

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Natalija PUSTIŠEK

**DOLOČANJE *in vivo* ANTIOKSIDATIVNE
UČINKOVITOSTI SLIV MED SKLADIŠČENJEM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Natalija PUSTIŠEK

**DOLOČANJE *in vivo* ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI SLIV
MED SKLADIŠČENJEM**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**DETERMINATION OF *in vivo* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
PLUMS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo, Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Rajka Vidriha, za somentorico izr. prof. dr. Polono Jamnik in za recenzenta izr. prof. dr. Blaža Cigića.

Mentor: prof. dr. Rajko Vidrih

Somentorica: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Recenzent: izr. prof. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno nemejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Natalija Pustišek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 664.8.03:634.22:577.1(043)=163.6
KG	slive/ <i>Prunus domestica</i> /antioksidativni potencial/prosti radikali/skladiščenje sliv/modificirana atmosfera/tretiranje z vročo vodo
AV	PUSTIŠEK, Natalija, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	VIDRIH, Rajko (mentor)/JAMNIK, Polona (somentorica)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	DOLOČANJE <i>in vivo</i> ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI SLIV MED SKLADIŠČENJEM
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
OP	XI, 44 str., 11 pregl., 13 sl., 5 pril., 67 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V magistrski nalogi smo določali <i>in vivo</i> antioksidativni potencial (AOP) v plodovih sliv treh sort z merjenjem znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Polovica vzorcev je bila na dan obiranja tretirana z vročo vodo (52 °C, 2 minuti), nato pa skupaj z ostalo polovico skladiščena pri temperaturi 1 °C v navadni atmosferi (NA) ali v modificirani atmosferi (MAP). Vsi vzorci so bili po 4 tednih skladiščenja homogenizirani v 2 % raztopini metafosforne kisline ter zamrznjeni. Ugotovili smo, da skladiščenje sliv v MAP, povzroči višjo <i>in vivo</i> antioksidativno učinkovitost pri vseh treh sortah sliv, v primerjavi s skladiščenjem v NA. Predhodna obdelava plodov sliv z vročo vodo je pozitivno vplivala na <i>in vivo</i> AOP. Najmanjši AOP so izkazovale vse tri sorte sliv skladiščene v navadni atmosferi. Korelacije med <i>in vitro</i> AOP ter <i>in vivo</i> AOP so bile ohlapne in statistično neznačilne, saj so p vrednosti za vse primerjave večje od $\alpha = 0,05$.

KEY WORD DOCUMENTATION

ŠD Du2

DK UDC 664.8.03:634.22:577.1(043)=163.6

KG plums/*Prunus domestica*/antioxidative potencial/free radicals/storage/modified atmosphere/hot water treatment

AV PUSTIŠEK, Natalija

SA VIDRIH, Rajko (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/CIGIČ, Blaž (reviewer)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

LI 2015

IN DETERMINATION OF *in vivo* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PLUMS

TD M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)

OP XI, 44 p., 11 tab., 13 fig., 5 ann., 67 ref.

IJ sl

JI sl/en

AI As part of the master thesis, we analyzed *in vivo* antioxidant potential (AOP) of three plum cultivars by intracellular oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. On harvest day, half of the samples were treated with hot water (52 °C, 2 minutes) and then processed together with the other half stored at 1 °C in normal atmosphere (NA) or modified atmosphere (MAP). After 4 weeks of storage, all samples were homogenised in 2 % metaphosphoric acid solution and frozen. We found a greater AOP in fruits stored in MAP compared to the storage in NA. Hot water treatment of plums resulted in a statistically significant higher AOP. The lowest *in vivo* AOP had plums stored in NA. The calculation of correlations between *in vivo* and *in vitro* AOP showed a poor correlation between the two parameters and were statistically non significant (p value for each comparison was greater than $\alpha = 0,05$).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SLIVE	3
2.1.1 Skupina evropskih sliv	3
2.1.1.1 Zorenje in zrelost plodov	3
2.1.2 Skupina kitajsko-japonskih sliv	4
2.1.3 Prehranska vrednost sliv	4
2.1.3.1 Vpliv sliv na zdravje	5
2.1.4 Sorte sliv, uporabljene v poskusu magistrske naloge	6
2.2 OKSIDATIVNI STRES	8
2.3 ANTIOKSIDANTI	9
2.3.1 Delitev antioksidantov	9
2.3.1.1 Endogeni antioksidanti	9
2.3.1.2 Eksogeni antioksidanti	10
2.3.2 Antioksidanti v slivah	10
2.3.2.1 Fenolne spojine	10
2.3.2.1.1 Flavonoidi	12
2.4 METODE DOLOČANJA ANTIOKSIDANTOV	12
2.4.1 <i>In vitro</i> metode	13
2.4.1.1 Določanje antioksidacijskega potenciala z DPPH [•] radikalom	13
2.4.1.2 Metoda ABTS ^{•+}	13
2.4.1.3 ORAC metoda	13
2.4.1.4 Kolorimetrično določanje razbarvanja radikala DMPD ^{•+}	14
2.4.2 <i>In vivo</i> metoda	14
2.4.2.1 Določanje intracelularne oksidacije celic kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.5 SKLADIŠČENJE SLIV	15
2.5.1 Normalna atmosfera	15
2.5.2 Modificirana atmosfera	16
2.6 METODA TRETIRANJA Z VROČO VODO	16
3 MATERIALI IN METODE DELA	17
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Vzorci sliv	18
3.1.2 Mikroorganizem	18

3.1.3 Gojišče	19
3.1.4 Raztopine in reagenti	20
3.1.4.1 Priprava 2 % raztopine metafosforne kisline (MFK)	20
3.1.4.2 Priprava fosfatnega pufra (PBS).....	20
3.1.4.3 Priprava 50 mM kalijevega fosfatnega pufra, pH= 7,8	20
3.1.4.4 Priprava 1 mM raztopine H ₂ DCFDA.....	21
3.1.5 Aparature in pribor.....	21
3.2 POTEK DELA.....	22
3.3 METODE DELA.....	22
3.3.1 Priprava ekstraktov sliv za analizo.....	22
3.3.2 Kultivacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	23
3.3.3 Izpostavitve celic kvasovke metafosforni kislini.....	23
3.3.4 Izpostavitve celic kvasovke ekstraktom sliv.....	24
3.3.5 Določanje znotrajcelične oksidacije celic	24
4 REZULTATI.....	25
4.1 IZPOSTAVITEV CELIC KVASOVKE RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM METAFOFORNE KISLINE.....	25
4.2 OCENA ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE CELIC	26
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	32
5.1 RAZPRAVA.....	32
5.2 SKLEPI.....	35
6 POVZETEK.....	36
7 VIRI	38
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Hranilna vrednost svežih sliv (vsebnost posameznih sestavin je podana na 100 g užitnega dela) (USDA, 2015)	5
Preglednica 2: Dejavniki, ki vplivajo na kakovost sliv po obiranju (Vangdal in sod., 2007)7	
Preglednica 3: Razvrstitev fenolnih spojin v rastlinah po številu C – atomov (Strack, 1997)	11
Preglednica 4: Oznake vzorcev	18
Preglednica 5: Sestava trdnega gojišča YEPD	19
Preglednica 6: Sestava tekočega gojišča YEPD	19
Preglednica 7: Sestava 50 mM K ₂ HPO ₄	20
Preglednica 8: Sestava 50 mM KH ₂ PO ₄	20
Preglednica 9: Relativni prirast fluorescence pri slivah glede na sorto, ne glede na pogoje skladiščenja. Črka N predstavlja število vzorcev sliv.	30
Preglednica 10: Relativni prirast fluorescence pri slivah glede na pogoje skladiščenja, ne glede na sorto.....	30
Preglednica 11: Korelacija (r) med <i>in vitro</i> ter <i>in vivo</i> AOP, skupnimi fenoli, flavonoidi in antocianini. Črka n označuje število vzorcev.	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Slive sorte 'Jubileum' (Plumbe & Maufe LLP, 2013)	6
Slika 2: Slive sorte 'Reeves' (Plumbe & Maufe LLP, 2013)	7
Slika 3: Slive sorte 'Excalibur' (Plumbe & Maufe LLP, 2013)	7
Slika 4: Shema poteka eksperimentalnega dela.....	22
Slika 5: Kultivacija kvasovke do stacionarne faze rasti na stresalniku	23
Slika 6: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki <i>S. cerevisiae</i> , tretirane z različnimi koncentracijami 2 % MFK. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd.	25
Slika 7: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki <i>S. cerevisiae</i> , tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', ki so bile skladiščene pri različnih pogojih: NA, MAP, NA + HWT, MAP + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Vrednosti, ki so označene z različno črko (a, b, c) v indeksu, se glede na način skladiščenja med seboj statistično značilno razlikujejo.....	26
Slika 8: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki <i>S. cerevisiae</i> , tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Jubileum', ki so bile skladiščene pri različnih pogojih: NA, MAP, NA + HWT, MAP + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Vrednosti, ki so označene z različno črko (a, b) v indeksu, se glede na način skladiščenja med seboj statistično značilno razlikujejo.....	27
Slika 9: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki <i>S. cerevisiae</i> , tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Reeves', ki so bile skladiščene pri različnih pogojih: NA, MAP, NA + HWT, MAP + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Črka a v indeksu (pri vseh skupinah) prikazuje, da med različnimi načini skladičenja sorte 'Reeves' ni statistično značilnih razlik.	27
Slika 10: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki <i>S. cerevisiae</i> , tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', 'Reeves' in 'Jubileum', skladiščenih v NA. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Črka a v indeksu (pri vseh skupinah) prikazuje, da med sortami, skladiščenimi v NA, ni statistično značilnih razlik.	28
Slika 11: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki <i>S. cerevisiae</i> , tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', 'Reeves' in 'Jubileum', skladiščenih v MAP. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Črka a v indeksu (pri vseh skupinah) prikazuje, da med sortami, skladiščenimi v MAP, ni statistično značilnih razlik.	29

Slika 12: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', 'Reeves' in 'Jubileum', skladiščenih v NA + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Vrednosti, ki so označene z različno črko (a, b) v indeksu, se glede na sorto med seboj statistično značilno razlikujejo. 29

Slika 13: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', 'Reeves' in 'Jubileum', skladiščenih v MAP + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Vrednosti, ki so označene z različno črko (a, b) v indeksu, se glede na sorto med seboj statistično značilno razlikujejo. 30

KAZALO PRILOG

Priloga A: Povprečni prirast fluorescence (PF) in relativni prirast fluorescence (RPF) vzorcev sliv različnih sort, skladiščenih v NA

Priloga B: Povprečni prirast fluorescence (PF) in relativni prirast fluorescence (RPF) vzorcev sliv različnih sort, skladiščenih v MAP

Priloga C: Povprečni prirast fluorescence (PF) in relativni prirast fluorescence (RPF) vzorcev sliv različnih sort, skladiščenih v NA + HWT

Priloga D: Povprečni prirast fluorescence (PF) in relativni prirast fluorescence (RPF) vzorcev sliv različnih sort, skladiščenih v MAP + HWT

Priloga E: Relativni prirast fluorescence pri slivah glede na sorto in pogoje skladiščenja

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACC	aminociklopropan-1-karboksilna kislina (ang. aminocyclopropane-1-carboxylic acid)
ABTS ⁺⁺	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
AOP	antioksidativni potencial
DCF	diklorofluoroscein
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilen diamin dihidroklorid
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
H ₂ DCF	2',7'-diklorodihidrofluorescein
H ₂ DCFDA	dihidro-2',7'-diklorofluorescein diacetat
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HO [•]	hidroksilni radikal
HSP	proteini toplotnega šoka
HWT	metoda potapljanja v vroči vodi (ang. hot water immersion treatment)
HWRB	metoda spiranja z vročo vodo v kombinaciji s ščetkanjem (ang. hot water rinsing and brushing)
MAP	modificirana atmosfera
MAP+HWT	modificirana atmosfera, kombinirana s predhodno obdelavo z vročo vodo
1-MCP	1-metilciklopropen
MFK	metafosforna kislina
Mn SOD	mangan vsebujoča superoksid dismutaza
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NA+HWT	navadna atmosfera, kombinirana s predhodno obdelavo z vročo vodo
O ₂ ^{•-}	superoksidni radikal
ORAC	kapaciteta absorpcije kisikovih radikalov (ang. Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PF	pirast fluorescence
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika
RFU	relativna fluorescenčna enota (ang. relative fluorescence unit)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species)
SOD	superoksid dismutaza
TNF- α	tumor nekrotizirajoči faktor α
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov
YEPD	gojišče kvasni ekstrakt-pepton-glukoza

1 UVOD

Začetek kmetijstva, ki sega deset tisoč let nazaj, je bil velik napredek v razvoju človeka, ki je omogočal boljši izkoristek energije pridobljene iz ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin. V prvi polovici prejšnjega stoletja so identificirali anorganske ter organske komponente v hrani, vključno z vitamini. Zadnje čase pa se veliko pozornosti namenja vplivu prehrane na zdravje ljudi. Postalo je namreč jasno, da določene skupine živil, kot sta sadje in zelenjava, vsebujeta številne fitokemikalije, ki lahko zmanjšajo tveganje za pojav določenih bolezni, kot so rak, kardiovaskularna obolenja ter številne druge kronične bolezni. Glavni zaščitni učinek pripisujejo predvsem antioksidantom. Le-ti nudijo zaščito pred škodljivim vplivom prostih radikalov, ki povzročajo oksidativne spremembe na proteinih, lipidih in nukleinskih kislinah. Zaradi tega se priporoča vsakodnevno uživanje zadostnih količin sadja in zelenjave (Forman in sod., 2014). Sliva je sadež, ki se ga za uživanje goji že več kot dva tisoč let. Tako v preteklosti kot tudi danes je znana po tem, da ublaži številne zdravstvene težave. Vsebuje namreč veliko prehranske vlaknine in antioksidantov, zaradi česar naj bi preprečevala težave povezane s srcem, osteoporozo ter rakom. V slivah imajo najpomembnejše antioksidativno delovanje fenolne spojine. Večjo koncentracijo fenolov imajo rdeče in vijolično obarvani sadeži (Cordova in Watson, 2011). Karotenoidi ter vitamini A, C in E v slivah prav tako delujejo antioksidativno.

