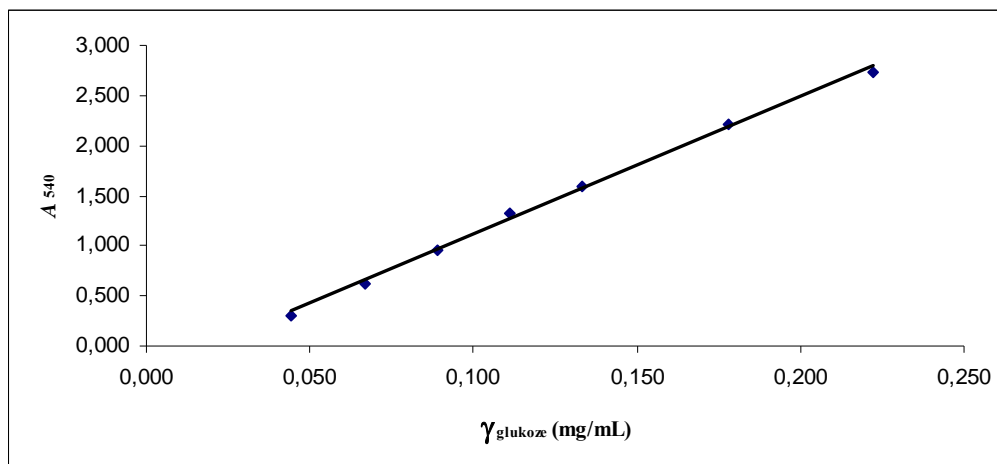
#### 3.2.5.1 Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili raztopino glukoze v vodi s koncentracijo 10 mg/mL. Postopek je bil isti, kot pri analizi ekstraktov, le da smo namesto ekstrakta v epruvete odmerili različno razredčene raztopine glukoze v vodi.

Preglednica 3: Masna koncentracija glukoze v raztopini ( $\gamma_{g.r.}$ ) in povprečne vrednosti izmerjenih absorban ( $\bar{A}_{540}$ ) v reakcijski mešanici.

$\gamma_{g.r.}$ (mg/ml)	$\bar{A}_{540}$
0,022	0,045
0,044	0,298
0,067	0,626
0,089	0,964
0,111	1,325
0,133	1,595
0,178	2,219
0,222	2,730

Iz masnih koncentracij raztopine glukoze in izmerjenih absorbanca smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili parametre premice, ki znašajo:  $k = 13,8 \pm 0,3$  in  $n = 0,30 \pm 0,04$ .



Slika 7: Umeritvena krivulja z raztopino glukoze

### 3.2.6 Statistična analiza

Vse analize smo opravili v treh paralelkah, vrednosti smo podali kot povprečje  $\pm$  standardni odklon ( $\sigma$ ), ki smo ga izračunali po enačbi:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad \dots 5$$

$\sigma$  = standardni odklon

$x_i$  = i-ta enota vzorca

$\bar{x}$  = aritmetična sredina vzorca

$N$  = število vseh enot

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 HIDROMETEOROLOŠKI PODATKI PREISKOVANIH OBDOBIJ

V preglednici 4 so prikazani podatki za povprečne temperature, povprečne mesečne količine padavin in povprečne mesečne vlažnosti zraka za področje Pule, Hrvaška v letu 2009.

Preglednica 4: Podatki za povprečne temperature, povprečne mesečne količine padavin in povprečne mesečne vlažnosti zraka za področje Pule, Hrvaška (2009).

	Leto 2009		
	AVGUST	SEPTEMBER	OKTOBER
Povprečne mesečne temperature (°C)	25,7	22,4	14,8
Povprečne mesečne količine padavin (mm/m <sup>2</sup> )	111,5	91,9	72,8
Povprečna mesečna vlažnost zraka (%)	67	68	69

### 4.2 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

V ekstraktih listov in plodov dveh sort oljke ter v komercialnem ekstraktu smo določili skupne fenole z metodo Folin-Ciocalteu. Vzorce listov in oljk smo pobirali v treh različnih vegetacijskih obdobjih in sicer v mesecu avgustu, septembru in oktobru. Metoda določanja SFS temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju, ki s pomočjo Folin-Ciocalteu reagenta daje modro obarvan kompleks. Povprečne vrednosti izmerjenih vrednosti absorbanca  $A_{765}$  ter koncentracije fenolnih spojin pri preiskovanih ekstraktih podaja preglednica 5.



Preglednica 5: Koncentracije fenolnih spojin ( $\gamma$ ) in izmerjenih absorbanc ( $A_{740}$ ) v ekstraktih plodov in listov oljke

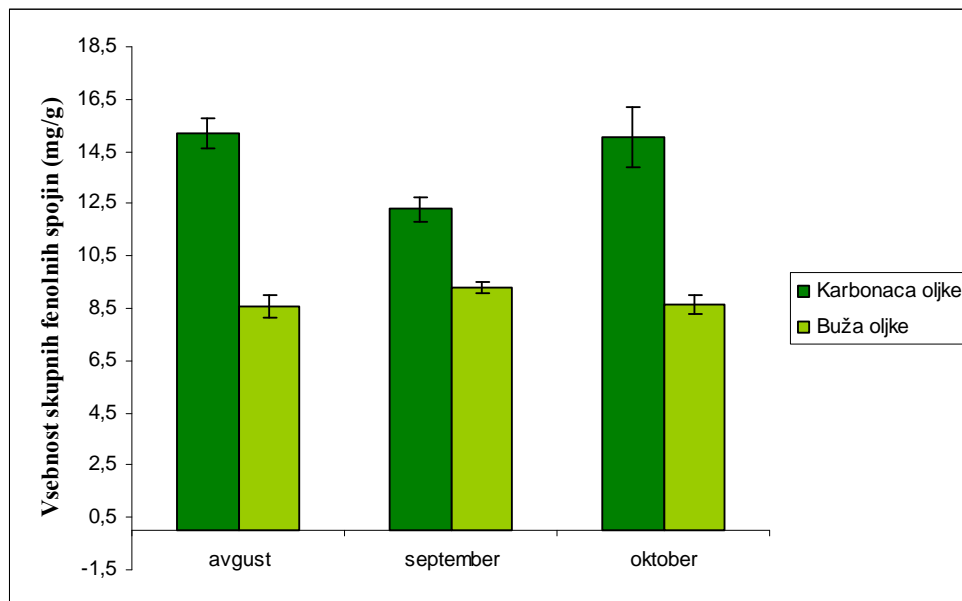
AVGUST 2009					
Ekstrakt	$A_{765}$ (par. 1)	$A_{765}$ (par. 2)	$A_{765}$ (par. 3)	$\bar{A}_{765} \pm SD$	$\gamma$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Karbonaca oljke	0,578	0,578	0,578	$0,578 \pm 2,5^{-5}$	5,1
Buža oljke	0,648	0,649	0,65	$0,649 \pm 0,0007$	2,9
Karbonaca listi	0,628	0,629	0,629	$0,629 \pm 0,0005$	5,5
Buža listi	0,638	0,638	0,638	$0,638 \pm 0,0001$	5,6
SEPTEMBER 2009					
Karbonaca oljke	0,932	0,932	0,932	$0,932 \pm 1,7^{-4}$	4,1
Buža oljke	0,705	0,706	0,705	$0,705 \pm 0,0003$	3,1
Karbonaca listi	0,603	0,604	0,604	$0,604 \pm 0,0004$	5,3
Buža listi	0,66	0,66	0,66	$0,660 \pm 0,0003$	5,8
OKTOBER 2009					
Karbonaca oljke	1,139	1,140	1,140	$1,140 \pm 9,0^{-4}$	5
Buža oljke	0,655	0,655	0,655	$0,655 \pm 0,0003$	2,9
Karbonaca listi	0,655	0,655	0,655	$0,655 \pm 0,0002$	5,8
Buža listi	0,668	0,668	0,668	$0,668 \pm 0,0002$	5,9
Komercialni ekstrakt	0,582	0,584	0,582	$0,583 \pm 0,0582$	5,1

Vsebnost SFS v vzorcih listov in plodov dveh različnih sort oljke (Karbonaca in Buža) in komercialnem ekstraktu prikazuje preglednica 6. Vsebnost fenolnih spojin smo izrazili kot maso galne kisline (v mg) na gram substrata.