Za skladiščenje morajo biti slive obrane v primernem času, takoj odpeljane v hladilnico, hitro ohlajene in postavljene v posebne komore, kjer v čim krajšem času vzpostavimo zelene razmere (Štampar in sod., 2014). Pri skladiščenju v normalni atmosferi se uravnava temperatura in relativna vlažnost, v kolikor je potrebno se izvrši tudi zamenjava zraka (prezračevanje) (Hribar, 2003). Pakiranje v modificirani atmosferi (MAP) je tehnika embaliranja, pri kateri zrak, ki se nahaja okoli živil, nadomestimo z ustrezno mešanico drugih plinov ter s tem podaljšamo obstojnost. Tovrstni pogoji zavirajo rast bakterij, kvasovk in plesni (Smith in Day, 2003). Za podaljšanje obstojnosti ter izboljšanje kvalitete sadja se uporabljajo še številne druge metode, kot so tretiranje z 1-MCP (1-metilciklopropen), uporaba užitnih prevlek (ang. edible coatings) sestavljenih iz hidroksipropil metilceluloze in lipidov (čebelji vosek ali šelak), eksogeno tretiranje s kalcijem ter tretiranje z vročo vodo (Manganaris in sod., 2008). Pri slednji metodi se uporablja potapljanje v vroči vodi (HWT), spiranje z vročo vodo in ščetkanje (HWRB), vroča para ali vroč suh zrak (Fallik, 2004). Poleg podaljšanja obstojnosti imajo prav tako pomemben vpliv na vsebnost bioaktivnih komponent.

V magistrskem delu smo z metodo določanja intracelularne oksidacije celic kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* določili antioksidativni potencial (AOP) treh sort sliv: 'Jubileum', 'Excalibur' ter 'Reeves'. Prav tako smo ugotavljali vpliv sorte, vrste skladiščenja in tretiranja z vročo vodo na AOP sliv ter povezavo med AOP *in vitro* ter *in vivo*.

1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Namen magistrskega dela je bil primerjava antioksidativnega potenciala ekstraktov sliv *in vitro* ter *in vivo*. V ekstraktih treh sort sliv ('Jubileum', 'Excalibur', 'Reeves'), vzgojenih po metodi konvencionalne pridelave, v katerih je bil AOP že določen *in vitro*, smo preverili antioksidativno delovanje *in vivo* ter primerjali rezultate analiz. Ker smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv tretiranja z vročo vodo na AOP, je bila polovica sadežev celotnega vzorca vseh treh sort pred skladiščenjem toplotno obdelana (potapljanje v vroči vodi s temperaturo 52 °C, 2 minuti). Prav tako nas je zanimalo, kako skladiščenje v navadni ter modificirani atmosferi in sorta sliv vplivata na AOP.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

- sorta značilno vpliva na *in vitro* ter *in vivo* antioksidativni potencial,
- toplotna obdelava sliv po obiranju pozitivno vpliva na večji AOP,
- skladiščenje v MAP v primerjavi s skladiščenjem v normalni atmosferi pozitivno vpliva na večji AOP,
- korelacija med *in vitro* ter *in vivo* antioksidativnim potencialom je visoka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SLIVE

Skupaj z ostalim koščičastim sadjem, uvrščamo slivo v družino rožnic (*Rosaceae*), v poddružino *Prunoideae* (koščičastoplodne rožnice) ter rod *Prunus*. Večina sliv, ki jih gojijo v komercialne namene, se uvršča v skupino evropskih (heksaploidi) ter skupino kitajsko-japonskih (diploidi) sliv (Okie in Hancock, 2008).

2.1.1 Skupina evropskih sliv

Sliva ali češplja je do 12 metrov visoko listopadno drevo, ki najbolje uspeva na vlažnih, s hranili bogatih tleh, ki so dovolj globoka in imajo rahlo kisel oziroma nevtralen pH (Brus, 2012). Pomembno je tudi, da vsebuje zemlja dovolj velike količine kalcija (Cordova in Watson, 2011). Drevesa prenesejo zelo nizke temperature (do $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$), cvet pa je za mraz zelo občutljiv, saj pozebe že pri $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uspevajo na nadmorski višini do 900 metrov. Slive so zahtevnejše glede vlage, ugodni pogoji so na področjih, kjer pade 1000–1400 mm padavin na leto in so le-te enakomerno razporejene (Jazbec in sod., 1995).

Poreklo slive ni čisto jasno, kot starševski vrsti pa najpogosteje navajajo mirobalano (*Prunus cerasifera*) in črni trn (*Prunus spinosa*) (Topp in sod., 2012).

Evropska sliva, latinsko ime *Prunus domestica*, najverjetneje izvira iz vzhodne Evrope ali zahodne Azije okoli Kavkaza in Kaspijskega jezera (Hansmann in Combrink, 2003). V to kategorijo se uvrščajo sorte, ki izvirajo iz vrst domača sliva (*Prunus domestica* L.) ter podvrsta cibora ali trnasta sliva (*Prunus domestica* subsp. *insititia*), ki so jo včasih obravnavali kot samostojno vrsto (Okie in Hancock, 2008; Brus, 2012). Slednja ima manjše liste, ter plodove (2–5 cm), ki so pogosto kisli ter trpki in se v večji meri predelajo v druge izdelke, kot so na primer destilati (Okie in Hancock, 2008; Topp in sod., 2012). Plodovi cibore so rumenkasti, rdečkasti ali zelenkasti ter redko modri, mezokarp pa ne odstopi od koščice. *P. domestica* subsp. *domestica*, je drevo brez trnov, ima gole poganjke ter zelenkastobeale cvetove. Plodovi so podolgovati, dolgi do 7,5 cm in imajo ploščate koščice, ki zlahka odstopijo od mezokarpa (Brus, 2012).

2.1.1.1 Zorenje in zrelost plodov

Zorenje plodov je kompleksen, genetsko programiran proces pri katerem pride do spremembe v barvi, teksturi, okusu ter aromi (Alexander in Grierson, 2002). Barva sliv je povezana z akumulacijo karotenoidov in antocianinov. Obe skupini pigmentov prevladujeta v povrhnjici, antocianini pa so v večji meri odgovorni za barvo plodov. Akumulacija slednjih je odvisna od sorte, pri čemer imajo slive, katerih meso je rdečkasto

obarvano, večjo vsebnost antocianinov. Pomemben vpliv ima tudi pozicija plodov na drevesu ter s tem izpostavljenost sončni svetlobi (Manganaris in sod., 2008). Pri temperaturi nad 35 °C pride do zmanjšane biosinteze (Goulas in sod., 2012). Koncentracija antocianinov se med zorenjem povečuje, kar se kaže v potemnitvi plodov (Usenik in sod., 2009). Najpogostejša karotenoida v slivah sta β -karoten in kriptoksantin, katera v večji meri prispevata k rumeno/oranžni barvi mesa plodov številnih sort. Tekom zorenja se poveča koncentracija topnih trdnih snovi, med katerimi predstavljajo sladkorji 65–80 %. Vsebnost jabolčne kisline se zmanjša (Manganaris in sod., 2008). Mehčanje plodov je povezano s spremembami v strukturi sestavin celične stene, predvsem pektina, hemiceluloze in celuloze (Goulao in Oliveira, 2008).

Sadje se glede na različna mehanizma zorenja deli v dve skupini: klimakterijsko ter neklimakterijsko sadje (Alexander in Grierson, 2002). Slive uvrščamo med klimakterijsko sadje, kar pomeni, da plod dozori v času maksimalne respiracije v katerem pride tudi do povečane tvorbe rastlinskega rastnega hormona etilena (Alexander in Grierson, 2002; Manganaris in sod., 2008). Določeni kultivarji sliv nimajo tipičnih značilnosti klimakterijskega sadja, saj je produkcija etilena manjša, kar naj bi bila posledica motene pretvorbe aminociklopropan-1-karboksilne kisline (ACC – ang. aminocyclopropane-1-carboxylic acid) do etilena. Značilnost klimakterijskega sadja je odzivnost na eksogeni etilen, kar omogoča zorenje plodov po obiranju, medtem ko dodatek 1-metilciklopropena le-to inhibira (Manganaris in sod., 2008).

Določanje optimalnega časa obiranja ni enostavno, saj pri slivah ne razpolagamo z indeksi zrelosti. Enega izmed najpomembnejših kriterijev zrelosti koščičastega sadja predstavlja barva povrhnjice, vendar se pri nekaterih sortah sliv barva kože razvije zelo hitro, ko je plod še nezrel, brez pravega okusa in arome. Zaradi tega je smiselno, da se pri določanju zrelosti upoštevajo dodatni parametri, kot sta vsebnost topnih trdnih snovi in titracijska kislost (Usenik in sod., 2008).

2.1.2 Skupina kitajsko-japonskih sliv

Skupina kitajsko-japonskih sliv zajema sorte, ki so nastale s križanjem diploidnih orientalskih in ameriških vrst. Orientalske slive izvirajo iz Kitajske, na Japonsko pa so jih prenesli v 15. stoletju. Od tu so jih prenesli v Ameriko, kjer so jih križali z ameriškimi vrstami. Zaradi velike občutljivosti na zgodnje spomladanske pozebe, bakterioze in leptonekroze, se v Evropi, razen v Italiji, niso razširile (Štampar in sod., 2014).

2.1.3 Prehranska vrednost sliv

Slive imajo nizko kalorično in relativno visoko hranilno vrednost. Vsebujejo ogljikove hidrate (saharoza, glukoza, fruktoza), organske kisline, prehransko vlaknino (pektin),

tanine, aromatične snovi ter encime. Plodovi so bogati z minerali in vitamini (C, A, B1). Z zorenjem se vsebnost mineralnih snovi povečuje (Arion in sod., 2014). Vrednost skupnih kislin je 1300 mg/100 g, jabolčna kislina prevladuje (Štampar in sod., 2014).

Slive, težje od 50 g, se priporočajo za uživanje kot sveže sadje, manjši plodovi (< 40 g) pa za predelavo v marmelade, kompote, žganje. Zaradi vsebnosti sladkorjev in sorbitola se slive pogosto uporabljajo v pekovskih izdelkih, kjer zadržujejo vlago le-teh, v obliki aditivov pa jih najdemo tudi v mesnih izdelkih (Cordova in Watson, 2011).

Preglednica 1: Hranilna vrednost svežih sliv (vsebnost posameznih sestavin je podana na 100 g užitnega dela) (USDA, 2015)

Snov		Količina (enota /100 g)
energijska vrednost (kcal)		46
voda (g)		87,23
beljakovine (g)		0,70
skupne maščobe (g)		0,28
skupni ogljikovi hidrati (g)		11,42
sladkorji (g)		9,92
prehranska vlaknina (g)		1,4
vitamini topni v vodi	vitamin C (mg)	9,5
	tiamin (mg)	0,028
	riboflavin (mg)	0,026
	niacin (mg/ekvivalent)	0,417
	piridoksin (mg)	0,029
	folat (µg)	5
vitamin topni v maščobah	A (mg/ekvivalent)	0,104
	E (mg/ekvivalent)	0,26
	K (µg)	6,4
minerali	kalcij (mg)	6
	železo (mg)	0,17
	magnezij (mg)	7
	fosfor (mg)	16
	kalij (mg)	157
	cink (mg)	0,10

2.1.3.1 Vpliv sliv na zdravje

Pozitiven učinek sliv na zdravje se pripisuje predvsem vsebnosti polifenolov, ki odstranjujejo škodljive proste radikale v našem telesu (Cordova in Watson, 2011). Fenolne spojine preprečujejo oksidacijo LDL holesterola, prehranska vlaknina (pektin) pa znižuje vsebnost holesterola, pri čemer se zmanjša verjetnost za pojav ateroskleroze (Gallaher in

Gallaher, 2009). Zaradi ugodne količine kalija se slive priporočajo za bolnike z arterijsko hipertenzijo. Slive vplivajo na peristaltiko prebavnega trakta, upočasnjujejo absorpcijo ogljikovih hidratov, pospešujejo razgradnjo lipidov v telesu, dajejo občutek sitosti ter znižujejo koncentracije homocisteina (Arion in sod., 2014). Za suhe slive je že od nekdaj znano, da se uporabljajo kot odvajalno sredstvo v primeru konstipacije, v obdobju srednjega veka pa so jih uporabljali za zdravljenje razjed v ustih (Cordova in Watson, 2011). Suhe slive prav tako pomagajo preprečevati zgubljanje kostne mase, kar je še posebej pomembno pri osebah, ki imajo osteoporozo (Cordova in Watson, 2011). Osteoklasti, ki nastanejo iz cirkulirajočih monocitov oziroma makrofagov v tkivih, imajo pomembno vlogo pri resorpciji kosti. Njihovo diferenciacijo in aktivacijo uravnavajo ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika (RANKL), receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika ter osteoprotegerin (inhibitor kostne resorpcije). Pri pomanjkanju spolnih hormonov in kroničnem vnetju je osteoklastogeneza zaradi oksidativnega stresa in proinflammatoryh molekul, kot so tumor nekrotizirajoči faktor α (TNF- α), prostaglandin E₂ in dušikov oksid (NO), povečana. Ugotovljeno je bilo, da ekstrakti polifenolov iz suhih sliv zavirajo ekspresijo RANKL s strani osteoblastov ter tako zmanjšajo razgradnjo kosti (Bu in sod., 2008). V *in vitro* študiji, ki so jo opravili Bu in sodelavci (2008), so kot model za preučevanje diferenciacije in aktivnosti osteoklastov ter prekursorjev le-teh, uporabili mišjo makrofagno celično linijo RAW 264.7. Ugotovili so, da ekstrakti polifenolov iz suhih sliv zmanjšajo diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov tudi v prisotnosti RANKL. Tovrstno učinkovanje je povezano tudi z inhibicijo vnetnih mediatorjev (TNF- α , NO ...) (Bu in sod., 2008). Slive naj bi bile učinkovite tudi pri preventivi ter tretiranju rakavih obolenj. Nezreli plodovi namreč inhibirajo aktivnost proteinov, ki so vključeni v procesih napredovanja bolezni (Cordova in Watson, 2011).

2.1.4 Sorte sliv, uporabljene v poskusu magistrske naloge

'Jubileum' je švedska sorta sliv, za katero so značilni veliki, ovalni plodovi temno modre barve (Vangdal in sod., 2007).