Preglednica 6: Vsebnost SFS, ki je podana kot masa galne kisline na gram substrata (mg/g) v vzorcih listov in plodov dveh različnih sort oljke (Karbonaca in Buža), v različnih vegetacijskih obdobjih in v vzorcu komercialnega ekstrakta

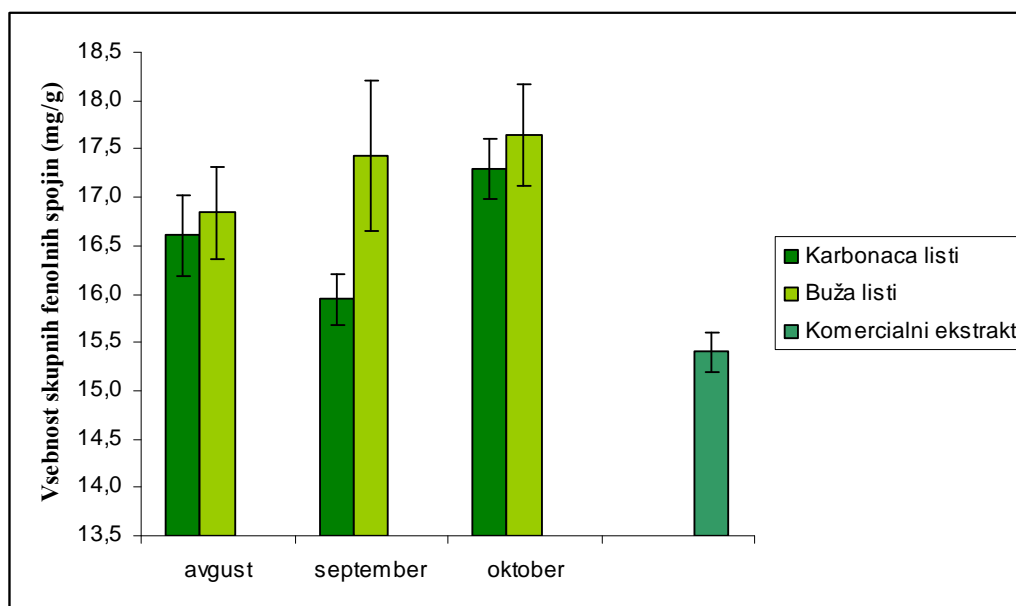
Ekstrakt	Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/g)		
	avgust	september	oktober
Karbonaca oljke	$15,2 \pm 0,6$	$12,3 \pm 0,5$	$15,1 \pm 1,1$
Buža oljke	$8,6 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,2$	$8,7 \pm 0,4$
Karbonaca listi	$16,6 \pm 0,4$	$15,9 \pm 0,3$	$17,3 \pm 0,3$
Buža listi	$16,8 \pm 0,5$	$17,4 \pm 0,7$	$17,6 \pm 0,5$
Komercialni ekstrakt		$15,4 \pm 0,2$	

Na sliki 8 so grafično prikazane vsebnosti SFS v plodovih dveh sort oljke v različnih obdobjih vegetacije.



Slika 8: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v plodovih dveh sort oljke (Karbonaca in Buža) v različnih vegetacijskih obdobjih (mg galne kisline/g substrata)

Na sliki 9 so grafično prikazane vsebnosti skupnih fenolnih spojin v listih dveh sort oljke v različnih obdobjih vegetacije in v komercialnem ekstraktu.



Slika 9: Vsebnost SFS v listih dveh sort oljke (Karbonaca in Buža) v različnih vegetacijskih obdobjih in v komercialnem ekstraktu (mg galne kisline/g substrata)

Rezultati spremljanja SFS v plodovih in listih dveh sort oljke glede na vegetacijsko obdobje, v katerem so bili zbrani vzorci, to je avgust, september in oktober, so pokazali zanimive rezultate. Značilno odstopanje smo opazili pri listih in plodovih sorte Karbonaca, ki so bili zbrani v mesecu septembru, kjer smo določili nižjo vsebnost SFS v primerjavi s tistimi, ki so bili zbrani v avgustu in oktobru. Pri plodovih sorte Buža smo zasledili, da je vsebnost SFS v preiskovanem obdobju vegetacije v okviru eksperimentalne napake nespremenjena. Tudi v listih sorte Buža je ob sicer delno nakazanem trendu zvišanja vsebnosti SFS v preiskovanem obdobju vegetacije v okviru eksperimentalne napake nespremenjena.

Slika 8 kaže, da plodovi sorte Karbonaca vsebujejo precej višjo vsebnost SFS od plodov sorte Buža v vseh treh obdobjih vegetacije. Zanimivo je, da listi sorte Buža vsebujejo le malo več SFS od listov sorte Karbonaca v vseh obdobjih vegetacije (slika 9). Iz preglednice 6 lahko vidimo, da pri vseh treh vegetacijskih obdobjih listi oljke vsebujejo višjo vsebnost skupnih SFS od plodov oljke, pri obeh preiskovanih sortah. Komercialni ekstrakt iz listov oljke kaže manjšo vsebnost SFS v primerjavi z listi sorte Buža in Karbonaca iz kateregakoli vegetacijskega obdobja.

V literaturi so opisani različni trendi spreminjanja koncentracije SFS v plodovih in listih oljke, glede na vegetacijsko obdobje. Amiot in sodelavci (1989) ter Jemai in sodelavci (2009) navajajo znižanje koncentracije SFS z dozorevanjem, medtem ko so številni drugi avtorji (Chimi in Atouati, 1994; Monteleone in sod., 1995) zasledili obraten trend, trend višanja koncentracije SFS z dozorevanjem. Razlogov za omenjene razlike v spremembi koncentracije SFS je lahko veliko. Z vegetacijskim obdobjem se kemijska sestava plodov in listov oljke, med drugim tudi fenolnih spojin, močno spreminja. Olevropein je glavna fenolna komponenta v ekstraktih oljke v zgodnjem vegetacijskem obdobju.

Z dozorevanjem sadeža se količina olevropeina zmanjšuje, medtem ko se koncentracija nekaterih flavonoidov in hidroksitirozola, ki je glavni razgradni produkt olevropeina zvišuje. Razlog v različni vsebnosti olevropeina oz. njegovih razgradnih produktov glede na obdobje vegetacije in spremljajoče klimatske pogoje je lahko povečana ali zmanjšana aktivnost hidrolitičnih encimov, predvsem glikozidaze in esteraze, ki katalizirajo hidrolizo olevropeina (Jemai, 2009).

Poleg sprememb v kemijski sestavi plodov in listov oljke, ki so povezane s samim dozorevanjem lahko najdemo možne razloge za različne trende spreminjanja koncentracije SFS tudi v klimatskih pogojih, sestavi zemlje, načinu kultivacije, sorti oljke. Dokazano je, da se raven SFS v plodovih v primeru stresnih pogojev kot npr. suše zvišuje, v primeru namakanja se pa niža (Patumi in sod., 2002.; Tovar in sod., 2001). Po vsej verjetnosti obstaja povezava med spremembo encimske aktivnosti in količine fenolnih spojin v oljkah ter klimatskimi pogoji. Ugotovili so namreč, da se je količina encimov v oljkah spreminjala v odvisnosti od količine dostopne vode (Tovar in sod., 2002).

Metoda določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom je sicer pogosto uporabljena, vendar nespecifična metoda. Na analizo in s tem tudi na verodostojnost rezultatov lahko vplivajo različne reducirajoče substance, ki so poleg fenolnih spojin prisotne v ekstraktu. To so reducirajoči sladkorji, nekatere aminokisljine, organske kisline ter drugi reducenti (Prior in sod., 2005). Rezultati, ki jih dobimo pri Folin-Ciocalteu metodi, so odvisni od vrste prisotnih fenolnih spojin, zato so njeno uporabo za določanje skupnih fenolov dostikrat kritizirali (Escarpa in sod., 2001). To je prav gotovo lahko eden od možnih razlogov za opisani trend spreminjanja koncentracije SFS z obdobjem vegetacije.

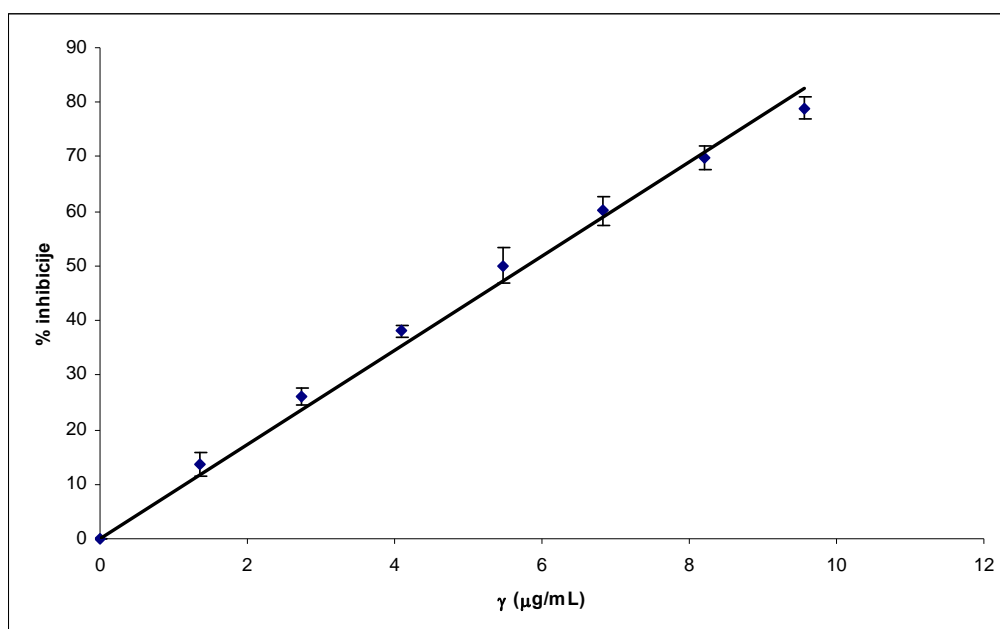
#### 4.3 ANALIZA DPPH•

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo določali z metodo DPPH•. Lovljenje oziroma inhibicijo prostih DPPH• radikalov smo zasledovali s spremembo absorbance pri valovni dolžini 517 nm. Boljša kot je antioksidativna učinkovitost naših ekstraktov, nižja je vsebnost prostih radikalov in s tem tudi nižja izmerjena absorbanca pri 517 nm. Rezultate smo interpretirali kot koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski mešanici, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH• ( $ED_{50\% \text{ DPPH}}$ ). Koncentracijo, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH• smo izračunali po enačbi:

$$ED_{50\% \text{ DPPH}} = \frac{50\%}{k} \quad \dots 6$$

Kjer  $k$  predstavlja smerni koeficient premice, ki pokaže odvisnost % inhibicije radikala DPPH• od koncentracije fenolnih spojin. Smerni koeficient oz. naklon premice smo določili z metodo linearne regresije. Boljša kot je sposobnost lovljenja prostih radikalov oz. sposobnost inhibicije prostih radikalov, večji je naklon premice in nižja vrednost  $ED_{50\%}$ .

Na sliki 10 je kot primer pokazana odvisnost % inhibicije radikala DPPH• od koncentracije fenolnih spojin za ekstrakt plodu sorte Karbonaca pobranega v mesecu septembru.



Slika 10: Odvisnost % inhibicije radikala DPPH• od koncentracije fenolnih spojin ( $\gamma$ ) za ekstrakt plodu sorte Karbonaca pobranega v mesecu septembru

V preglednicah 7 in 8 so podane koncentracije fenolnih spojin, povprečne absorbance in % inhibicije DPPH• radikala za ekstrakte plodov sorte Karbonaca in Buža.

Preglednica 7: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za plodove sorte Karbonaca ( $\gamma$ ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije radikala DPPH• glede na vegetacijsko obdobje

Karbonaca oljke	$\gamma$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}_{517}$	% inhibicije DPPH•
Avgust	3,4	0,760	31,5
	5,1	0,628	43,4
	6,8	0,462	58,4
	8,5	0,326	70,6
	10,2	0,179	83,9
	11,9	0,108	90,3
	13,6	0,083	92,5
September	1,4	0,953	13,6
	2,7	0,815	26,1
	4,1	0,683	38,1
	5,5	0,550	50,1
	6,8	0,439	60,1
	8,2	0,332	69,9
	9,6	0,232	79,0
Oktober	3,3	1,015	10,2
	5,0	0,956	15,3
	6,7	0,885	21,6
	8,4	0,810	28,3
	10,0	0,744	34,1
	11,7	0,671	40,6
	13,4	0,604	46,5

Preglednica 8: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za plodove sorte Buža ( $\gamma$ ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanca ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije radikala DPPH• glede na vegetacijsko obdobje

Buža oljke	$\gamma$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}_{517}$	% inhibicije DPPH•
Avgust	1,0	1,022	9,3
	1,9	0,939	16,7
	2,9	0,862	23,5
	3,8	0,785	30,4
	4,8	0,709	37,1
	5,7	0,643	43,0
	6,7	0,555	50,0
September	1,0	1,009	8,5
	2,1	0,915	17,0
	3,1	0,817	25,9
	4,1	0,726	34,1
	5,2	0,637	42,2
	6,2	0,555	49,7
	7,2	0,472	57,2
Oktober	3,8	1,020	9,7
	4,8	0,974	13,7
	5,8	0,920	18,5
	6,7	0,883	21,8
	7,7	0,847	25,0
	8,7	0,803	28,9
	9,6	0,771	31,7

V preglednicah 9 in 10 so podane koncentracije fenolnih spojin, povprečne absorbance in % inhibicije DPPH• radikala za ekstrakte listov sorte Karbonaca in Buža

Preglednica 9: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za liste sorte Karbonaca ( $\gamma$ ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije radikala DPPH• glede na vegetacijsko obdobje

Karbonaca listi	$\gamma$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}_{517}$	% inhibicije DPPH•
Avgust	1,8	0,925	15,6
	3,7	0,736	32,9
	5,5	0,547	50,1
	7,4	0,380	65,3
	9,2	0,235	78,6
	11,1	0,131	88,1
	12,9	0,095	91,3
September	1,8	0,952	14,6
	3,5	0,767	31,1
	5,3	0,602	46,0
	7,1	0,442	60,3
	8,9	0,300	73,1
	10,6	0,175	84,3
	12,4	0,124	88,9
Oktober	1,9	1,031	8,7
	3,8	0,878	22,2
	5,8	0,734	35,0
	7,7	0,604	46,5
	9,6	0,480	57,5
	11,5	0,350	69,0
	13,5	0,256	77,4



Preglednica 10: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za liste sorte Buža ( $\gamma$ ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije radikala DPPH• glede na vegetacijsko obdobje

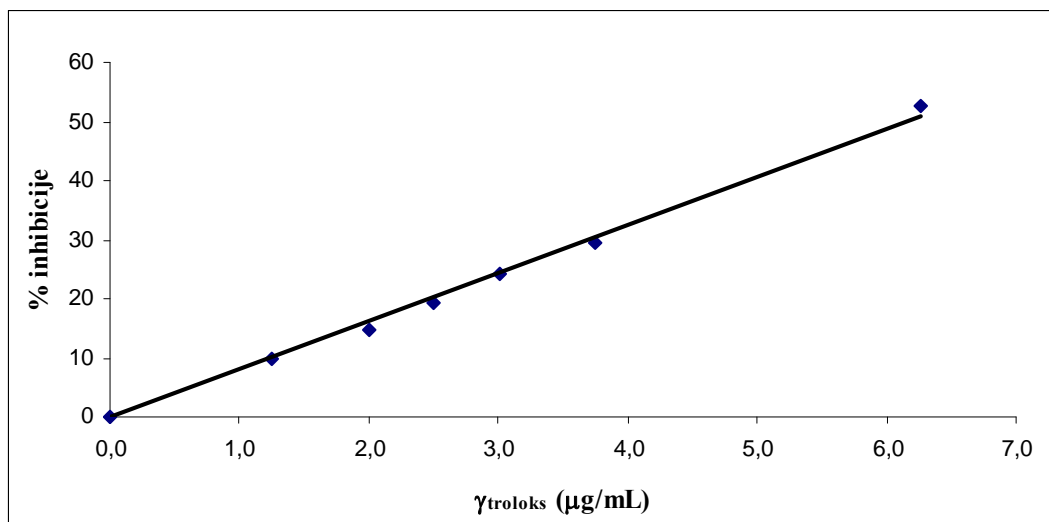
Buža listi	$\gamma$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}_{517}$	% inhibicije DPPH•
Avgust	1,9	0,925	15,6
	3,7	0,705	35,7
	5,6	0,522	52,4
	7,5	0,363	66,9
	9,4	0,216	80,3
	11,2	0,114	89,6
	13,1	0,094	91,4
September	1,9	0,921	17,3
	3,9	0,745	33,1
	5,8	0,525	52,9
	7,7	0,393	64,7
	9,7	0,214	80,8
	11,6	0,124	88,8
	13,6	0,109	90,3
Oktober	2,0	1,023	9,4
	3,9	0,844	25,2
	5,9	0,692	38,8
	7,8	0,543	51,9
	9,8	0,396	64,9
	11,8	0,276	75,6
	13,7	0,206	81,7

V preglednici 11 so podane vrednosti izmerjenih absorbanc, vrednosti za masno koncentracijo troloksa v reakcijski mešanici in odstotek inhibicije radikala DPPH•.

Preglednica 11: Masna koncentracija troloksa v reakcijski mešanici ( $\gamma_{\text{troloks}}$ ), povprečne vrednosti za absorbanco ( $\bar{A}_{517}$ ) in % inhibicije DPPH• radikala

$\gamma_{\text{troloks}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}_{517}$	% inhibicije DPPH•
1,3	1,048	9,9
2,0	0,992	14,7
2,5	0,940	19,2
3,0	0,884	24,1
3,8	0,821	29,4
6,3	0,553	52,5

Na sliki 11 je prikazana odvisnost % inhibicije radikala DPPH• od masne koncentracije troloksa v reakcijski mešanici.



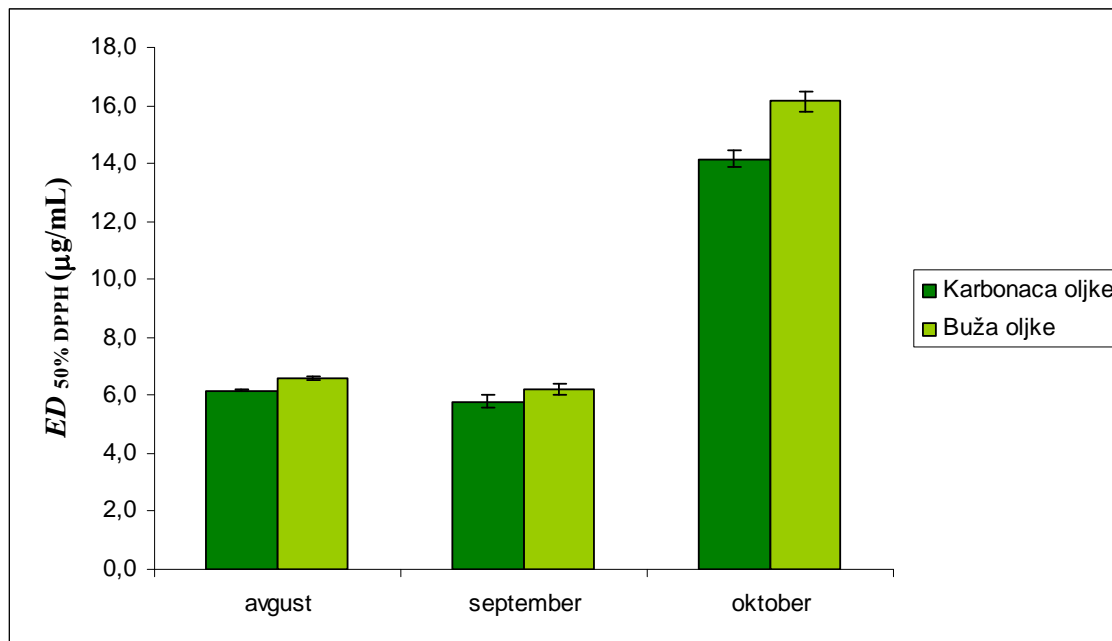
Slika 11: Odvisnost % inhibicije radikala DPPH• od masne koncentracije troloksa v reakcijski mešanici ( $\gamma_{\text{troloks}}$ )

V preglednici 12 so podane vrednosti  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$  za komercialni ekstrakt, raztopino troloks in za ekstrakte plodov in listov oljke, ki smo jih zbrali v različnih vegetacijskih obdobjih.