Slika 1: Slive sorte 'Jubileum' (Plumbe & Maufe LLP, 2013)

'Reeves' je kanadska sorta, katere plodovi so čvrsti, z nizko vsebnostjo sladkorjev in kislin ter prijetnega okusa (Vangdal in sod., 2007).



Slika 2: Slive sorte 'Reeves' (Plumbe & Maufe LLP, 2013)

Za angleško sorto 'Excalibur' je značilna nizka vsebnost kislin in odlična aroma (Vangdal in sod., 2007; Slimestad in sod., 2009).



Slika 3: Slive sorte 'Excalibur' (Plumbe & Maufe LLP, 2013)

Plodovi 'Reeves' in 'Excalibur' so rumeno rdečkaste barve (Slimestad in sod., 2009).

Preglednica 2: Dejavniki, ki vplivajo na kakovost sliv po obiranju (Vangdal in sod., 2007)

Sorta	Mehčanje plodov	Odpornost proti plesni	Življenjska doba
'Jubileum'	srednje	ne	srednje dolga
'Excalibur'	postane mehka	ne	kratka
'Reeves'	obdrži čvrstost	močna odpornost	dolga

Preglednica 2 je povzeta po rezultatih raziskave, ki so jo opravili Vangdal in sod. (2007), v kateri so slive ('Jubileum', 'Reeves', 'Excalibur' ...) skladiščili kratek čas ustrezen času od obiranja do potrošniške porabe. Slive so obrali, ko je vsaj 50 % plodov doseglo optimalno

zrelost, nato pa so jih razdelili v tri skupine: premalo zrele, optimalno zrele in prezrele. Analize so opravili po enem tednu, dveh ter treh tednih skladiščenja. Prezrele slive so skladiščili samo dva tedna. V preglednici 2 je zajeto povprečje vseh treh skupin, dveh načinov skladiščenja (4 °C in 20 °C), časa skladiščenja ter triletnih raziskav (Vangdal in sod., 2007).

2.2 OKSIDATIVNI STRES

Kisik je nujno potreben za preživetje in normalno funkcioniranje večine evkariontskih organizmov hkrati pa igra ključno vlogo pri nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS – ang. reactive oxygen species)). Mednje sodijo superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni ($HO^{\bullet}$) in številni drugi radikali ter vodikov peroksid (H_2O_2), ki je neradikalna vrsta. Poleg tega lahko metabolizem celic povzroči nastanek prostih radikalov iz dušika, t. i. dušikove reaktivne zvrsti (NRS) (Jie in sod., 2013). Prosti radikali so visoko reaktivni atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom, ki nastanejo pri cepitvi kovalentne vezi (McArdle in sod., 2013). V normalnih količinah so pomembni za številne procese, kot sta regulacija prenosa signalov ter obramba pred škodljivimi antigeni; nekatere vrste levkocitov proizvajajo radikale kot orožje za uničenje bakterij (Osredkar, 2012; Jie in sod., 2013). Prav tako prispevajo k fiziološkim funkcijam centralno živčnega sistema, kar vključuje tudi proces učenja in spomin. ROS so v telesu v ravnotežju z antioksidanti. Oksidativni stres se pojavi ob porušenju ravnotežja zaradi prekomerne tvorbe ROS ali pomanjkanja antioksidantov, kar vodi do številnih poškodb celičnih struktur. ROS lahko poškodujejo celično membrano (lipidna peroksidacija), proteine in RNA/DNA. Oksidacija dednega materiala povzroči motnje v transkripciji in gensko mutacijo. Posledice se kažejo v obolenju ljudi za rakom, arteriosklerozo, artritisom, nevrodegenerativnimi boleznimi ter številnimi drugimi (Jie in sod., 2013).

V začetku petdesetih let 20. stoletja je hiter razvoj jedrske energije sprožil potrebo po zaščiti pred škodljivimi vplivi sevanja. Le-to povzroči tvorbo prostih radikalov v našem telesu, medtem pa prisotnost kisika, ki s prostimi radikali reagira in povzroča verižne reakcije, škodo še poveča. Ostali zunanji vplivi, ki povzročajo nastanek prostih radikalov so še intenzivna aerobna vadba, UV svetloba, toplota, kajenje, onesnaženo okolje ter celo nekatera zdravila (analgetiki, citostatiki ...) (Forman in sod., 2014). Tudi procesi, ki potekajo v našem telesu povzročajo tvorbo prostih radikalov. To se zgodi pri celičnem dihanju oziroma natančneje v sklopu dihalne verige. Njihov nastanek je posledica uhajanja elektronov iz elektronske transportne verige. Elektron se prenese direktno na molekulo kisika namesto na naslednjega prenašalca elektronov v verigi. Pri tem nastane superoksidni radikal $O_2^{\bullet-}$. Približno 1–2 % vdihanega kisika dnevno se v mitohondrijih reducira v superoksidni radikal. Le-tega pretvori mangan vsebujoča superoksid dismutaza (Mn SOD) v H_2O_2 . V prisotnosti bakrovih in železovih ionov nastanejo pogoji za Fentonovo reakcijo v kateri pride do tvorbe $HO^{\bullet}$ (Cadenas in Davies, 2000). Ker reagira hitreje od hitrosti

difuzije (nezmožnost potovanja) in zaradi izjemne reaktivnosti, deluje le lokalno (Osredkar, 2012). Prosti radikali se lahko tvorijo tudi v endoplazmatskem retikulumu in plazemski membrani (Jie in sod., 2013).

2.3 ANTIOKSIDANTI

Obstaja več definicij, ki opredeljujejo pomen besede antioksidant. Po definiciji živilskih tehnologov so antioksidanti tiste sestavine živil oziroma dodatki živilom, ki so lovilci radikalov, tvorci kelatov s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo/zmanjšujejo pojav žarkosti živil ter druge oksidativne spremembe senzoričnih in prehranskih lastnosti živil. Za dietetike in nutricioniste so antioksidanti snovi, ki ščitijo telo pred škodljivimi učinki prostih radikalov, kovinskih ionov ter drugih oksidantov (Vidrih in Kač, 2000). S kemijskega stališča je podana bolj natančna definicija, ki pravi, da so antioksidanti nukleofilni reducenti, ki direktno reagirajo z oksidanti, ter tako preprečujejo oksidativne spremembe tretje molekule (Forman in sod., 2014).

Razlike v antioksidativni učinkovitosti bioaktivnih komponent so povezane s kemijsko strukturo. Večji AOP imajo fenolne spojine, ki imajo (Slatnar in sod., 2012):

- večje število hidroksilnih skupin,
- *o*-dihidroksi razporeditev –OH skupin na B obroču,
- OH-skupino na poziciji C3, C4 na B obroču,
- aglikonsko obliko,
- dvojno vez na C obroču.

2.3.1 Delitev antioksidantov

2.3.1.1 Endogeni antioksidanti

Endogeni antioksidanti nastajajo v organizmu. Primarno obrambo pred ROS predstavljajo trije pomembni encimi: glutation peroksidaza, katalaza in superoksid dismutaza (SOD), kateri katalizirajo pretvorbo radikalov v manj reaktivne produkte. Ena molekula encima katalaze pretvori šest bilijonov molekul H_2O_2 v vodo in kisik. Encim SOD pretvarja superoksidne anione do H_2O_2 , ki je nadalje substrat za katalazo. Sekundarno encimsko obrambo predstavljata glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, ki regenerira NADPH (reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata) s čimer se ustvarja reduktivno okolje ter glutation reduktaza, katera reducira glutation. Encima neposredno ne nevtralizirata prostih radikalov, ampak okrepi delovanje primarne encimske obrambe. Med endogene antioksidante spada tudi ubikinol-10, ki je reducirana oblika koencima Q10 (Shebis in sod., 2013). Prav tako pa tudi sečna in lipoična kislina, hormoni (melatonin, estrogen ...) ter beljakovine, ki vežejo železo in baker (transferin in ceruloplazmin) (Papavasiliou, 1999).

2.3.1.2 Eksogeni antioksidanti

V skupino eksogenih antioksidantov, ki jih v telo vnesemo s hrano, se uvrščajo rastlinski fenoli, karotenoidi, fosfolipidi, vitamini (A, E, C), produkti Maillardove reakcije (dihidropiridini), koencim Q10, minerali, kot sta cink in selen (sestavna dela antioksidativnih encimov) in peptidi (glutation). Nahajajo se predvsem v sadju in zelenjavi, najdemo jih tudi v oljih (sezamovo olje, olivno olje ...) (Gordon, 2003; Shebis in sod., 2013). Antioksidanti, ki so v živilih naravno prisotni, pridobivajo pa jih tudi s sintezo, so predvsem askorbinska kislina, tokoferoli ter citronska kislina. V skupino antioksidantov, ki se pridobivajo zgolj s kemijsko sintezo, uvrščamo fenolne derivate (propil galat, BHA, BHT) (Abramovič, 2011).

2.3.2 Antioksidanti v slivah

Slive vsebujejo pomembne sekundarne metabolite, kot so flavonoidi, fenolne kisline ter številne druge, ki so pomembni antioksidanti (Manganaris in sod., 2008). Lombardi-Boccia in sod. (2004) so ugotovili, da sestava tal pomembno vpliva na vsebnost antioksidantov v slivah. Koncentracije askorbinske kisline, α - in γ -tokoferolov, ter β -karotena, so bile višje v slivah, ki so bile ekološko pridelane in so rasle na tleh prekritih s travnikom. Največja vsebnost fenolnih kislin je bila v primeru, ko so bila tla prekrita z deteljo (tudi tu je šlo za ekološko pridelavo), skupna vsebnost fenolnih spojin pa je bila večja v slivah pridelanih na konvencionalen način (obdelana tla) (Lombardi-Boccia in sod., 2004).

AOP sliv je močno povezan z vsebnostjo fenolov ne pa z vsebnostjo antocianinov, saj le-ti predstavljajo majhen del celotne vsebnosti fenolov v plodovih sliv (20 %) in malo vplivajo na splošno antioksidativno kapaciteto (Puerta-Gomez in Cisneros-Zevallos, 2011).

2.3.2.1 Fenolne spojine

Fenoli so ciklične benzenove spojine, ki imajo eno ali več hidroksilnih skupin (Ferrazzano in sod., 2011). Predstavljajo največjo skupino v vodi topnih fitokemikalij (Kaulmann in sod., 2014). Razvrščajo se v različne skupine glede na število ogljikovih atomov in strukturo osnovnega ogljikovega skeleta. Poleg spojin topnih v vodi, ki se nahajajo v vakuloah, sodijo v skupino fenolov še različne polimerizirane oblike, kot so tanini ali popolnoma netopni lignini (Murkovic, 2003). V sadju se v glavnem nahajajo brezbarvne fenolne kisline (npr. hidroksicimetne kisline) in flavonoidi. V nezrelem sadju je vsebnost fenolnih spojin bistveno večja (izjema so antocianidini) kot v zrelem sadju (Štampar in sod., 2014).

Preglednica 3: Razvrstitev fenolnih spojin v rastlinah po številu C – atomov (Strack, 1997)

število C-atomov	osnovni skelet	skupina	primeri
6	C ₆	enostavni fenoli	katehol, hidrokinon
7	C ₆ - C ₁	fenolne kisline	siringinska kislina, <i>p</i> -hidroksibenzojska kislina
8	C ₆ - C ₂	fenilacetne kisline	2-hidroksifenilacetna kislina
9	C ₆ - C ₃	hidroksicimetne kisline fenilpropeni kumarini izokumarini kromoni	kavna kislina miristicin 6,7-dimetoksikumarin hidrangenol evgenin
10	C ₆ - C ₄	naftokinoni	juglon
13	C ₆ - C ₁ - C ₆	ksantoni	mangiferin
14	C ₆ - C ₂ - C ₆	stilbeni antrakinoni	lanularska kislina emodin
15	C ₆ - C ₃ - C ₆	flavonoidi	kvercetin
18	(C ₆ - C ₃) ₂	lignani neolignani	pinoresinol evsiderin
30	(C ₆ - C ₃ - C ₆) ₂	biflavonoidi	amentoflavon
N	(C ₆ - C ₃) _n (C ₆) _n (C ₆ - C ₃ - C ₆) _n	lignini melanini kondenzirani tanini (flavonoli)	lignini katehol melanini kondenzirani tanini

Tako sveži plodovi kot tudi suhe slive vsebujejo fenole, ki imajo antioksidativno delovanje. Na njihovo vsebnost vplivajo številni faktorji, kot so sestava tal, zrelost plodov skladiščenje po obiranju ter metoda sušenja (Cordova in Watson, 2011). UV-B sevanje in nizke temperature inducirajo akumulacijo v epidermalnih celicah (Harbaum-Piayda in sod., 2010). Večjo koncentracijo fenolov imajo rdeče in vijolično obarvani sadeži. Poleg barve imajo vpliv tudi na okus (Cordova in Watson, 2011). Encimska oksidacija fenolov povzroči porjavenje mesa, delno pa se spremeni tudi okus. Oksidacija je posledica poškodb celic v plodu zaradi mehanskih poškodb, mraza in staranja. Slive vsebujejo 61 mg/100 g do 209 mg/100 g fenolnih spojin (izraženo kot ekvivalent galne kisline), odvisno od sorte (Kaulmann in sod., 2014). Nekateri avtorji navajajo, da je vsebnost še višja in sicer do 375 mg/100 g (Štampar in sod., 2014).

Antioksidativni potencial fenolnih spojin je posledica njihove sposobnosti, da lovijo proste radikale, so reducenti, vežejo kovinske ione v stabilne komplekse ter deaktivirajo prooksidativne encime lipooksigenaze (Abramovič, 2011). Neoklorogenska ter

klorogenska kislina, dve glavni fenolni spojini v suhih slivah, izkazujeta močan potencial odstranjevanja superoksidnih radikalov (Gallaher in Gallaher, 2009).

2.3.2.1.1 Flavonoidi

Flavonoidi so največja skupina fenolnih spojin. Sestavljeni so iz aromatskih obročev A in B, ki ju povezuje heterociklični obroč C. Glede na substituiranost obroča C razvrstimo flavonoide v devet skupin: flavani, flavanoni, flavanoli ali katehini, izoflavanoni, flavoni, flavonoli, izoflavoni, halkoni ter antocianidini (Abramovič, 2011).