Preglednica 12: Vrednosti  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$  za komercialni ekstrakt, raztopino troloks in za ekstrakte plodov in listov oljke glede na vegetacijsko obdobje

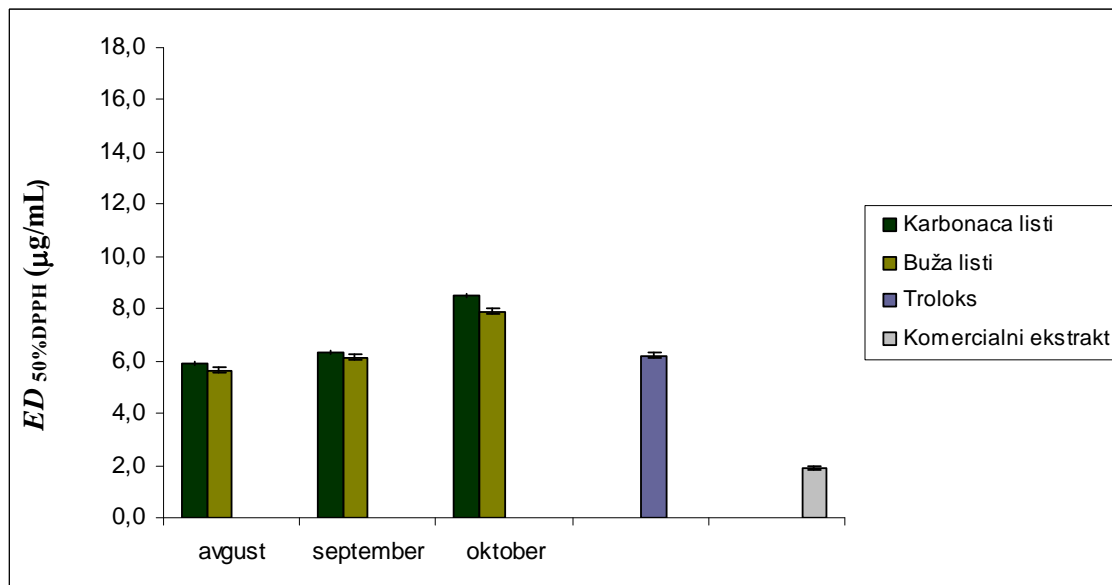
Ekstrakt	$ED_{50\% \text{ DPPH}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	avgust	september	oktober
Karbonaca oljke	$6,15 \pm 0,03$	$5,8 \pm 0,2$	$14,1 \pm 0,3$
Buža oljke	$6,6 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,2$	$16,2 \pm 0,3$
Karbonaca listi	$5,9 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$
Buža listi	$5,6 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$	$7,91 \pm 0,03$
Komercialni ekstrakt		$1,86 \pm 0,09$	
Troloks		$6,2 \pm 0,1$	

Na sliki 12 so prikazane vrednosti  $ED_{50\% DPPH}$  za plodove dveh sort oljke, ki smo jih zbrali v različnih obdobjih vegetacije.



Slika 12: Vrednosti  $ED_{50\% DPPH}$  (µg/mL) za ekstrakte plodov dveh sort oljke v različnih vegetacijskih obdobjih

Na sliki 13 so prikazane vrednosti  $ED_{50\% DPPH}$  za komercialni ekstrakt, raztopino troloks in za ekstrakte listov dveh sort oljke, ki smo jih zbrali v različnih obdobjih vegetacije.



Slika 13: Vrednosti  $ED_{50\% DPPH}$  (µg/mL) za komercialni ekstrakt, troloks in za ekstrakte listov dveh sort oljke v različnih vegetacijskih obdobjih

V preglednici 12 ter na slikah 12 in 13 vidimo, da kažejo ekstrakti plodov obeh sort oljke v lovljenju prostih radikalov podobni trend z obdobjem vegetacije. Najboljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov so pokazali ekstrakti plodov, ki smo jih zbrali v mesecu septembru, saj imajo najnižjo vrednost  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$ . Sledijo jim ekstrakti plodov, ki smo jih zbrali avgusta. Najvišje  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$  vrednosti in s tem najslabšo sposobnost lovljenja prostih radikalov kažejo ekstrakti plodov, ki smo jih zbrali v mesecu oktobru. Pri ekstraktih listov oljke pa opazimo za obe sorti nižanje sposobnosti lovljenja prostih radikalov tekom vegetacije.

Plodovi sorte Karbonaca v vseh preiskovanih obdobjih vegetacije kažejo nižjo vrednost  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$  in s tem boljšo antioksidativno učinkovitost od plodov sorte Buža (slika 12). Pri listih smo opazili ravno obraten trend in sicer boljšo antioksidativno učinkovitost listov sorte Buža v primerjavi z listi sorte Karbonaca v vseh preiskovanih obdobjih vegetacije. Iz preglednice 13 lahko zaključimo, da listi obeh sort v vseh vegetacijskih obdobjih kažejo boljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov v primerjavi s plodovi obeh sort.

V komercialnem ekstraktu smo presenetljivo izmerili najnižjo vrednost  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$ , kar kaže na boljšo antioksidativno učinkovitost v primerjavi z listi sorte Buža in Karbonaca, čeprav smo v komercialnem ekstraktu določili nekoliko nižjo vsebnost SFS. Troloks kaže primerljivo  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$  vrednost z ekstrakti listov in plodov oljke pobranih v mesecu avgustu in septembru. Ekstrakti plodov in listov obeh sort, pobrani v mesecu oktobru, kažejo nižjo sposobnost lovljenja prostih DPPH• radikalov v primerjavi z troloksom.

Naši rezultati potrjujejo teorijo, da sposobnost ekstraktov za lovljenje prostega radikala DPPH• ni v povezavi z koncentracijo SFS, temveč z vrsto fenolnih spojin. Razlogi so lahko interakcije med različnimi spojinami v ekstraktih, ki definirajo antioksidativno učinkovitost (Mylonaki 2008). Tudi Medina L.S. (2006) navaja, da antioksidativna aktivnost oljk ni odvisna le od koncentracije fenolnih spojin, ampak tudi od njihove kemijske strukture. Višja antioksidativna aktivnost je dokazana pri fenolnih spojinah ki vsebujejo 3,4-hidroksi in 3,4,5-hidroksi strukture vezane na aromatski obroč (oleuropein).

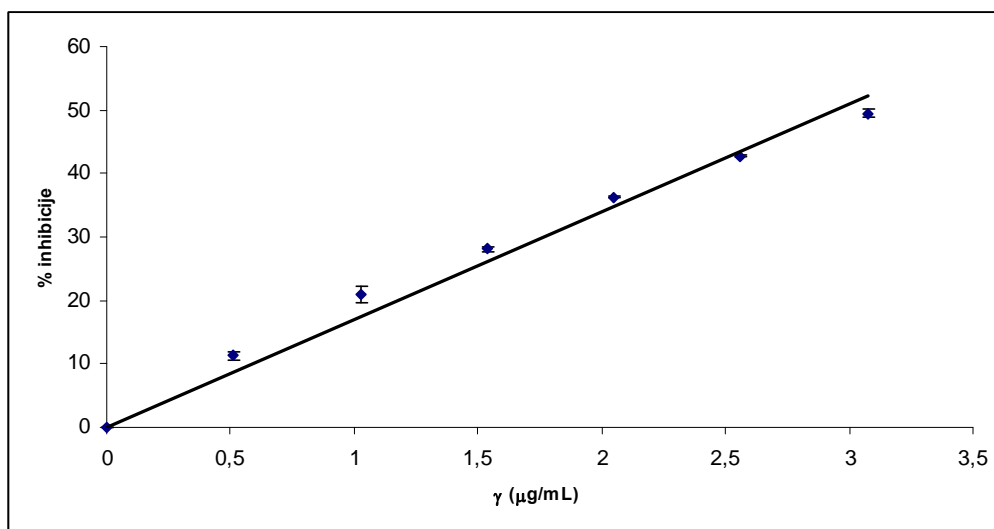
#### 4.4 ANALIZA ABTS•<sup>+</sup>

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov oz. lovljenje ABTS•<sup>+</sup> radikalov smo, podobno kot pri DPPH• metodi, zasledovali spektrofotometrično s spremembo absorbance pri valovni dolžini 734 nm. Rezultate smo podali kot koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski mešanici, ki povzroči 50 % zmanjšanje začetne koncentracije ABTS•<sup>+</sup> ( $ED_{50\% \text{ ABTS}}$ ). Koncentracijo, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala ABTS•<sup>+</sup> smo izračunali po enačbi:

$$ED_{50\% \text{ ABTS}} = \frac{50\%}{k} \quad \dots 7$$

Kjer  $k$  predstavlja smerni koeficient premice, ki pokaže odvisnost % inhibicije radikala ABTS•<sup>+</sup> od koncentracije fenolnih spojin.

Na sliki 14 je kot primer pokazana odvisnost % inhibicije radikala ABTS•<sup>+</sup> od koncentracije fenolnih spojin za ekstrakt plodu sorte Buža pobranega v mesecu septembru.



Slika 14: Odvisnost % inhibicije radikala ABTS•<sup>+</sup> od koncentracije fenolnih spojin ( $\gamma$ ) za ekstrakt plodu sorte Buža pobranega v mesecu septembru

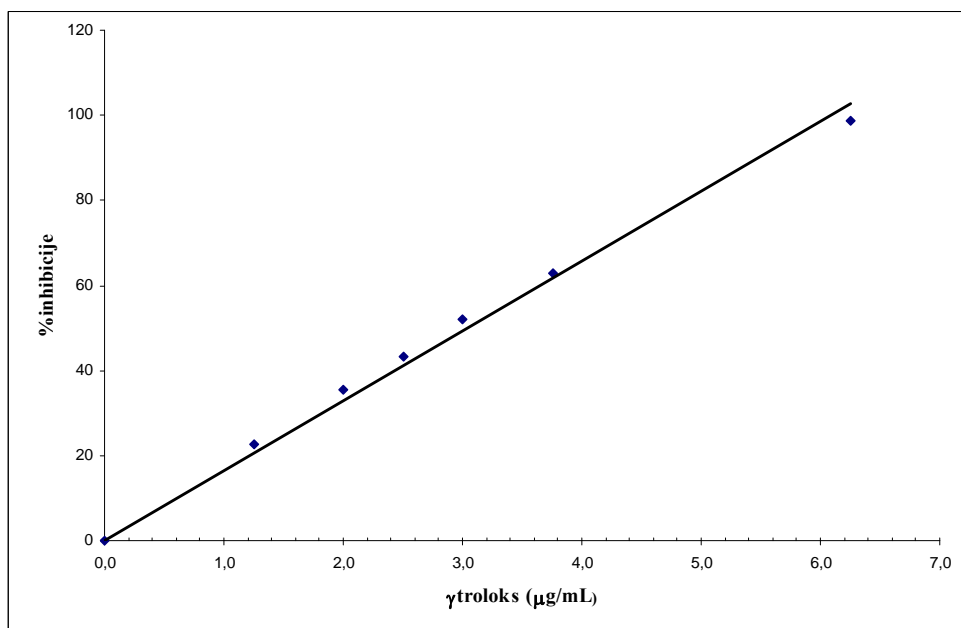
Smerni koeficient oz. naklon premice smo določili z metodo linearne regresije. Boljša je kot sposobnost lovljenja prostih radikalov oz. sposobnost inhibicije prostih radikalov, večji je naklon premice in nižja vrednost  $ED_{50\% \text{ ABTS}}$ .

V preglednici 13 so podane vrednosti izmerjenih absorbanc, vrednosti za masno koncentracijo raztopine troloks v reakcijski mešanici in odstotek inhibicije radikala  $ABTS^{\bullet+}$ .

Preglednica 13: Masna koncentracija troloksa v reakcijski mešanici ( $\gamma_{\text{troloks}}$ ), povprečne vrednosti za absorbanco ( $\bar{A}_{734}$ ) in % inhibicije  $ABTS^{\bullet+}$  radikala

$\gamma_{\text{troloks}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}_{734}$	% inhibicije $ABTS^{\bullet+}$
1,3	0,549	22,7
2,0	0,459	35,4
2,5	0,403	43,2
3,0	0,341	52,0
3,8	0,264	62,9
6,3	0,009	98,8

Na sliki 15 je prikazana odvisnost % inhibicije radikala  $ABTS^{\bullet+}$  od masne koncentracije troloksa v reakcijski mešanici.



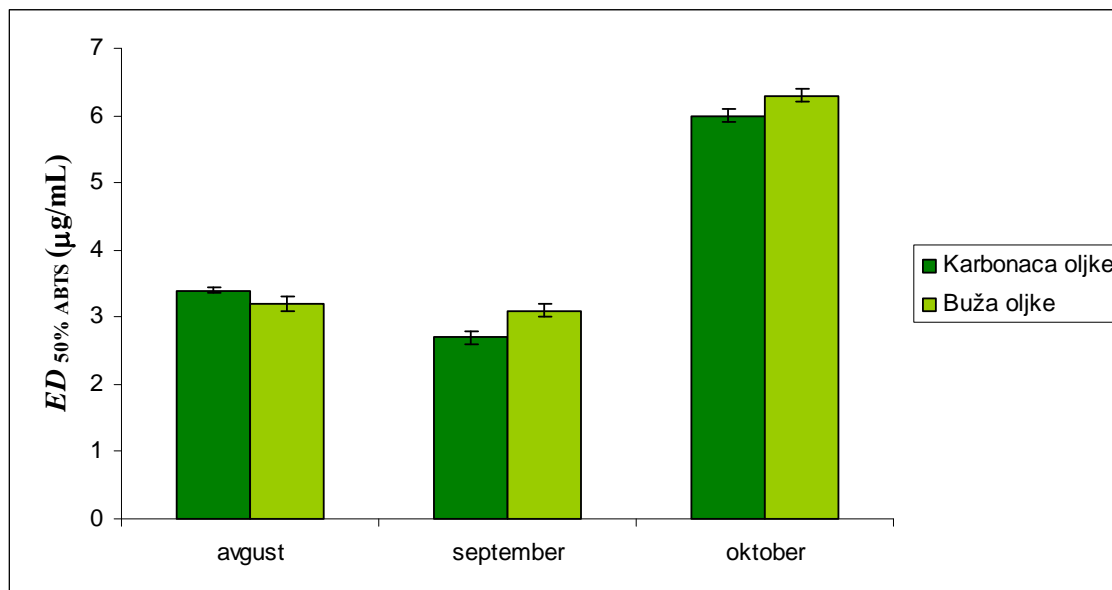
Slika 15: Odvisnost % inhibicije radikala  $ABTS^{\bullet+}$  od masne koncentracije troloksa v reakcijski mešanici ( $\gamma_{\text{troloks}}$ )

V preglednici 14 so podane vrednosti  $ED_{50\%}$  ABTS za raztopino troloks in za ekstrakte plodov in listov oljke, ki smo jih zbrali v različnih vegetacijskih obdobjih.

Preglednica 14: Vrednosti  $ED_{50\%}$  ABTS za raztopino troloks in ekstrakte plodov in listov oljke glede na vegetacijsko obdobje

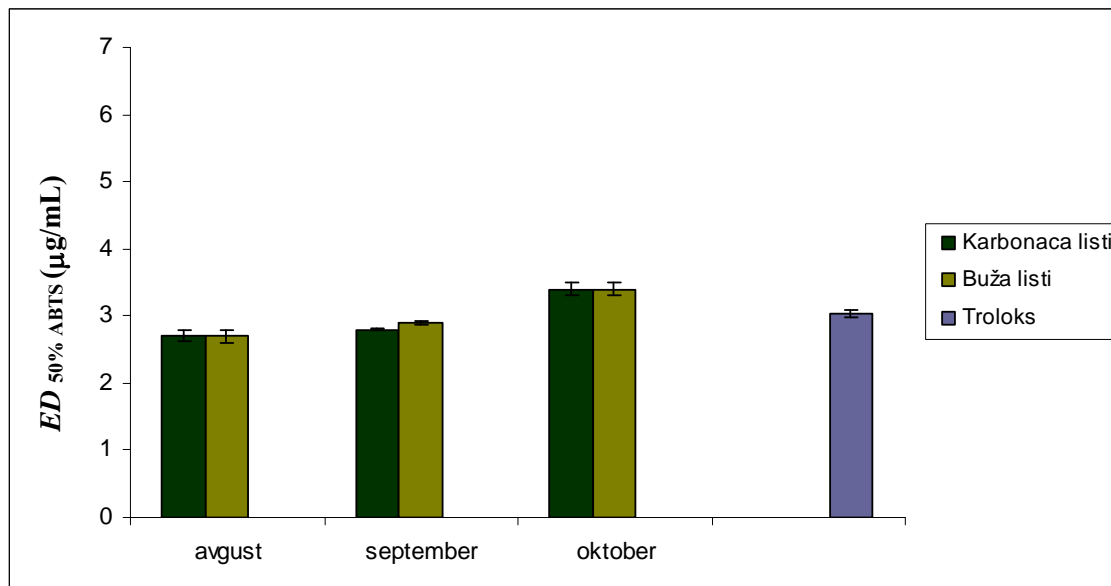
Ekstrakt	$ED_{50\%}$ ABTS ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	avgust	september	oktober
Karbonaca oljke	$3,40 \pm 0,04$	$2,7 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$
Buža oljke	$3,2 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,1$
Karbonaca listi	$2,7 \pm 0,1$	$2,80 \pm 0,02$	$3,4 \pm 0,1$
Buža listi	$2,7 \pm 0,1$	$2,90 \pm 0,03$	$3,4 \pm 0,1$
Troloks		$3,04 \pm 0,06$	

Na sliki 16 so prikazane vrednosti  $ED_{50\%}$  ABTS dveh sort oljk v različnih obdobjih vegetacije.



Slika 16: Vrednosti  $ED_{50\%}$  ABTS ( $\mu\text{g/mL}$ ) za ekstrakte plodov dveh sort oljke v različnih vegetacijskih obdobjih

Na sliki 17 so prikazane vrednosti  $ED_{50\% \text{ ABTS}}$  za raztopino troloks in za liste dveh sort oljke, v različnih obdobjih vegetacije.



Slika 17: Vrednosti  $ED_{50\% \text{ ABTS}}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) za troloks in ekstrakte listov dveh sort oljke v različnih vegetacijskih obdobjih

Z metodo lovljenja  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radikalov smo potrdili trend, ki je opisan pri DPPH $\bullet$  metodi. Ekstrakti plodov obeh sort oljk, obranih v mesecu septembru, kažejo najboljšo antioksidativno učinkovitost, najslabšo pa oktobra. Pri listih oljke vrednosti  $ED_{50\% \text{ ABTS}}$  naraščajo po preiskovanih obdobjih vegetacije, kar pomeni, da se sposobnost lovljenja prostih radikalov niža.