V skupino antocianidinov spadajo naslednje spojine: malvidin, cianidin, delphinidin, petunidin, pelargonidin in še nekatere druge. Glavni tipi antocianidinov se ločijo le po številu –OH skupin na aromatskem obroču B. Z vezavo sladkorjev (glukoza, ramnoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza ...) preidejo v antocianine. V naravi je večina antocianinov v glikozilirani obliki (Miguel, 2011). Antocianini so najpomembnejši vodotopni pigmenti rastlin in dajejo modro, rdeče ter vijolično obarvanje (cvetovom, sadju ...) (Murkovic, 2003). Njihova primarna vloga je, da delujejo kot atraktanti (privlačijo žuželke in ptiče) ter tako skrbijo za opraševanje rastlin in raznašanje semen (Harborne, 1967). Prav tako ščitijo pred prekomerno UV radiacijo in oksidacijo celic (prostim radikalom donirajo vodikov atom) (Goulas in sod., 2012). Najpogostejši antocianini, prisotni v slivah, so cianidin-3-rutinozid, cianidin-3-glukozid ter peonidin-3-rutinozid (Manganaris in sod., 2008). Slive s črno barvo plodu vsebujejo 39,7 mg antocianinov/100 g svežega plodu (brez koščice), ostale (rdeče in rumene) pa nekoliko manj (Goulas in sod., 2012).

Rezultati študije, ki sta jo opravila Puerta-Gomez in Cisneros-Zevallos (2011), so pokazali, da se v slivah sinteza antocianinov nadaljuje tudi po tem, ko plodovi že dosežejo polno zrelost (Puerta-Gomez in Cisneros-Zevallos, 2011).

2.4 METODE DOLOČANJA ANTIOKSIDANTOV

Večina danes aktualnih antioksidantov, med katerimi so najpomembnejše fenolne spojine, spada v skupino sekundarnih rastlinskih metabolitov. Gre za strukturno različne spojine, ki nastajajo po številnih metabolnih poteh, vendar iz relativno maloštevilnih in splošno znanih in pomembnih prekurzorjev (piruvat, acetat, acetil-CoA ...). Za razumevanje in pojasnitev njihove antioksidativne aktivnosti *in vivo* sta izolacija in kemijska karakterizacija teh spojin vsekakor potreben, ne pa tudi zadosten pogoj (Vidrih in Kač, 2000).

V rastlinski celici so fenolne spojine v večji meri vezane na strukturne elemente celične stene (pektin, arabinoksilani) in proteine. Del fenolov je v obliki topnih konjugatov (glikozidi in estri), le manjši delež fenolnih spojin pa je prostih. Fenole, ki so vezani na

celično steno pridobimo le, če ustvarimo pogoje za cepitev vezi, ter tako povzročimo razgradnjo strukturnih elementov celične stene in omogočimo sprostitve vezanih fenolnih spojin. Izolacijo tovrstnih snovi iz rastlinskega materiala omogoča večstopenjska ekstrakcija ter hidroliza z dodatkom encimov (pektinaze in celulaze) ali kisline oziroma alkalij (Abramovič, 2011).

AOP preiskovanega vzorca praviloma merimo primerjalno, kar pomeni, da standardnemu (za oksidacijo občutljivemu) substratu, ki ga izpostavimo standardnemu (ponovljivemu) "oksidacijskemu kvaru" (znana obdelava s kisikom, znan vir prostih radikalov, ...), dodamo antioksidant in primerjamo potek oksidacije glede na enak vzorec. Le-tega izpostavimo enakim vplivom, vendar ga ne zaščitimo z antioksidantom (Vidrih in Kač, 2000).

2.4.1 *In vitro* metode

2.4.1.1 Določanje antioksidacijskega potenciala z DPPH[•] radikalom

Molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) je stabilen prosti radikal, saj zaradi delokalizacije prostega elektrona molekule ne tvorijo dimer, ki je značilen za večino ostalih prostih radikalov. Delokalizacija elektronov povzroča močno vijolično barvo raztopine DPPH[•] v metanolu. Metoda temelji na reakciji radikala z antioksidanti (preiskovan vzorec), pri kateri nastane reducirana oblika DPPH₂, zaradi česar raztopina izgubi vijolično barvo. Izginjanju barve sledimo spektrofotometrično z merjenjem absorbanco pri 517 nm (Alam in sod., 2013).

2.4.1.2 Metoda ABTS^{•+}

Pri tej indirektni metodi se meri izguba barve, do česar pride zaradi dodatka antioksidantov k kromoforju ABTS^{•+} (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)) (modro zelene barve). Antioksidanti prisotni v vzorcu reducirajo ABTS^{•+} kar vodi do razbarvanja. Absorbanco merimo pri 750 nm. Rezultate izrazimo kot antioksidativno učinkovitost v ekvivalentih Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kislina), ki se uporablja kot standard. Gre za sintetični, v vodi topni analog vitamina E (Alam in sod., 2013).

2.4.1.3 ORAC metoda

Pri metodi ORAC (ang. Oxygen Radical Absorbance Capacity) določamo učinkovitost lovljenja kisikovih radikalov. Kot tarčna molekula, na katero delujejo peroksilni radikali, se uporablja β -fikoeritrin ali fluorescein. Vir radikalov je AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid). Postopek poteka tako, da dodamo preiskovanemu vzorcu

β -fikoeritrin ter AAPH, ki povzroči oksidacijo fikoeritrina zaradi česar se zmanjša njegova fluorescenca. Kot standard služi Trolox, zato so ORAC vrednosti izražene kot μmol Trolox/g (Alam in sod., 2013).

2.4.1.4 Kolorimetrično določanje razbarvanja radikala $\text{DMPD}^{\bullet+}$

N,N-dimetil-p-fenilen diamin dihidroklorid (DMPD) je spojina, ki se uporablja za merjenje antioksidativnega potenciala sadnih sokov in ostalih naravnih izdelkov. V prisotnosti feri železa pride do tvorbe $\text{DMPD}^{\bullet+}$ radikalov. Fe^{3+} se veže na molekulo DMPD pri čemer ostane v feri obliki, nastali kompleks pa se obarva rahlo roza. Če dodamo takšni mešanici antioksidante pride do redukcije Fe^{3+} v Fe^{2+} , kar vodi v razbarvanje $\text{DMPD}^{\bullet+}$ (Mehdi in Rizvi, 2013). Postopek temelji na merjenju zmanjšanja absorbance DMPD pri absorpcijskem maksimumu (505 nm) (Alam in sod., 2013).

2.4.2 *In vivo* metoda

2.4.2.1 Določanje intracelularne oksidacije celic kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasovke spadajo v enega izmed najpreprostejših modelov ekvariotskih organizmov, kljub temu pa so ključni celični procesi med kvasovko in človekom ohranjeni. Kvasne celice imajo pred humanimi celicami določene tehnične prednosti, kot so hiter življenjski cikel (hitreje pridobljeni rezultati) ter kultivacija, ki ne vključuje zahtevnih sterilnih tehnik ter dragih gojišč. Po inokulaciji kvasnih celic v hranilni medij, ki vključuje glukozo, poteka njihova proliferacija, dokler niso porabljeni viri ogljika. Kultura takrat doseže nasičenje pri tem pa nastopi stacionarna faza, ki odraža njeno stabilno metabolno in oksidativno stanje (Zakrajšek in sod., 2011). Celice se ne delijo več, metabolizem pa se upočasni. V takšnem stanju lahko celice preživijo brez dodanih hranil več tednov oziroma mesecev (Jakubowski in sod., 2000).

Kvasovka *S. cerevisiae* je dobro raziskan evkariontski organizem in je kot modelni organizem primeren v stacionarni fazi rasti, saj so kvasne celice v tej fazi podobne celicam večceličnih organizmov: večino energije pridobijo v sklopu mitohondrijskega dihanja, celice so v tako imenovani G_0 fazi (faza mirovanja ali kviescenca), poškodbe se skozi čas kopičijo (Zakrajšek in sod., 2011).

Barvilo 2',7'-diklorodihidrofluorescein (H_2DCF) se uporablja za detekcijo H_2O_2 , hidroperoksidov in dušikovih oksidov ter za študije oksidativnega stresa na celični ravni. Metoda določanja znotrajcelične oksidacije temelji na merjenju fluorescence oksidiranega barvila H_2DCF . Le-ta se doda celicam v obliki diacetat estra (H_2DCFDA), ki zaradi svoje nepolarnosti enostavno prehaja preko membran celic, kjer ga nespecifične esteraze hidrolizirajo do H_2DCF . Nastali produkt je polaren zaradi česar ostane ujet znotraj celic in

ne prehaja preko membran. V notranjosti celic ga reaktivne kisikove zvrsti oksidirajo do diklorofluorosceina (DCF). DCF fluorescira pri valovni dolžini 520 nm, valovna dolžina vzbujanja (ekscitacije) pa je 488 nm (Jakubowski in Bartosz, 1997). Oksidacijo molekule H_2DCF ne povzročajo samo ROS temveč več dejavnikov, zaradi česar se le ta uporablja za splošno oceno intracelularne oksidacije in ne za določanje posameznih zvrsti (Wang in Joseph, 1999).

Metoda je relativno poceni, enostavna, hitra ter robustna. Kljub temu pa ima določene pomanjkljivosti, saj obstajajo številni dokazi, da H_2DCF ne reagira vedno v enakem obsegu z najpogostejšimi reaktivnimi kisikovimi zvrstmi. Prav tako naj bi bilo celo samo barvilo sposobno generirati ROS. Še vedno ni dovolj jasno, kateri oksidanti so odgovorni za nastanek DCF. Barvilo 2',7'-diklorodihidrofluorescein naj bi reagiralo tudi s številnimi ostalimi spojinami znotraj celice, kot so citokrom c, peroksidaze ter oksidaze, ki povzročijo njegovo oksidacijo in povečano fluorescenco brez sprememb reaktivnih zvrsti v celici (Hoet in sod., 2013). Oksidacija H_2DCF z H_2O_2 je odvisna od prisotnosti peroksidaz ali od prehodnih kovin vezanih na proteine, in sama od sebe ne poteče (Winterbourn, 2014).

2.5 SKLADIŠČENJE SLIV

Za skladiščenje morajo biti slive obrane v primernem času, takoj odpeljane v hladilnico, hitro ohlajene in postavljene v posebne komore, kjer v čim krajšem času vzpostavimo želene razmere (Štampar in sod., 2014). Skladiščenje pri nizkih temperaturah mora biti ustrezno regulirano, saj se lahko v nasprotnem primeru razvijejo poškodbe plodov kot posledica prenizkih temperatur (ang. chilling injury). Lahko se pojavi porjavenje in prosojnost mesa, izcejanje soka, akumulacija rdečega pigmenta. Večina sort sliv je občutljiva na tovrstne poškodbe, kadar jih skladiščimo pri 5 °C, saj gre za posledico fizioloških odzivov, ki lahko pri relativno visoki temperaturi (2–8 °C) še potekajo. Za podaljšanje obstojnosti se priporoča skladiščenje pri 0 °C in 95 % relativni zračni vlagi. Zaradi občutljivosti na nizke temperature je čas skladiščenja od enega do šest tednov, odvisno od sorte in ravnanja s plodovi po obiranju (Manganaris in sod., 2008).

2.5.1 Normalna atmosfera

Pri skladiščenju v normalni atmosferi se uravnava temperatura in relativna vlažnost, v kolikor je potrebno se izvrši tudi zamenjava zraka (prezračevanje) (Hribar, 2003). Zrak sestavlja 78,09 % dušika (N_2), 20,95 % kisika (O_2) ter 0,03 % ogljikovega dioksida (CO_2) (Smith in Day, 2003). Da bi dosegli želene učinke, kot so upočasnjeno dihanje in izguba vode, zmanjšana sinteza etilena ter mikrobiološko neoporečnost, je potrebno doseči nizke temperature čim prej, vsaj 4 ure po obiranju. Pri skladiščenju je pomembno, da ne pride do temperaturnih nihanj, ki bi vplivala na respiracijo in s tem na kakovost živila. Visoka

vlažnost preprečuje izgubo vode, venenje in grbančenje plodov. V kombinaciji z visokimi temperaturami pa povzroči razvoj plesni in bakterij (Tan in Considine, 2006).

2.5.2 Modificirana atmosfera

Pakiranje v modificirani atmosferi (MAP) je tehnika embaliranja pri kateri zrak, ki se nahaja okoli živil, nadomestimo z ustrezno mešanico drugih plinov, ter s tem podaljšamo obstojnost. Tovrstni pogoji zavirajo rast bakterij, kvasovk in plesni. Za razliko od kontrolirane atmosfere, se pri MAP koncentracije posameznih plinov po pakiranju ne kontrolirajo več (Smith in Day, 2003). Uporablja se embalaža s selektivno prepustnostjo plinov, kar pomeni da omogoča stalen vstop O_2 (v takšni količini kot ga porablja živilo) ter difuzijo CO_2 iz embalaže (Robertson, 2003). Običajno se za pakiranje v MAP uporabljajo naslednji plini: CO_2 , N_2 in O_2 . Priporočena sestava kontrolirane ali MAP pri skladiščenju oziroma transportu sliv je 1–2 % O_2 ter 0–5 % CO_2 pri temperaturi 0–5 °C (Rama in Narasimham, 2003).

V raziskavi, ki so jo opravili Guan in Dou (2010), so ugotavljali vpliv MAP (pri temperaturi 0 °C) na kakovost ter porjavenje sliv. V prvih 45 dneh je prišlo do manjše sinteze antocianinov v primerjavi s kontrolo (nepakirane slive, temperatura skladiščenja 0 °C), na koncu skladiščenja (60. dan) pa bistvenih razlik v koncentraciji antocianinov pri slivah pakiranih v MAP in kontroli ni bilo. Podobno je bilo tudi pri vsebnosti fenolnih spojin. Pri slivah, ki so bile pakirane v MAP, je bila aktivnost encima polifenol oksidaze zmanjšana, zaradi česar je prišlo do manjše oksidacije fenolov. Posledica oksidacije je tvorba kinonov, ki so odgovorni za porjavenje tkiva (Guan in Dou, 2010).

2.6 METODA TRETIRANJA Z VROČO VODO

Zaradi vse večjega zavedanja potrošnikov o škodljivosti kemijskega tretiranja sadja in zelenjave, se je povečala potreba po razvoju mehanskih metod obdelave. Med tovrstnimi metodami (uporaba materialov z oznako GRAS, MAP, vakuumsko pakiranje ...) ima največji potencial metoda tretiranja z vročo vodo. Začetki uporabe segajo v leto 1922, ko se je tovrstna obdelava uporabljala za preprečevanje gnilobe citrusov (Fallik, 2004).

Uporablja se metoda potapljanja v vroči vodi (HWT – ang. hot water treatment), spiranje z vročo vodo in ščetkanje (HWRB – ang. hot water rinsing and brushing), vroča para ali vroč suh zrak. Najpogosteje uporabljen medij je voda, saj ima večjo toplotno prevodnost kot zrak. Pri metodi HWT se uporabljajo temperature med 43 °C in 53 °C, sam postopek pa se izvaja od nekaj minut do 2 uri. Čas je odvisen od velikosti plodov, večji kot so, daljši je čas. Tretiranje s HWRB traja 10–25 sekund pri temperaturi med 48 °C in 63 °C. Pri slednjem gre za novejšo tehniko, prva uporaba na tržišču sega v leto 1996. Sveže plodove spirajo s curkom vroče vode, pri čemer se peljejo po krtačah izdelanih iz srednje mehkih

sintetičnih ščetin. Obe metodi inhibirata zorenje, pojav gnilobe in v večini primerov odpornost plodov na patogene organizme ter poškodbe zaradi nizkih temperatur. Za slive sorte Friar je primerna obdelava z HWRB pri temperaturi 45–50 °C (35–30 minut). HWRB zavira aktivnost encima polifenol oksidaze, ki oksidira fenole in povzroča porjavenje (Fallik, 2004).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci sliv

Za analizo smo uporabili tri sorte sliv: 'Excalibur', 'Jubileum' in 'Reeves'. Obrane so bile v komercialni zrelosti na raziskovalni postaji Bioforsk Ullensvang v kraju Lofthus na Norveškem. Plodovi so bili skladiščeni v NA ali MAP (folija X-tend s tako prepustnostjo za O₂ in CO₂, da je bila vsebnost O₂ 10,0 % ± 1,0 % in CO₂ 10,0 % ± 1,0 %), v temi in pri temperaturi 1 °C. Polovica vzorcev je bila na dan obiranja tretirana z vročo vodo (52 °C, 2 minuti), nato pa skupaj z ostalo polovico skladiščena v NA ali v MAP. Vsi vzorci so bili po 4 tednih skladiščenja homogenizirani v 2 % raztopini metafosforne kisline (10 g vzorca + 10 ml 2 % metafosforne kisline) ter zamrznjeni in prepeljani v Slovenijo na Biotehniško fakulteto, kjer smo jih do analiz skladiščili v zamrzovalni komori pri –17 °C.

Preglednica 4: Oznake vzorcev

Oznaka vzorca/Oznaka paralelke	Sorta	Čas skladiščenja	Vrsta skladiščenja	Tretiranje z vročo vodo (HWT)
1/1a	'Excalibur'	4 tedni	NA	-
2/2a	'Excalibur'	4 tedni	MAP	-
3/3a	'Excalibur'	4 tedni	NA	+
4/4a	'Excalibur'	4 tedni	MAP	+
5/5a	'Reeves'	4 tedni	NA	-
6/6a	'Reeves'	4 tedni	MAP	-
7/7a	'Reevesv'	4 tedni	NA	+
8/8a	'Reeves'	4 tedni	MAP	+
9/9a	'Jubileum'	4 tedni	NA	-
10/10a	'Jubileum'	4 tedni	MAP	-
11/11a	'Jubileum'	4 tedni	NA	+
12/12a	'Jubileum'	4 tedni	MAP	+
K (kontrola)				

NA – navadna atmosfera, MAP – modificirana atmosfera, NA + HWT – navadna atmosfera, kombinirana s predhodno obdelavo z vročo vodo, MAP + HWT – modificirana atmosfera, kombinirana s predhodno obdelavo z vročo vodo

3.1.2 Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM2155) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete. Kvasovko smo hranili v petrijevkah s trdnim YEPD gojiščem

(kvasni ekstrakt-pepton-glukoza) v inkubatorju pri 28 °C, za analizo pa smo uporabili 3 dni staro kulturo.

3.1.3 Gojišče

Za precepljanje in hranjenje kulture smo uporabili YEPD agar.

Sestavine iz preglednice 5 smo natehtali v 2-L čašo in premešali s pomočjo mešalnika. Gojišče smo nato sterilizirali z avtoklaviranjem pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar, 20 minut. Po končani sterilizaciji smo ga ohladili na 45 °C in razlili v petrijeve plošče. Le-te smo ovili z aluminijasto folijo in shranili pri sobni temperaturi do uporabe.

Preglednica 5: Sestava trdnega gojišča YEPD

Sestavina	Masa (g)
kvasni ekstrakt (Biolife)	5
bakteriološki pepton (Biolife)	10
glukoza (Merck)	10
agar (Biolife)	10
destilirana voda (dH ₂ O)	500 mL

Za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase smo uporabili tekoče YEPD gojišče. Kultivacija do stacionarne faze rasti je potekala na stresalniku pri 220 obr./min in temperaturi 28 °C.

Sestavine iz preglednice 6 smo natehtali v 2-L čašo in premešali s pomočjo mešalnika. V dve 1-L erlenmajerici (Shot Duran) z enim utorom in stransko roko smo z merilnim valjem prenesli po 360 mL gojišča. Uporabili smo tudi dve 100-mL erlenmajerici BOROSILICAT z enim utorom in stransko roko, v kateri smo prenesli po 50 mL gojišča. Steklovino z gojiščem smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Pred uporabo smo gojišče ohladili na sobno temperaturo.

Preglednica 6: Sestava tekočega gojišča YEPD

Sestavina	Masa (g)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10
bakteriološki pepton (Biolife)	20
glukoza (Merck)	20
destilirana voda (dH ₂ O)	500 mL

3.1.4 Raztopine in reagenti

- PBS pufer,
- 50 mM kalijev fosfatni pufer, pH 7,8,
- metafosforna kislina (Molekula) za pripravo 2 % raztopine,
- 96 % etanol (Merck),
- H₂DCFDA (Sigma).

3.1.4.1 Priprava 2 % raztopine metafosforne kisline (MFK)

Zatehtali smo 2 g MFK (HPO₃) in jo kvantitativno prenesli v 100-mL bučko ter jo z Mili-Q vodo dopolnili do oznake. Bučko smo prenesli na mešalnik, kjer smo jo pustili toliko časa, da so se raztopili vsi kristali.

3.1.4.2 Priprava fosfatnega pufra (PBS)

Uporabili smo komercialno mešanico (ang. Phosphate Buffered Saline). Za pripravo 300 mL PBS pufra smo v ustreznem volumnu bidestilirane vode s pomočjo magnetnega mešala raztopili 3 tabletki (Oxoid). Raztopino smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar nato pa do uporabe shranili v hladilniku pri + 4 °C. Pufer smo uporabili za vzdrževanje kvasovk v stacionarni fazi rasti.

3.1.4.3 Priprava 50 mM kalijevega fosfatnega pufra, pH= 7,8

Preglednica 7: Sestava 50 mM K₂HPO₄

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
K ₂ HPO ₄ (Merck)	4,36 g	50 mM
bidestilirana voda (ddH ₂ O) do 500 mL		

Preglednica 8: Sestava 50 mM KH₂PO₄

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
KH ₂ PO ₄ (Merck)	3,40 g	50 mM
bidestilirana voda (ddH ₂ O) do 500 mL		

Kalijev fosfatni pufer (50 mM) smo pripravili tako, da smo v eno čašo zatehtali 4,36 g K₂HPO₄ (B6), v drugo pa 3,40 g KH₂PO₄ (B7). Sledil je prenos v 500-mL bučki, kateri smo do oznake napolnili z bidestilirano vodo. Posamezni komponenti pufra smo združili tako, da je bil končni pH enak 7,8 (B7 smo dodajali k B6). Pufer smo nato filtrirali preko filtra z velikostjo por 0,2 µm. Pred uporabo smo ga shranili pri temperaturi 28 °C.

3.1.4.4 Priprava 1 mM raztopine H₂DCFDA

Pol ure pred merjenjem znotrajcelične oksidacije smo zatehtali 0,0026 g H₂DCFDA (shranjen na –20 °C) nato pa v temi dodali 5,3 mL 96 % etanola in dobro premešali.

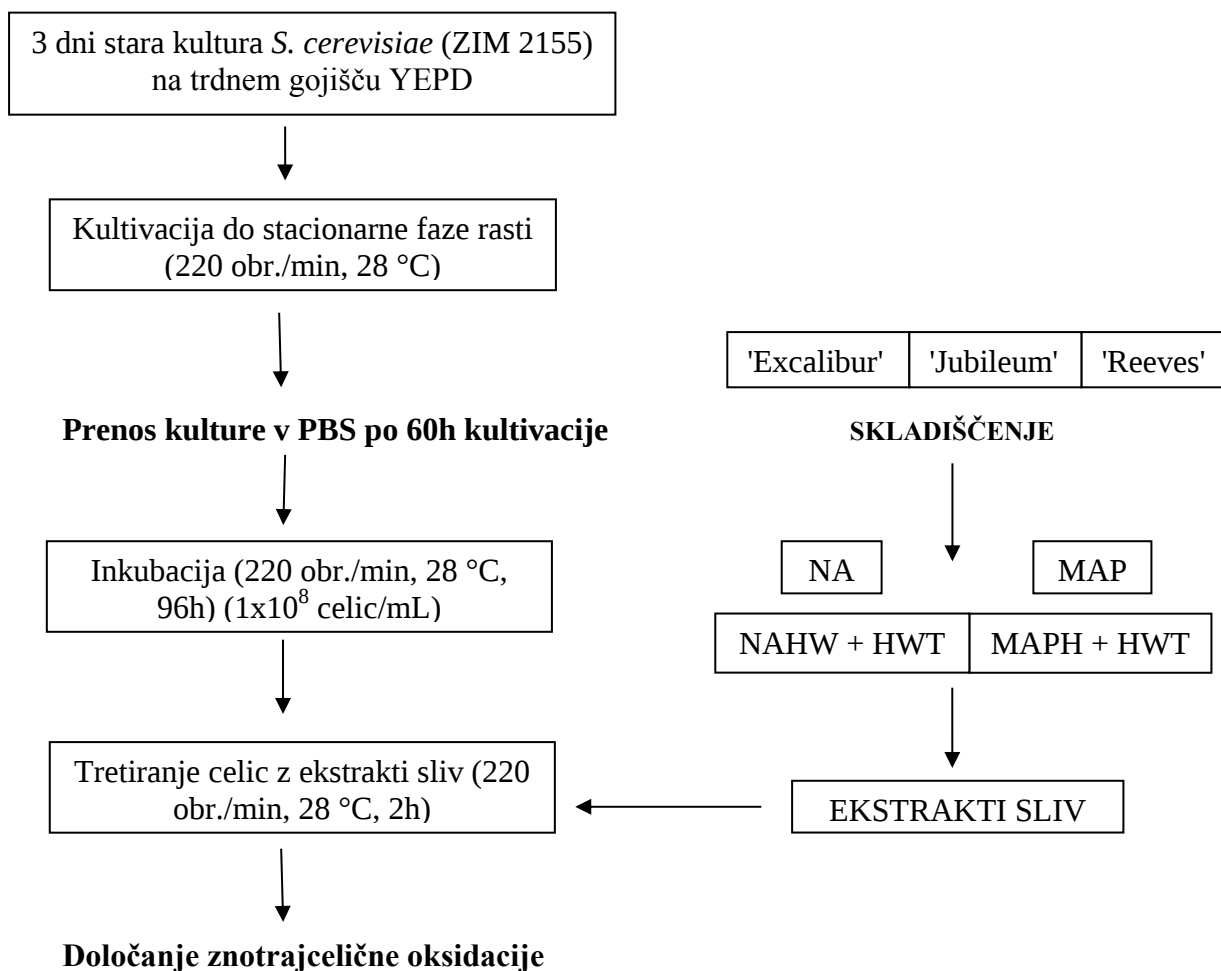
3.1.5 Aparature in pribor

Pri pripravi vzorcev, reagentov in določanju znotrajcelične oksidacije smo uporabili v nadaljevanju našete aparature in pribor:

- zamrzovalna omara LTH, –20 °C,
- hladilnik (BSK International SK 405),
- tehtnica PS 1200/C/2 (Radwag),
- tehtnica excellence (Sartorius),
- magnetno mešalo MM-540 (Tehtnica Železniki),
- 100-mL erlenmajerica s stransko roko in enim utorom (Borosilicat),
- 500-mL erlenmajerica s stransko roko in enim utorom (Simex),
- 1000-mL erlenmajerica s stransko roko in enim utorom (Shot Duran),
- merilni valj,
- gobasti zamašek,
- aluminijasta folija,
- kontrolni avtoklavirni trak,
- parni sterilizator – avtoklav (Semlab),
- brezprašna komora LVF P122 (Iskra Pio),
- gorilnik,
- cepilne zanke,
- petrijevke (Golias),
- fotometer MA 9510 za merjenje optične gostote (Iskra),
- stresalnik Multitron (INFORS HT),
- centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica),
- centrifuga CENTRIC 200 (Tehtnica),
- centrifuga 5415 D (Eppendorf),
- falkonke,
- pipete,
- 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf),
- vrtinčnik TTS2 (Ika),
- inkubator IG 150 (Jouan),
- 96-prostorne mikrotitrskne ploščice za merjenje luminiscence (Nunc),
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire 2 (Tecan),
- računalniški program Magellan,

- pH-meter (Mettler Toledo),
- magnetno mešalo-Rotamix SHP-10 (Tehtnica),
- filter (0,2 μm , 0,45 μm).

3.2 POTEK DELA



Slika 4: Shema poteka eksperimentalnega dela

3.3 METODE DELA

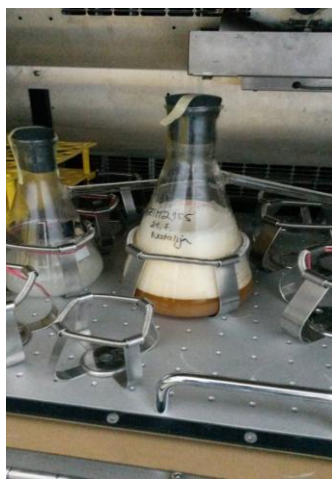
3.3.1 Priprava ekstraktov sliv za analizo

Vzorce (Preglednica 4) smo odmrznili v mlačni vodi in po 2 mL vsakega prenesli v mikrocentrifugirke ter centrifugirali (12000 g, 5 minut). Sledila je filtracija (filter s premerom por 0,45 μm) v 1,5-mL mikrocentrifugirke. Iz vsake smo nato prenesli po

500 μ L vzorca v dve novi 1,5-mL mikrocentrifugirki. Do nadaljnje uporabe smo vzorce (ekstrakte) shranili pri -17°C .