Rezultati, ki so zbrani v preglednici 11, potrjujejo, da imajo plodovi sorte Karbonaca nekoliko boljše antioksidativno učinkovitost v primerjavi s plodovi sorte Buža, ker smo jim določili nižjo vrednost  $ED_{50\% \text{ ABTS}}$ . Metoda lovljenja prostih  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radikalov ni pokazala značilnega odstopanja v antioksidativni učinkovitosti med listi sort Buža in Karbonaca, kar je razvidno iz slike 17. Potrdili smo boljše antioksidativno učinkovitost listov obeh preiskovanih sort oljke v primerjavi s plodovi v vseh treh preiskovanih obdobjih vegetacije.

Plodovi obeh preiskovanih sort pobrani v avgustu in oktobru kažejo slabšo antioksidativno učinkovitost v primerjavi z raztopino troloks, medtem ko plodovi sorte Karbonaca pobrani v mesecu septembru kažejo boljše antioksidativno učinkovitost v primerjavi z raztopino troloks. Pri listih obeh sort smo opazili drugačen trend in sicer boljše antioksidativno učinkovitost v mesecu avgustu in septembru, v primerjavi s troloksom, medtem ko smo v ekstraktih pobranih v mesecu oktobru izmerili višjo vrednost  $ED_{50\% \text{ ABTS}}$  v primerjavi z raztopino troloks.

Rezultati kažejo, da sposobnost lovljenja oz. inhibicija prostega radikala  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ni v povezavi z vsebnostjo skupnih fenolov v ekstraktih. To bi lahko razložili s tem, da je sposobnost lovljenja prostih radikalov lahko povezana s strukturo fenolnih spojin, še posebej s številom hidroksilnih substituentov v aromatskem obroču. Po drugi strani pa prisotnost sladkorja manitola povzroča boljše antioksidativno značilnost ekstraktov, ker je znano, da lovi hidroksilne radikale (Jemai, 2009).



#### 4.5 ANALIZA REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV

Vsebnost reducirajočih sladkorjev v ekstraktih plodov in listov oljke smo glede na vegetacijsko obdobje zasledovali spektrofotometrično. Iz povprečnih izmerjenih absorbanč vzorcev in s pomočjo enačbe umeritvene krivulje, ki je  $y = 14,002 x - 0,3028$ , kjer  $y$  pomeni absorbanco vzorca pri 540 nm in  $x$  pomeni koncentracijo reducirajočih sladkorjev, smo izračunali masno koncentracijo reducirajočih sladkorjev v reakcijski mešanici.

$$\gamma = \frac{\bar{A}_{540} - 0,3028}{14,002} \quad (\text{mg/mL}) \quad \dots 8$$

Dobljeni rezultat smo pomnožili s 45, da bi dobili koncentracijo v 0,1 mL razredčenega ekstrakta, ki smo ga odpipetirali v reakcijsko mešanico. Iz tako dobljene koncentracije in ob upoštevanju razredčitvenega faktorja smo izračunali masno koncentracijo reducirajočih sladkorjev v ekstraktu. Izračunano koncentracijo smo pomnožili s skupnim volumnom ekstrakta (poglavje 3.2.2.1.) in dobili maso reducirajočih sladkorjev v ekstraktu. Rezultate smo podali kot grame reducirajočih sladkorjev na kilogram substrata. Preglednica 15 podaja vrednosti izmerjenih absorbanč in vsebnosti reducirajočih sladkorjev v preiskovanih ekstraktih.

Preglednica 15: Vrednosti izmerjenih absorbanč ( $A_{540}$ ) in vsebnosti reducirajočih sladkorjev

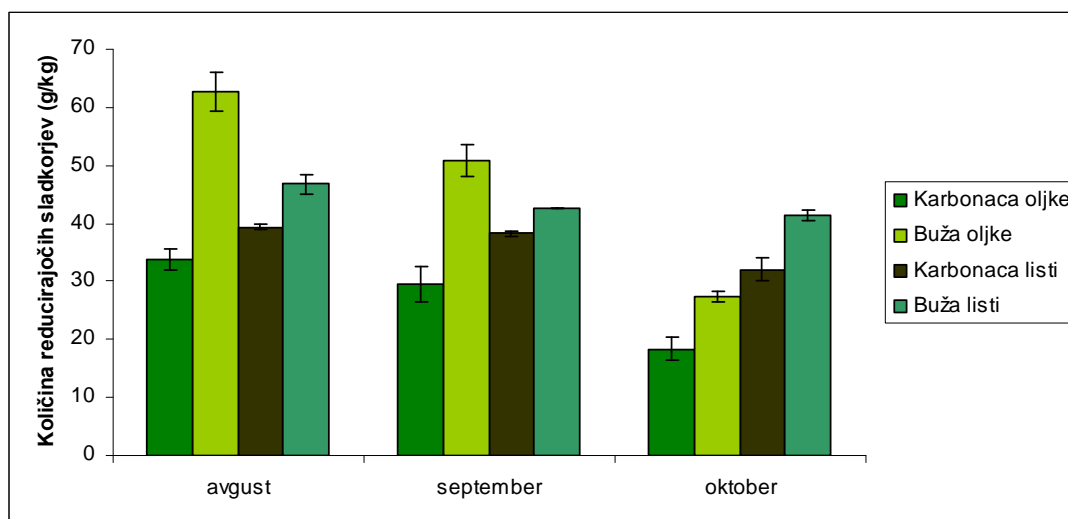
AVGUST 2009					
Ekstrakt	$A_{540}$ (par. 1)	$A_{540}$ (par. 2)	$A_{540}$ (par. 3)	$\bar{A}_{540}$	$m_{\text{red. sladkorjev}}$ (g/kg)
Karbonaca oljke	1,093	1,024	1,181	1,099	$33,8 \pm 1,9$
Buža oljke	1,067	0,924	1,007	0,999	$62,7 \pm 3,5$
Karbonaca listi	0,503	0,515	0,523	0,513	$39,3 \pm 0,5$
Buža listi	0,633	0,677	0,698	0,669	$46,8 \pm 1,6$
SEPTEMBER 2009					
Karbonaca oljke	0,854	0,934	0,976	0,921	$29,5 \pm 3,0$
Buža oljke	0,687	0,786	0,789	0,754	$50,8 \pm 2,5$
Karbonaca listi	0,491	0,500	0,480	0,490	$38,2 \pm 0,5$
Buža listi	0,581	0,582	0,580	0,581	$42,6 \pm 0,1$
OKTOBER 2009					
Karbonaca oljke	0,490	0,414	0,479	0,461	$18,4 \pm 2,0$
Buža oljke	0,285	0,269	0,249	0,268	$27,4 \pm 0,9$
Karbonaca listi	0,321	0,360	0,402	0,361	$32,1 \pm 2,0$
Buža listi	0,553	0,536	0,579	0,556	$41,4 \pm 1,1$

Preglednica 16 podaja vsebnost reducirajočih sladkorjev v preiskovanih ekstraktih v različnih vegetacijskih obdobjih.

Preglednica 16: Vsebnost reducirajočih sladkorjev v plodovih in listih oljke v različnih vegetacijskih obdobjih

Ekstrakt	Vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/kg)		
	avgust	september	oktober
Karbonaca oljke	33,8 ± 1,9	29,5 ± 3,0	18,4 ± 2,0
Buža oljke	62,7 ± 3,5	50,8 ± 2,5	27,4 ± 0,9
Karbonaca listi	39,3 ± 0,5	38,2 ± 0,5	32,1 ± 2,0
Buža listi	46,8 ± 1,6	42,6 ± 0,1	41,4 ± 1,1

Na sliki 18 so podane količine reducirajočih sladkorjev glede na različna obdobja vegetacije oljk in listov oljke.



Slika 18: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/kg) v različnih vegetacijskih obdobjih

Čeprav je sestava sladkorjev v plodu oljke zelo raziskana (Donaire in sod., 1975; Fernandez-Bolanos in sod., 1982), je le malo znanih informacij o vplivu sorte, geografskega porekla in obdobja zrelosti na vsebnost skupnih in posameznih sladkorjev v plodovih in listih oljke.

V različnih raziskavah so dokazali precejšnje razlike sladkorjev med zgodnjimi in poznim obdobjem vegetacije plodu, ki jih lahko pripišemo kemičnim in encimskim spremembam nekaterih polisaharidov v času zorenja. Spremembe vključujejo hidrolizo polisaharidov z glikozidazo in polimerizacijo prostih sladkorjev (Wodner in sod., 1988.; Marsilio in sod., 2001).

Količina reducirajočih sladkorjev pa je dokazano povezana z vsebnostjo olja v plodovih oljk in je tudi predlagana, da se uporablja kot indeks zrelosti plodov oljk pri proizvodnji oljčnega olja: minimalna vrednost sladkorjev namreč nakazuje na maksimalno vsebnost olja v plodovih oljk (Cherubini in sod., 2009).

Dokazali smo, da plodovi in listi oljke sorte Buža vsebujejo višje količine reducirajočih sladkorjev v primerjavi s plodovi in listi sorte Karbonaca v vseh treh preiskovanih obdobjih vegetacije. Zanimiva je primerjava v vsebnosti reducirajočih sladkorjev med plodovi in listi oljke dveh sort. Plodovi sorte Karbonaca vsebujejo namreč manj reducirajočih sladkorjev od listov, medtem ko v primeru sorte Buža opazujemo nasprotno rezultate, kjer plodovi z izjemo v oktobru vsebujejo več reducirajočih sladkorjev v primerjavi z listi.