3.3.2 Kultivacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Za kultivacijo kvasovke do stacionarne faze rasti smo uporabili 3 dni staro kulturo *S. cerevisiae*. Le-to smo prenesli s trdnega gojišča YEPD v 50 mL tekočega gojišča YEPD (100-mL erlenmajerica Borosilicat z enim utorom) do optične gostote $\text{OD} = 0,95$. Nato smo odvzeli 40 mL kulture in jo prenesli v 360 mL tekočega gojišča YEPD (1-L erlenmajerica Shot Duran z enim utorom). Sledila je kultivacija do stacionarne faze rasti na stresalniku pri 28°C in 220 obr./min., 60 ur.



Slika 5: Kultivacija kvasovke do stacionarne faze rasti na stresalniku

50 mL brozge smo centrifugirali 3 minute pri 4000 obr./min in odlili supernatant. Biomaso smo resuspendirali v 50 mL PBS ogretega na 28°C . Postopek spiranja sedimenta smo ponovili še enkrat. 40 mL kvasne suspenzije smo nato prenesli v 500-mL erlenmajerico Simex z enim utorom, v katero smo dodali še 160 mL na 28°C ogretega PBS. Koncentracije kvasne suspenzije je bila tako 1×10^8 celic/mL. Sledilo je stresanje na stresalniku pri 220 obr./min. in 28°C , 96 h.

3.3.3 Izpostavitve celic kvasovke metafosforni kislini

Celice kvasovk smo pred tretiranjem z ekstraktom sliv najprej izpostavili različnim koncentracijam metafosforne kisline (MFK), da bi preverili njen vpliv na proces določanja znotrajcelične oksidacije celic. V laminariju smo v 50-mL falkonko odpipetirali 10 mL suspenzije kvasovke *S. cerevisiae* v pufru PBS ter dodali 25 μ L 2 % raztopine MFK v eno,

50 µL MFK v drugo ter 100 µL MFK v tretjo falkonko. Pripravili smo tudi kontrolo, kjer smo namesto MFK dodali ustrezen volumen PBS.

Sledilo je stresanje kulture na stresalniku 2 uri pri 220 obr./min. in 28 °C.

3.3.4 Izpostavitve celic kvasovke ekstraktom sliv

V laminariju smo v 50 mL falkonko odpipetirali 10 mL suspenzije kvasovke *S. cerevisiae* v pufru PBS ter dodali 50 µL vzorca (ekstrakt sliv v 2 % MFK). Namesto ekstrakta sliv smo pri kontroli dodali 50 µL 2 % MFK. Sledilo je stresanje na stresalniku 2 uri pri 220 obr./min. in 28 °C.

3.3.5 Določanje znotrajcelične oksidacije celic

Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovke *S. cerevisiae* smo določali po protokolu povzetem po Jakubowski in sod. (2000). Po tretiranju celic kvasovke z ekstraktom sliv (ali z MFK) smo v 2-mL Eppendorf centrifugirke prenesli 2 mL celične suspenzije, nato pa centrifugirali 5 minut pri 14000 obr./min. Po odstranitvi supernatanta smo sedimentu dodali 2 mL 50 mM kalijevega fosfatnega pufru pH 7,8 (ogretega na 28 °C) ter dobro premešali s pomočjo vrtinčnika. Sledilo je ponovno centrifugiranje 5 minut pri 14000 obr./min. Postopek spiranja sedimenta smo ponovili dvakrat. Sedimentu smo nato dodali 990 µL 50 mM kalijevega fosfatnega pufru (pH= 7,8), dobro premešali ter inkubirali 5 minut pri 28 °C (stabilizacija). Po končani inkubaciji smo v temi dodali 10 µL 1 mM sveže pripravljene raztopine H₂DCFDA in dobro premešali. Centrifugirke smo nato prenesli v falkonko prekrito z aluminijevo folijo (zaščita pred svetlobo) ter inkubirali na stresalniku 15 minut pri 28 °C. Po končani inkubaciji smo vzorce v dveh ponovitvah po 200 µL v petih minutah prenesli na mikrotitrsko ploščico. S pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan) in programske opreme Magellan smo spremljali 2-h kinetiko fluoresciranja vzorcev. Valovna dolžina vzbujanja je bila 488 nm, emisije pa 520 nm. Ocenno znotrajcelične oksidacije (PF-prirast fluorescence) smo opravili s pomočjo naslednje formule:

$$\frac{F_{120}-F_0}{F_0} \quad \dots (1)$$

kjer je F_{120} vrednost fluorescence ob času $t = 120$ min, ter F_0 vrednost fluorescence ob času $t = 0$ min.

Rezultate smo izrazili kot relativne vrednosti prirasta fluorescence glede na kontrolo (netretirana kultura), pri čemer nižje vrednosti pomenijo večji AOP in obratno. Za izračun smo uporabili formulo:

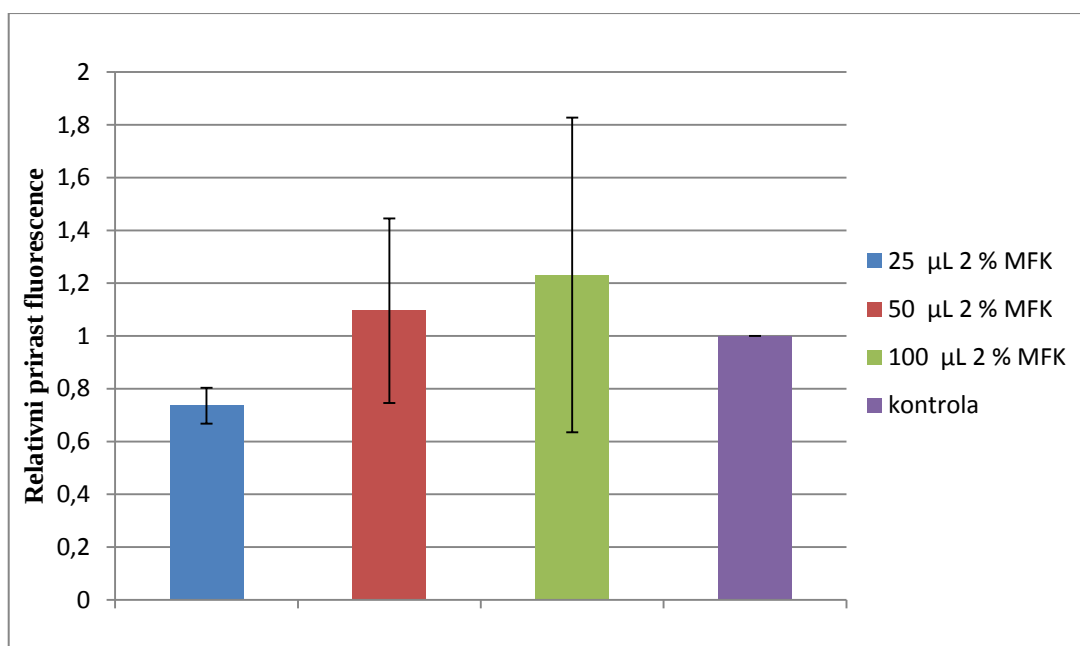
$$\frac{PF_{vzorec}}{PF_{kontrola}} \quad \dots (2)$$

4 REZULTATI

V magistrski nalogi smo določali *in vivo* antioksidativni potencial (AOP) v plodovih sliv treh sort z merjenjem znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po protokolu povzetem po Jakubowski in sod. (2000).

4.1 IZPOSTAVITEV CELIC KVASOVKE RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM METAFOSFORNE KISLINE

Ker so bili ekstrakti sliv pripravljani z metafosforno kislino, smo pred začetkom določanja znotrajcelične oksidacije celic kvasovke *S. cerevisiae*, le-te izpostavili različnim koncentracijam MFK, da bi preverili njen vpliv na prirast fluorescence. Vrednost relativnega prirasta fluorescence je bila pri tretiranju kvasovk s 50 μL 2 % raztopine MFK enaka 1,09 zaradi česar smo v nadaljevanju eksperimenta uporabljali 50 μL posameznega ekstrakta sliv, stabiliziranega z MFK.

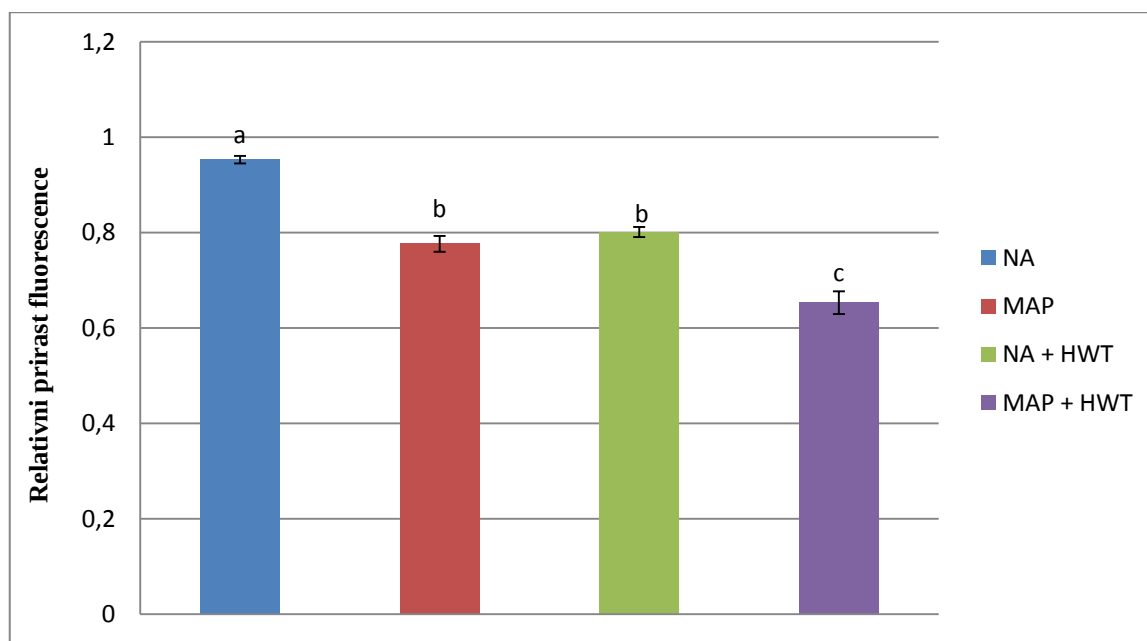


Slika 6: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z različnimi koncentracijami 2 % MFK. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd.

4.2 OCENA ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE CELIC

Preverili smo, kakšen je vpliv vrste skladiščenja na AOP ter ali sorta značilno vpliva na *in vivo* antioksidativni potencial. Ugotavljali smo tudi korelacijo med *in vitro* ter *in vivo* antioksidativnim potencialom.

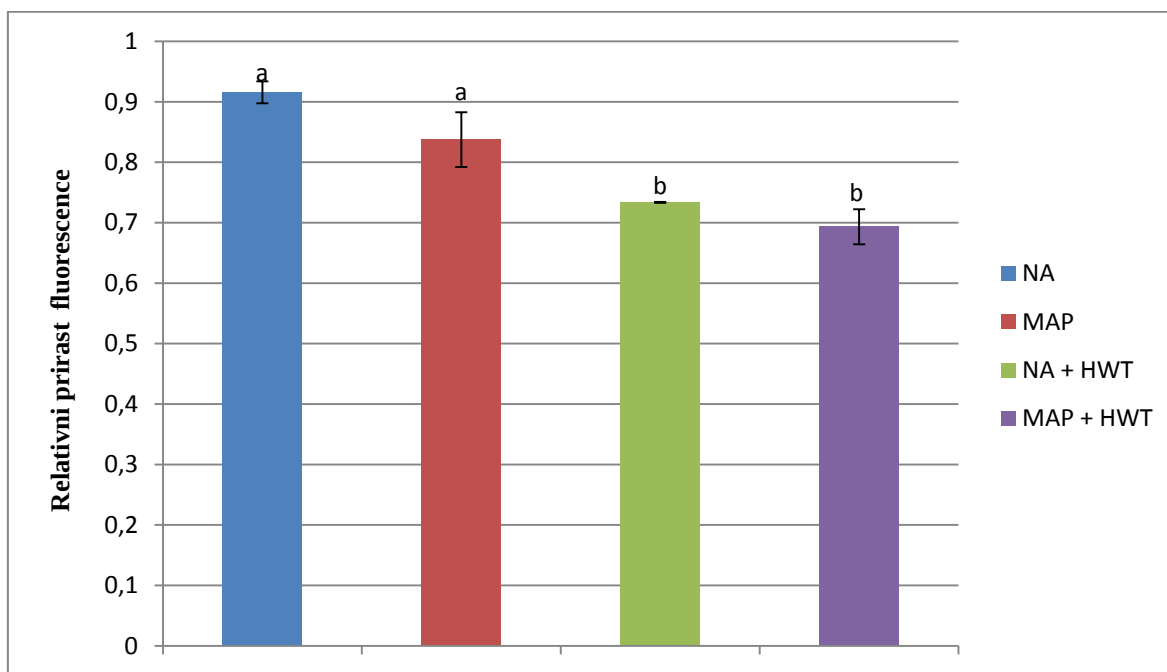
Z grafa (Slika 7) je razvidno, da skladiščenje sliv sorte 'Excalibur' v MAP v kombinaciji s predhodno obdelavo z vročo vodo (tretiranje z vročo vodo pri 52 °C, 2 minuti) najbolj vpliva na antioksidativno učinkovitost in se od drugih načinov skladiščenja statistično značilno razlikuje. Med skladiščenjem v MAP in NA + HWT ni statistično značilnih razlik. Najslabši AOP ima sorta 'Excalibur' pri skladiščenju v navadni atmosferi.