Kot je razvidno tudi iz preglednice 16, se vsebnost reducirajočih sladkorjev z obdobjem vegetacije znižuje tako v plodovih, kot tudi v listih oljke obeh analiziranih sort. Isti trend so opisali tudi Brescia in sod., (2007) ter Nergiz in sod., (2009). Razlog takšnemu trendu lahko poiščemo v razlagi, ki jo podaja Wodner in sod., (1988). Pravi, da se količina olja v plodovih oljke z zorenjem veča, medtem ko se koncentracija reducirajočih sladkorjev in vode niža. Razlaga te povezave je v tem, da so sladkorji prekursorji biosinteze maščobnih kislin v plodovih oljke.

Stumpf (1983) razlaga, da se vsebnost glukoze, ki je med prisotnimi sladkorji najbolj zastopan, znižuje z dozorevanjem, verjetno zaradi tega, ker se metabolizira preko acetyl-CoA. Količina manitola in drugih poliolov se zvišuje z dozorevanjem, kar potrjuje linearno zvezo med vsebnostjo olja in vsebnostjo poliolov v plodu (Marsilio in sod., 2001).

Koncentracija manitola raste skupaj s slanostjo prsti. To je pomembno zaradi tega, ker manitol izboljšuje odpornost rastline proti oksidacijskemu stresu in povečuje učinkovitost izkoriščanja ogljika (Jemai in sod., 2009).

V literaturi smo zasledili tudi trend, nasproten našemu. Jemai in sod., (2009) poročajo, da količina reduciranih sladkorjev raste z zorenjem, še posebej v zadnjem zorilnem obdobju. Manitol je glavni sladkor v plodovih oljke, sledi mu glukoza. Pravi tudi, da koncentracija sladkorjev lahko zelo varira med sortami. Fernandez-Bolanos in sod., (2002) so dokazali, da je glukoza najbolj zastopan sladkor v plodovih oljke sort Manzanillo, Gordal etc. Višanje koncentracije manitola z dozorevanjem je lahko povezano s sorto, načinom kultivacije, klimatskimi pogoji in geografskim področjem, na katerem oljka raste.

## 5 SKLEPI

Na podlagi opravljenih analiz v okviru diplomskega dela lahko zaključimo:

- Plodovi in listi obeh raziskovanih sort vsebujejo fenolne spojine.
- Med obema preiskovanima sortama smo opazili razliko v koncentracijah SFS.
- Dokazali smo razliko v koncentracijah SFS med plodovi in listi v primeru obeh preiskovanih sort.
- Obdobje vegetacije vpliva tako na koncentracijo SFS v plodovih kot tudi v listih obeh preiskovanih sort.
- Komerčni ekstrakt iz listov oljke je pokazal boljšo antioksidativno učinkovitost v primerjavi z ekstrakti listov sort Buža in Karbonaca.
- Koncentracija SFS v ekstraktih ni v povezavi z njihovo antioksidativno učinkovitostjo.
- Pri vseh ekstraktih je opažen trend nižanja koncentracije reducirajočih sladkorjev z obdobjem vegetacije.

## 6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo v ekstraktih plodov in listov dveh sort oljke (*Olea europaea* L.) ter v komercialnem ekstraktu določili koncentracijo SFS. Substrate plodov in listov oljke smo pobirali v treh različnih obdobjih vegetacije (avgust, september, oktober).

Hoteli smo pokazati, kako se koncentracija SFS v ekstraktih plodov in listov oljke spreminja z vegetacijskim obdobjem. Primerjali smo tudi antioksidativne učinkovitosti ekstraktov. Ekstrakte fenolnih spojin smo pripravili s topilom etanol:voda (70:30 v/v), nato smo v vseh ekstraktih spektrofotometrično določili koncentracijo SFS s pomočjo Folin-Ciocalteu metode. Rezultate vsebnosti SFS smo podali kot ekvivalent galne kisline. Plodovi sorte Karbonaca vsebujejo višje koncentracije SFS v primerjavi s plodovi sorte Buža. Listi obeh preiskovanih sort vsebujejo višje koncentracije SFS od plodov v vseh preiskovanih obdobjih vegetacije. Vrednosti SFS v plodovih sorte Karbonaca so od 12,3 mg/g do 15,2 mg/g in v listih od 15,9 mg/g do 17,3 mg/g. Plodovi sorte Buža vsebujejo SFS od 8,6 mg/g do 9,3 mg/g in listi od 16,8 mg/g do 17,6 mg/g. Pri oljkah obeh preiskovanih sort smo opazili odstopanje v koncentracijah SFS v mesecu septembru v primerjavi z mesecem avgustom in oktobrom. Pri oljkah sorte Karbonaca se vsebnost SFS v mesecu septembru znižala v primerjavi z avgustom in oktobrom, ko sta koncentraciji enaki, medtem ko smo pri oljkah sorte Buža opazili nasproten trend, to je višanje vsebnosti SFS v mesecu septembru v primerjavi z avgustom in oktobrom. Pri listih sorte Buža se koncentracija SFS viša z obdobjem vegetacije. Listi sorte Karbonaca, ki smo jih pobrali v mesecu septembru, vsebujejo najnižjo koncentracijo SFS, sledijo jim listi pobrani avgusta, medtem ko smo najvišjo vsebnost SFS izmerili pri listih pobranih v mesecu oktobru.

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo dokazali z metodo lovljenja DPPH• in ABTS• + radikalov. Sposobnost lovljenja DPPH• in ABTS• radikala smo izrazili kot koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktu, ki povzroči 50 % inhibicijo prostega DPPH• ( $ED_{50\%DPPH}$ ) in ABTS• ( $ED_{50\%ABTS}$ ) radikala. Boljša kot je sposobnost lovljenja prostih radikalov oz. sposobnost inhibicije prostih radikalov, nižja je vrednost  $ED_{50\%}$ . Ugotovili smo, da vsi analizirani ekstrakti kažejo dobro sposobnost lovljenja prostih radikalov. Opazovali smo tudi spremembe antioksidativne učinkovitosti v odvisnosti od obdobja vegetacije. Obe metodi lovljenja prostih radikalov (DPPH• in ABTS•) sta potrdili trend nižanja antioksidativne učinkovitosti analiziranih ekstraktov z obdobjem vegetacije tako v oljkah kot tudi v listih obeh preiskovanih sort.

Vrednosti  $ED_{50\%DPPH}$  za liste so v območju od 5,9 µg/mL do 8,5 µg/mL za plodove od 6,2 µg/mL do 14,1 µg/mL za sorto Karbonaca in za sorto Buža so ustrezne vrednosti za liste v območju od 5,6 µg/mL do 7,9 µg/mL za plodove od 6,6 µg/mL do 16,2 µg/mL. Vrednosti  $ED_{50\%ABTS}$  za liste so v območju od 2,7 µg/mL do 3,4 µg/mL za plodove od 3,4 µg/mL do 6,0 µg/mL za sorto Karbonaca in za sorto Buža so ustrezne vrednosti za liste v območju od 2,7 µg/mL do 3,4 µg/mL za plodove od 3,2 µg/mL do 6,3 µg/mL. Plodovi oljke sorte Karbonaca kažejo boljšo antioksidativno učinkovitost od plodov sorte Buža. V primeru listov oljke smo opazovali boljšo antioksidativno učinkovitost sorte Buža v primerjavi z listi sorte Karbonaca. Dokazali smo boljšo antioksidativno učinkovitost listov oljke v primerjavi s plodovi, v primeru obeh preiskovanih sort.

Komercialni ekstrakt iz listov oljke je pokazal izjemno dobro učinkovitost lovljenja prostih radikalov. Vrednost  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$  znaša  $1,86 \mu\text{g/mL}$ . Naredili smo analize antioksidativne učinkovitosti raztopine troloks in določili vrednost  $ED_{50\% \text{ DPPH}}$   $6,2 \mu\text{g/mL}$ , vrednost  $ED_{50\% \text{ ABTS}}$  je znašala  $3,04 \mu\text{g/mL}$ .

V nadaljevanju smo analizirali vsebnost reducirajočih sladkorjev v ekstraktih plodov in listov oljke. Z obdobjem vegetacije se vsebnost reducirajočih sladkorjev niža tako v plodovih, kot v listih oljke obeh preiskovanih sort. Plodovi in listi sorte Buža so pokazali višjo vsebnost reducirajočih sladkorjev v primerjavi s plodovi in listi sorte Karbonaca v vseh preiskovanih obdobjih vegetacije. Vsebnosti reducirajočih sladkorjev plodov sorte Karbonaca, so v območju od  $18,4 \text{ g/kg}$  do  $33,8 \text{ g/kg}$ , za sorto Buža so ustrezne vrednosti v območju od  $27,4 \text{ g/kg}$  do  $62,7 \text{ g/kg}$ . Pri listih sorte Karbonaca so vsebnosti reducirajočih sladkorjev v območju od  $32,1 \text{ g/kg}$  do  $39,9 \text{ g/kg}$  medtem ko smo pri listih sorte Buža izmerili nekoliko višje vrednosti, od  $41,4 \text{ g/kg}$  do  $46,8 \text{ g/kg}$  reducirajočih sladkorjev.

## 7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-31
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589
- Amiot M.J. Fleuriet A., Macheix J.J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34: 823-826
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. Food Chemistry, 68: 457-462
- 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
- Brenes M., Garcia A., Garcia P., Rios J.J. Garrido A., 1999. Phenolic compounds in Spanish olive Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3535-3540
- Brescia M.A., Pugliese T., Hardy E., Sacco A. 2007. Compositional and structural investigation of ripening of table olives, Bella Della Daunia, by means of traditional and magnetic resonance imaging analyses. Food Chemistry, 105: 400-404
- Briviba K., Sies H. 1994. Nonenzymatic antioxidant defense system. V: Natural antioxidants in human health and disease. Frei B. (ed.). San Diego, Academic Press: 107-128
- Capasso R., Evidenete A., Visca C., Gianfreda L., Maremonti M., Greco G. 1996. Production of glucose and bioactive aglycone by chemical and enzymatic hydrolysis of purified oleuropein from *Olea europaea* L. Applied Biochemistry and Biotechnology, 61: 365-377
- Castelli F., Muzzalupo I., Saija A., Tomaino A., Uccella N. 1999. I biofenoli nelle olive e nell'olio peri il benessere dell'uomo. Olivo&Olio. 2, 9: 48-61
- Charlton A.J., Baxter N.J., Haslam E., Williamson M.P. 1998. Salivary proteins as a defence dietary tannins. V: Polyphenols in food: first workshop Aberdeen, Scotland, 16 to 19 April, 1997/ COST 916 Bioactiveplant cell wall components in nutrition and health. Amado R., Andersson H., Bardocz S., Serra F. (eds.). Aberdeen, European Communities: 179-185
- Cherubini C., Migliorini M., Mugelli M., Viti P., Berti A., Cini E., Zanon B. 2009. Towards a technological ripening index for olive oil fruits. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 671-682
- Chimi H., Atouati Y. 1994. Determination of the optimal stage for harvesting Moroccan phicoline olives by monitoring change in total polyphenols. Olivae, 54: 56-60

COST 916. 2000. Molecular and genetic interactions involving phytochemicals. Cit po: Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-36

De Macario E.C., Macario A.J.L. 2000. Stressors, stress and survival: overview. *Frontiers in Bioscience*, 5: D780-D786

Donaire J.P., Sanchez-Raya A.J., Lopez-Gorge J., Recalde L. 1975. Metabolic changes in fruits and leafs during ripening in the olive. *Phytochemistry*, 14: 1167-1169

Escarpa A., Gonzalez M.C. 2001. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427: 119-127

Fernandez-Bolanos J., Fernandez-Diez M.J., Rivas-Moreno M., Gil Serrano A., Perez Romero T. 1982. Azucares y polyoles en aceitunas verdes. II. Identificacion y determinacion cuantitativa por cromatografia sobre papel. *Grasas y Aceites*, 4: 208-211

Fernandez-Bolanos J., Rodriguez G., Rodriguez R., Heredia A., Guillen R., Jimenez A. 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two -phase olive oil processing or „Alperujo“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6804-6811

Goldbohm R.A., Hertog M.G.L., Brants H.A.M., Poppel G., Brandt P.A. 1998. Intake of flavonoids and cancer risk: prospective cohort study. V: Polyphenols in food. : first workshop Aberdeen, Scotland, 16 to 19 April, 1997/ COST 916 Bioactiveplant cell wall components in nutrition and health. Amado R., Andersson H., Bardocz S., Serra F. (eds.). Aberdeen, European Communities: 159-166

Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. Plant phenolics. Oxford, Oxford Academic Press: 528-566

Griffith J.Q., Couch J.F., Lindauer A. 1944. Effect of rutin on increase capillary fragility in man. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 55: 228-229

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

Gutteridge J.M.C., Halliwell B. 1994. Antioxidant in nutrition, health, and disease. Oxford, Oxford University Press: 143-143

He J., Klag M.J., Whelton M.J., Mo J.-P., Chen J.-Y., Qian M.-C., Mo P.-S., He G.-S. 1995. Oats and buckwheat intakes and cardiovascular disease risk factor in an ethnic minority in China. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61: 366-372

Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravanis C., Blackburen H., Buzina R., Fidanza F., Gianpaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M., Simic B.S., Toshima H., Feskens E.J.M., Holman P.C.H., Katan M.B. 1995. Flavonoid intake and long term risk of coronary-heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155: 381-386



IOOC Newsletter, September, No 42: 1 str. -International olive oil council. 2010. Olive oil-latest figures for 2009/10 and estimates for 2010/11.

<http://www.internationaloliveoil.org/COIAdmin/resources/pdf/NewsletterSep2010English.pdf>

Jemai H., Bouaziz M., Sayadi S. 2009. Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2961-2968

Jemai H., Bouaziz M., Fki I., El Feki A., Sayadi S. 2008. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176: 88-98

Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y. 1997. Antioxidant properties of flavonoids reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. V: *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans C.A., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker: 137-161

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

Loliger J. 1991. The use of antioxidants in foods. V: *Free radicals and food additives*. Aruoma O.I.H.B. (ed.). London, Taylor and Francis: 121-150

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

Marsilio V., Campestre C., Lanza B., De Angelis M. 2001. Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea Europaea* L.) suitable for table olive purposes. *Food Chemistry*, 72: 485-480

Martin-Garcia A.I., Moumen A., Yanez Ruiz D.R., Molina Alcaide E. 2003. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of the-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107: 61-74

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

Medina L.S. 2006. Phenolic compounds: their role during oil extraction and in flaxseed-transfer and antioxidant function. Thesis. Lleida, University of Lleida, Food Technology Department

[http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UdL/AVAILABLE/TDX-0324107202437//T1eam11de11.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UdL/AVAILABLE/TDX-0324107202437//T1eam11de11.pdf)  
(November 2010): 4 str.

Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Miniati E. 1992a. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1571-1576

- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E. 1992b. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1577-1580
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. 1993. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterization of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 2228-2234
- Monteleone E., Caporale G., Lencioni L., Favati F., Bertuccioli M. 1995. Optimization of virgin olive oil quality in relation to fruit ripening and storage. *Food flavours: Generation, analysis and process influence*. Charalambous G. (ed.). Amsterdam, Elsevier Science B.V.: 397-418
- Morel I., Cillard J. 1997. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and isoflavonoids. V: *Natural antioxidants in human health and disease*. Rice-Evans C.A., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker: 164-179
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Parajo J.C. 2001. Natural antioxidant from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171
- Mylonaki S., Kiassos E., Makris P.D., Kefalas P. 2008. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent system and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392: 977-985
- Nergiz C., Ergonul P.G. 2009. Organic acid content and composition of the olive fruits during ripening and its relationship with oil and sugar. *Scientia Horticulturae*, 122: 216-220
- Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G.F., Galli C. 1995. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, 78: 151-160
- Patumi M., D'Andria R., Marsilio V., Fontanazza G., Morelli G., Lanza B. 2002. Olive and olive oil quality after intensive monocone olive growing (*Olea europaea* L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes. *Food Chemistry*, 77: 27-34
- Prior R., Wu X., Schich 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
- Pryor W.A. 1994. Oxidants and antioxidants. V: *Natural antioxidants in human health and disease*. Frei B. (ed.). San Diego, Academic Press: 1-24
- Raina B.L. 2003. Olives. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 8. 2nd. ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4260-4266
- 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. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-66

Re R., Pellegrini N., Protteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237

Rechkemmer G., Pool-Zobel B.-L. 1998. Antigenotoxic and physiological properties of anthocyanin-containing fruit extracts in intestinal epithelial cells. V: *Polyphenols in food: first workshop Abereen, Scotland, 16 to 19 April, 1997/ COST 916 Bioactiveplant cell wall components in nutrition and health*. Amado R., Andersson H., Bardocz S., Serra F. (eds.). Aberdeen, European Communities: 131-136

Saija A., Trombetta D., Tomaino A., Lo Cascio R., Princi P., Uccella N., Bonina F., Castelli F. 1998. *In vitro* evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *International Journal of Pharmaceutics*, 166: 123-133

Salobir K. 2000. Antioksidanti v živilih-vpliv na zdravje. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 288-290

Schilcher H., Patz B., Schimmel K. 1990. Klinische Studie mit einem Phytopharmakon zur Behandlung von Mikrozirkulationsstörungen. *Arztezeitschrift für Naturheilverfahren*, 31: 819-826

Shahidi F., Naczk M. 1995. Antioxidant properties of food phenolics. V: *Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications*. Shahidi F. (ed.). Lancaster, Technomic Publishing Company: 235-273

Strack D. 1997. Phenolic metabolism. V: *Plant biochemistry*. Dey P.M., Harborne J.B. (eds.). San Diego, Academic Press: 387-416

Stumpf P.K. 1983. Plant bioacid biosynthesis. Present status, future prospects. What's new. *Plant Physiology*, 14: 25-28

Škarica B., Žužić I., Bonifačić M. 1996. Maslina in maslinovo ulje visoke kakvoće u Hrvatskoj. *Prirodno maslinovo ulje*. Rijeka, Tipograf : 31-77

Tovar M.J., Motilva M.J., Luna M., Girona J., Romero M.P. 2001. Analytical characteristics of virgin olive oil from young trees (Arbequina cultivar) growing under linear irrigation strategies. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 78: 1-7

Tovar M.J., Romero M.P., Girona J., Motilva M.J. 2002. L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 892-898

Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 46, 4113-4117

Vermerris W., Nicholson R. 2009. Phenolic compound biochemistry. Florida. Springer: 235-252

Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F.F., Galli C. 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3397-3401

Wood T.M., Bhat K.M. 1988. Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*, 160: 87-112

Wodner M., Lavee S., Epsteine E. 1988. Identification and seasonal changes of glucose, fructose and mannitol in relation to oil accumulation during fruit development in *Olea Europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 36: 47-54

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Heleni Ambramovič za vso pomoč in temeljit pregled diplomske naloge.

Za vso tehnično in strokovno pomoč se zahvaljujem somentorici asist. dr. Mihaeli Skrt.

Za pregled naloge se zahvaljujem doc. dr. Rajku Vidrihu.

Posebno zahvalo namenjam dipl. ing. Petri Terpinc za ogromno pomoč pri izdelavi in pisanju diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem staršem in sestri Maji za vso podporo, razumevanje in potrpljenje v času študija.

Hvala tudi Petri, Draganu, Petru Verunici in vsem ostalim prijateljem, ki so mi na kakršenkoli način pomagali.