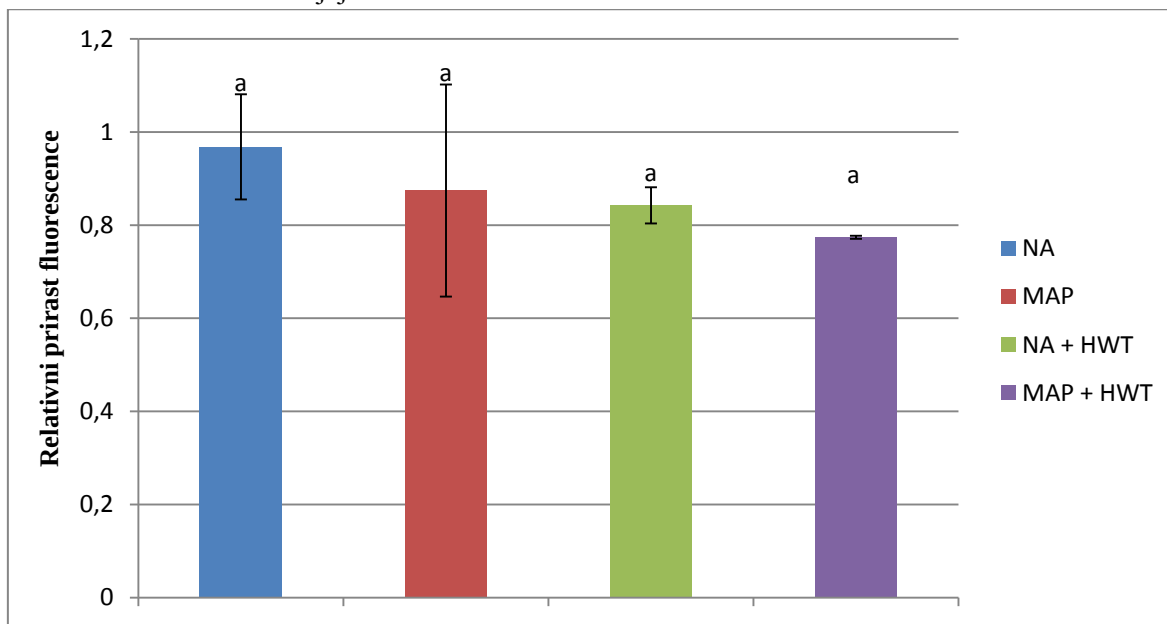
Slika 7: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', ki so bile skladiščene pri različnih pogojih: NA, MAP, NA + HWT, MAP + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Vrednosti, ki so označene z različno črko (a, b, c) v indeksu, se glede na način skladiščenja med seboj statistično značilno razlikujejo.

Najmanjši relativni prirast fluorescence pri sorti 'Jubileum' (Slika 8) je pri pogojih, kjer so bili plodovi sliv pred skladiščenjem obdelani z vročo vodo. Med skladiščenjem v MAP + HWT ter NA + HWT ni statistično značilnih razlik. Skladiščenje v NA in MAP se statistično značilno razlikuje od skladiščenja v NA + HWT in MAP + HWT, medtem ko med skladiščenjem v NA ter MAP ni značilnih razlik.

Pri sorti 'Reeves' (Slika 9) razlike med skladiščnimi pogoji niso statistično značilne.

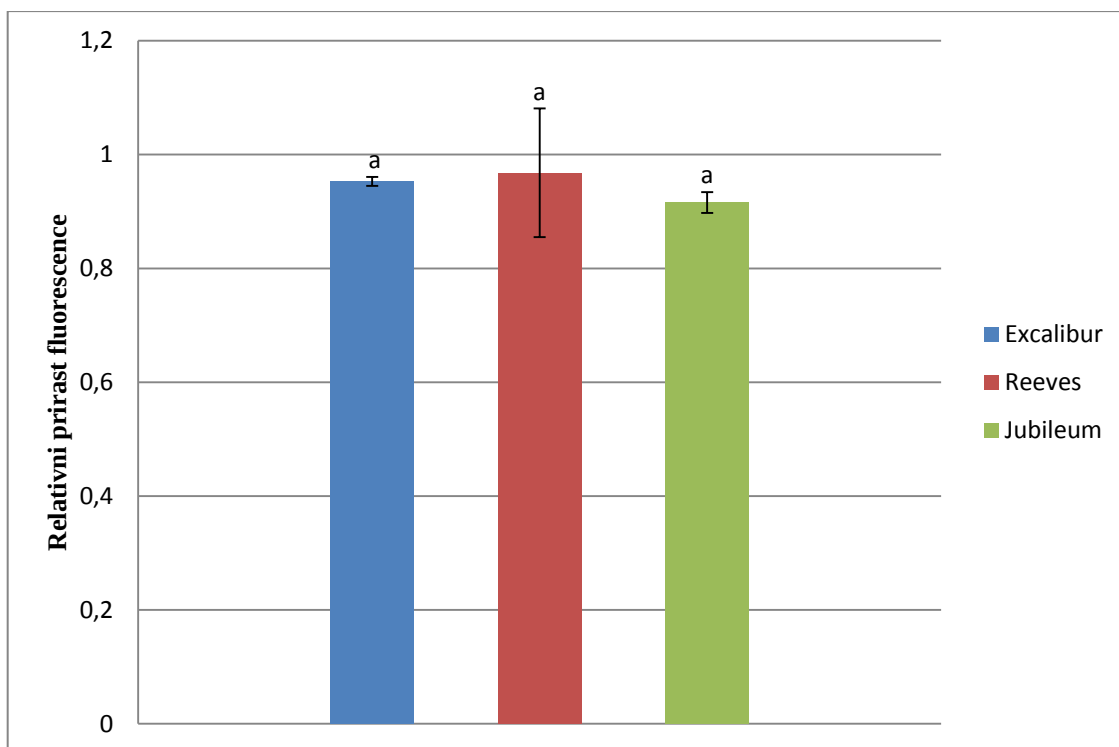


Slika 8: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Jubileum', ki so bile skladiščene pri različnih pogojih: NA, MAP, NA + HWT, MAP + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Vrednosti, ki so označene z različno črko (a, b) v indeksu, se glede na način skladiščenja med seboj statistično značilno razlikujejo.

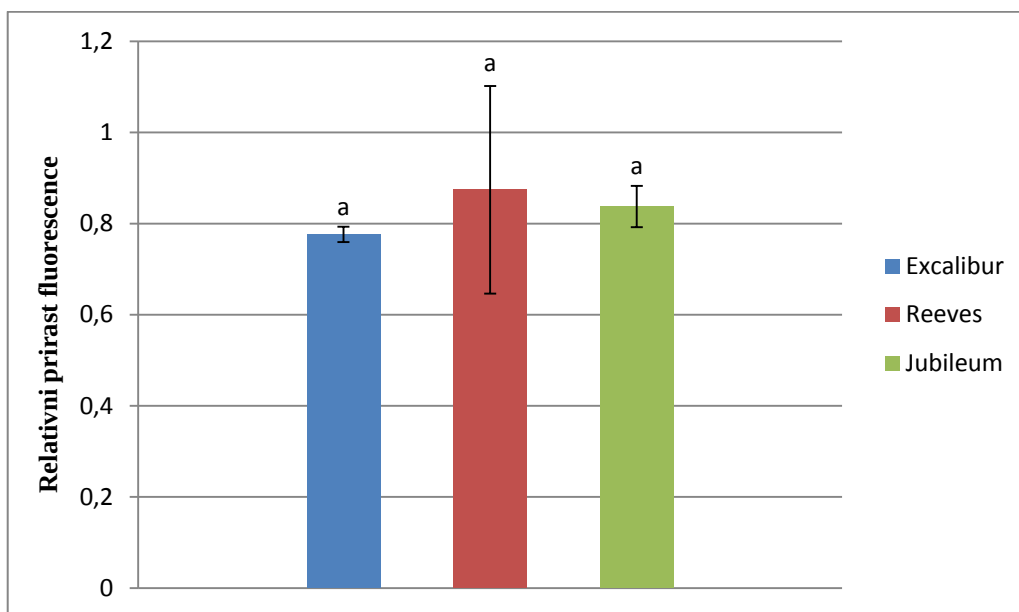


Slika 9: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Reeves', ki so bile skladiščene pri različnih pogojih: NA, MAP, NA + HWT, MAP + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Črka a v indeksu (pri vseh skupinah) prikazuje, da med različnimi načini skladiščenja sorte 'Reeves' ni statistično značilnih razlik.

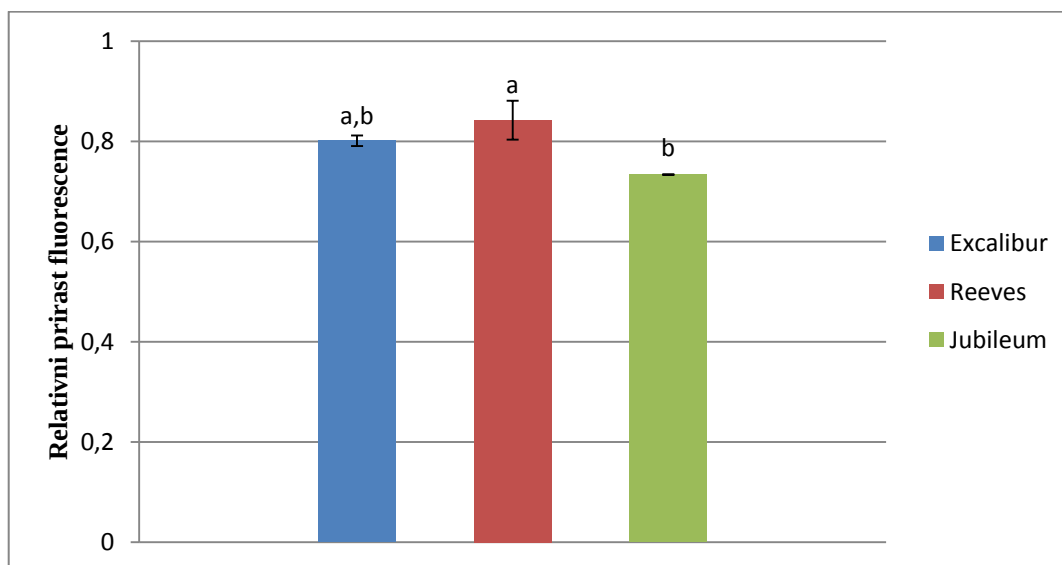
Grafi (Slika 10, 11, 12) prikazujejo vpliv sorte sliv na AOP pri posameznih pogojih skladiščenja. Črka a v indeksu (pri vseh skupinah) (Slika 10) prikazuje, da med sortami, skladiščenimi v NA, ni statistično značilnih razlik. Pri skladiščenju v MAP (Slika 11) razlike med sortami prav tako niso statistično značilne. Sorta 'Jubileum' ima pri skladiščenju v NA + HWT (Slika 12) boljši AOP (relativni prirast fluorescence: 0,81) kot sorta 'Reeves' (relativni prirast fluorescence: 0,84) in je enaka sorti 'Excalibur' (relativni prirast fluorescence: 0,73). Pri skladiščenju v MAP + HWT se sorta 'Reeves' od ostalih dveh sort razlikuje in ima najslabši AOP, medtem ko med sortama 'Excalibur' in 'Jubileum' ni statistično značilnih razlik (Slika 13).



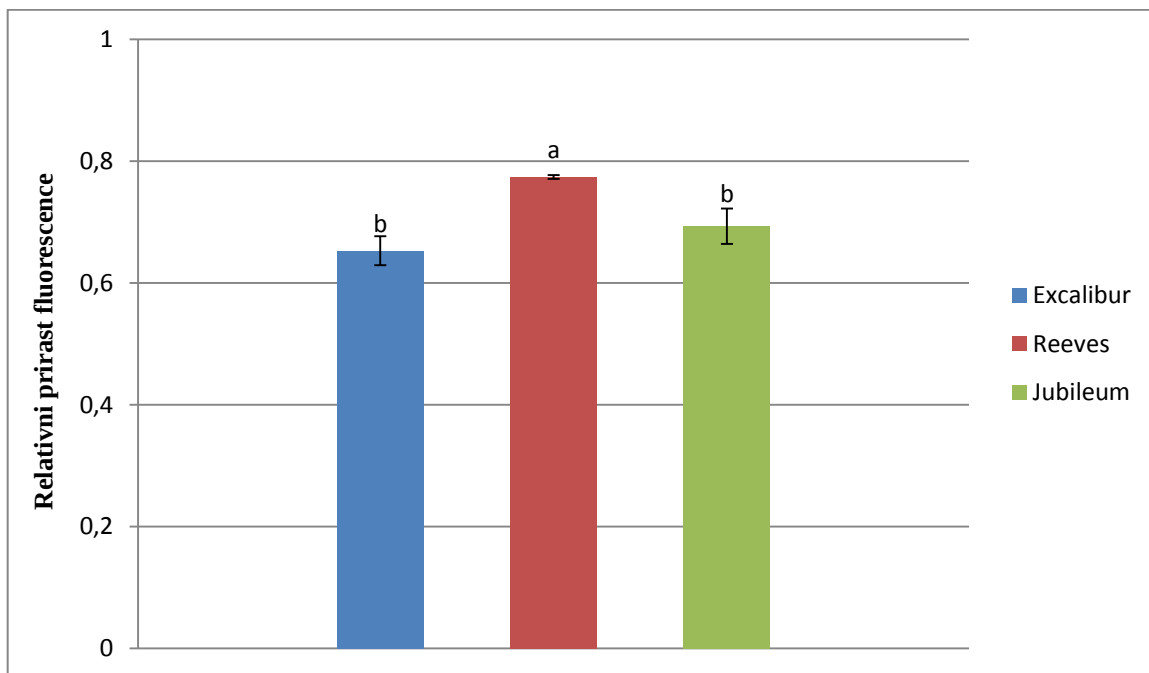
Slika 10: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', 'Reeves' in 'Jubileum', skladiščenih v NA. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Črka a v indeksu (pri vseh skupinah) prikazuje, da med sortami, skladiščenimi v NA, ni statistično značilnih razlik.



Slika 11: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', 'Reeves' in 'Jubileum', skladiščenih v MAP. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Črka a v indeksu (pri vseh skupinah) prikazuje, da med sortami, skladiščenimi v MAP, ni statistično značilnih razlik.



Slika 12: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', 'Reeves' in 'Jubileum', skladiščenih v NA + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Vrednosti, ki so označene z različno črko (a, b) v indeksu, se glede na sorto med seboj statistično značilno razlikujejo.



Slika 13: Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae*, tretirane z ekstraktom sliv sorte 'Excalibur', 'Reeves' in 'Jubileum', skladiščenih v MAP + HWT. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega prirasta fluorescence $\pm$ sd ($n = 2$). Vrednosti, ki so označene z različno črko (a, b) v indeksu, se glede na sorto med seboj statistično značilno razlikujejo.

Rezultati vpliva sorte na *in vivo* AOP ne glede na skladiščne pogoje in tretiranje po obiranju kažejo, da med sortami 'Excalibur', 'Jubileum' ter 'Reeves' ni statistično značilnih razlik (Preglednica 9).

Preglednica 9: Relativni prirast fluorescence pri slivah glede na sorto, ne glede na pogoje skladiščenja. Črka N predstavlja število vzorcev sliv.

Sorta	N	Povprečne vrednosti $\pm$ SD	Minimalno – Maksimalno
'Excalibur'	8	$0,80 \pm 0,11^A$	0,64 – 1,05
'Jubileum'	8	$0,79 \pm 0,10^A$	
'Reeves'	8	$0,86 \pm 0,12^A$	

Preglednica 10: Relativni prirast fluorescence pri slivah glede na pogoje skladiščenja, ne glede na sorto

Pogoji skladiščenja	Povprečne vrednosti $\pm$ SD
NA	$0,95 \pm 0,06^A$
MAP	$0,83 \pm 0,11^B$
NA + HWT	$0,79 \pm 0,05^{BC}$
MAP + HWT	$0,71 \pm 0,06^C$

Analiza *in vivo* antioksidativne učinkovitosti treh sort sliv ne glede na sorto kaže, da imajo najvišji AOP (najmanjši relativni prirast fluorescence) slive, ki so bile pred skladiščenjem obdelane z vročo vodo. Slive, skladiščene v MAP + HWT imajo najvišji AOP, ki je statistično enak slivam, skladiščenim v NA + HWT. Skladiščenje v NA se od ostalih treh pogojev skladiščenja statistično značilno razlikuje in daje najslabši AOP.

Preglednica 11: Korelacija (*r*) med *in vitro* ter *in vivo* AOP, skupnimi fenoli, flavonoidi in antocianini. Črka *n* označuje število vzorcev.

	<i>n</i>	<i>In vivo</i> AOP (relativni prirast fluorescence)	<i>p</i> vrednost
<i>n</i>		24	
<i>In vitro</i> AOP	36	-0,01	0,97
Skupni fenoli	36	-0,12	0,58
Flavonoidi	36	0,29	0,17
Antocianini	36	-0,03	0,89

Rezultate *in vitro* analize smo povzeli po magistrskem delu z naslovom Vpliv modificirane atmosfere na skladiščne sposobnosti sliv (*Prunus domestica*) avtorice Anje Mahne Opatić (2012). V raziskavi so bile zajete tri sorte sliv ('Excalibur', 'Jubileum', 'Reeves'), ki so bile skladiščene v pogojih NA, MAP, NAHW + HWT ter MAP + HWT. Določali so skupni antioksidativni potencial s pomočjo indirektne metode z DPPH• radikalom, vsebnost skupnih fenolov (metoda po Singletonu in Rossiju), flavonoidov (metoda po Lin in Tang) in antocianinov (pH diferencialna metoda) ter AOP v etil acetatu topne frakcije (Mahne Opatić, 2012).

Korelacije so zelo ohlapne in niso statistično značilne, saj so *p* vrednosti za vse primerjave večje od $\alpha = 0,05$ (Preglednica 11).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V magistrskem delu smo raziskovali vpliv skladiščenja na AOP treh sort sliv ('Excalibur', 'Jubileum', 'Reeves'). Le-te so bile skladiščene v pogojih NA, MAP, NA + HWT ter MAP + HWT. Primerjali smo tudi vpliv posamezne sorte na antioksidativni potencial. Ker smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv toplotne obdelave na AOP, je bila polovica sadežev celotnega vzorca vseh treh sort pred skladiščenjem obdelana z vročo vodo (2 minuti pri 52 °C). V ekstraktih treh sort sliv, vzgojenih po metodi konvencionalne pridelave, v katerih je bil AOP že določen *in vitro*, smo preverili antioksidativno delovanje *in vivo* ter primerjali rezultate analiz. Rezultate *in vitro* analize smo povzeli po magistrskem delu z naslovom Vpliv modificirane atmosfere na skladiščne sposobnosti sliv (*Prunus domestica*) avtorice Anje Mahne Opatić (2012). AOP *in vivo* smo določili z merjenjem znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovke *S. cerevisiae* po protokolu povzetem po Jakubowski in sod. (2000). Znotrajcelična oksidacija celic kvasovk se je znižala ob dodatku ekstraktov vseh vzorcev sliv, kar je posledica prisotnosti antioksidantov v le-teh.

Slive vsebujejo fenole, ki imajo antioksidativno delovanje, na njihovo vsebnost pa vplivajo številni faktorji, kot so sestava tal, zrelost plodov ter skladiščenje po obiranju (Cordova in Watson, 2011).

Analiza *in vivo* antioksidativne učinkovitosti treh sort sliv ne glede na sorto kaže, da imajo najvišji AOP (najmanjši relativni prirast fluorescence) slive, ki so bile pred skladiščenjem obdelane z vročo vodo. Slive, skladiščene v MAP + HWT imajo najvišji AOP, ki je statistično enak slivam, skladiščenim v NA + HWT. Statistično značilnih razlik v *in vivo* AOP sliv ni med plodovi skladiščenimi v MAP in plodovi obdelanimi s toplo vodo in skladiščenimi v navadni atmosferi.

Tretiranje z vročo vodo ter pogoji modificirane atmosfere vplivajo na zmanjšanje aktivnosti encima polifenol oksidaze, kar vodi do manjše oksidacije fenolov (Fallik, 2004; Guan in Dou, 2010). Pogoji MAP povzročijo upočasnjeno zorenje ter tako podaljšajo čas skladiščenja (Robertson, 2003). V nezrelem sadju je namreč vsebnost fenolnih spojin bistveno večja (izjema so antocianidini) kot v zrelem sadju (Štampar in sod., 2014). Po drugi strani lahko nižje vsebnosti O₂ in CO₂ povzročijo upočasnjeno sintezo encimov, ključnih za nastanek fenolnih spojin. Zhang in sod. (2003) so ugotovili, da se tekom skladiščenja vsebnost antocianinov v jagodah znižuje (ne glede na pogoje skladiščenja), vendar MAP (2,5 % O₂ + 16 % CO₂) povzroči manjšo izgubo tovrstnih komponent (Zhang in sod., 2003). Prav tako je zmanjšanje skupne vsebnosti karotenoidov in AOP v lipofilni frakciji pri vijolično obarvanih plodovih pri pogojih MAP upočasnjeno (Diaz-Mula in sod., 2011). Znižanje skupnih fenolov ter AOP (metoda z DPPH• radikalom) pri skladiščenju

manga je bilo v MAP (5 % O₂ + 5 % CO₂ + 90 % N₂) manjše kot v NA (Niranjana in sod., 2009). Brokoli skladiščen v MAP je imel manjše izgube askorbinske kisline, skupnih fenolov in antioksidativne aktivnosti kot brokoli skladiščen v normalni atmosferi (Serrano in sod., 2006). V študiji, ki so jo opravili Khorshidi in sod. (2011), je bil upad vsebnosti fenolov (mg taninske kisline/ 100 g sveže mase) tekom skladiščenja (0, 15, 30, 45, 60 dni) manjši v češnjah (*Prunus avium*) ter višnjah (*Prunus cerasus*), ki so bile skladiščene v MAP (10 % O₂ + 15 % CO₂ + 75 % N₂) za razliko od NA (Khorshidi in sod., 2011).

Modificirana atmosfera in toplotna obdelava predstavljata oksidativni stres, kar lahko inducira tvorbo novih antioksidantov (Racchi, 2013). Številne študije kažejo, da toplotna obdelava sadja po obiranju vpliva na povečanje vsebnosti proteinov toplotnega šoka (HSP), antioksidativnih encimov, karotenoidov in fenolnih spojin (Ummarat in sod., 2011). V študiji, ki so jo opravili Mirdehghan in sod., (2006), so ugotovili, da imajo semena granatnih jabolk, ki so bila pred skladiščenjem obdelana z vročo vodo (45 °C, 4 minute), višji AOP ter večjo vsebnost fenolnih spojin, antocianinov in askorbinske kisline za razliko od neobdelanih plodov (Mirdehghan in sod., 2006). Banane, ki so bile obdelane z vročo vodo (50 °C, 10 minut), so vsebovale večje koncentracije askorbinske kisline tekom skladiščenja v primerjavi s kontrolo (Ummarat in sod., 2011).

Skladiščenje sliv v NA se od ostalih treh pogojev skladiščenja statistično značilno razlikuje in daje najslabši AOP. Sklepamo lahko, da pogoji NA povzročijo hitrejšo oksidacijo fenolnih spojin. V raziskavi, ki so jo opravili Stewart in sod. (1999), so ugotovili, da imajo jagode, skladiščene v pogojih s povišano vrednostjo kisika (pri temperaturi 8 °C), dober AOP v prvih štirih dneh. Tekom skladiščenja antioksidativni potencial upade kot posledica oksidacije glavnih antioksidantov, ki vključujejo antocianine in ostale fenolne spojine (Stewart in sod., 1999). Harbaum-Piayda in sod. (2010), so ugotovili, da je prišlo do manjšega povečanja flavonoidov v listih pekinškega zelja (pak choi) tekom skladiščenja v normalni atmosferi v primerjavi z modificirano atmosfero. Tovrsten rezultat je lahko posledica manjše sinteze ali povečane degradacije fenolov (Harbaum-Piayda in sod. 2010). Rezultati raziskave, ki so jo opravili Khorsidi in sod. (2011), so pokazali, da je vsebnost antocianinov v češnjah tekom skladiščenja upadla, njihova vrednost pa je bila večja v češnjah skladiščenih v modificirani atmosferi (10 % O₂ + 15 % CO₂ + 75 % N₂) za razliko od NA. Temperatura skladiščenja je bila 0 °C (Khorshidi in sod., 2011).

Skladiščenje v MAP + HWT daje boljši *in vivo* AOP kot skladiščenje v MAP in skladiščenje v NA + HWT daje boljši *in vivo* AOP kot skladiščenje v NA.

Rezultati *in vitro* analize antioksidativne učinkovitosti treh sort sliv ne glede na sorto kažejo, da je najvišji AOP pri tretiranju v MAP, sledijo ostali trije pogoji (NA, MAP +

HWT ter NA + HWT) med katerimi ni statistično značilnih razlik. Razlike med MAP in ostalimi tretiranjmi so statistično značilne (Mahne Opatić, 2012).

Rezultati statistične analize vpliva sorte na *in vivo* AOP, ne glede na skladiščne pogoje in tretiranje po obiranju kažejo, da med sortami 'Excalibur', 'Jubileum' ter 'Reeves' ni statistično značilnih razlik.

V *in vitro* analizi so najvišji AOP in hkrati tudi najvišjo vsebnost skupnih fenolov, flavonoidov in antocianinov določili pri sorti 'Jubileum' (Mahne Opatić, 2012). Večjo koncentracijo fenolnih spojin imajo rdeče ter vijolično obarvani sadeži (Cordova in Watson, 2011). 'Jubileum' je švedska sorta sliv, za katero so značilni veliki, ovalni plodovi temno modre barve (Vangdal in sod., 2007).

Rezultati kažejo, da so korelacije med *in vitro* AOP ter *in vivo* AOP ohlapne in niso statistično značilne, saj so p vrednosti za vse primerjave večje od $\alpha = 0,05$ (Preglednica 11).

Razlike med AOP *in vitro* ter AOP *in vivo* so lahko posledica dveh različnih metod (indirektna metoda z DPPH• radikalom; merjenje znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovke *S. cerevisiae*), ki so bile uporabljene za določanje antioksidativnega potenciala. Razlike lahko pripišemo dejstvu, da pri *in vivo* tehniki določanja AOP reagirajo samo spojine, ki vstopijo v celice kvasovk.

V raziskavi, ki so jo opravili Michalache Arion in sod. (2014), so določali AOP v slivah z dvema *in vitro* metodama (indirektna metoda z DPPH• radikalom; ORAC metoda) ter eno *in vivo* metodo (oksidativna hemoliza eritrocitov). Povezanost med *in vitro* metodama je bila zelo visoka, saj je bila vrednost korelacijskega koeficienta enaka 0,9 ($\sqrt{R^2}$), kar nakazuje na to, da sta metodi primerljivi. Povezanost med *in vitro* metodama in hemolizo je bila manjša, vendar kljub temu visoka (Michalache Arion in sod., 2014).

Za določanje AOP z DPPH• radikalom je značilno, da le-ta ne reagira z nekaterimi flavonoidi, ki ne vsebujejo –OH skupine na obroču B ter aromatskimi kislinami, ki imajo samo eno –OH skupino (Roginsky in Lissi, 2005).

V študiji, ki so jo opravili Slatnar in sod., (2012), so raziskovali vpliv biokativnih komponent na *in vitro* ter *in vivo* AOP sokov jagodičevja (bezeg, črni ribez, gozdna borovnica, aronija, ameriška borovnica). *In vitro* AOP sokov so določili s pomočjo indirektna metode z DPPH• radikalom. Največji AOP je imel sok črnega ribeza kateremu so po vrsti sledili bezeg, aronija, ameriška borovnica ter gozdna borovnica. Med bezgom in aronijo ni bilo statistično značilnih razlik. Antioksidativno učinkovitost bioaktivnih komponent v celici je težko napovedati s pomočjo *in vitro* študij zaradi česar so AOP določali tudi *in vivo* (Slatnar in sod., 2012). AOP *in vivo* so določili z merjenjem

znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovke *S. cerevisiae*. Najvišji AOP je imela ameriška borovnica, sledili sta aronija ter gozdna borovnica. Najmanjši AOP je imel črni ribez. Med bezgom in kontrolo ni bilo statistično značilnih razlik. Ker je prišlo do vidnih razlik med *in vitro* ter *in vivo* rezultati, so za boljše razumevanje, katere bioaktivne komponente vplivajo na AOP v celici, določili vsebnost fenolnih spojin pred in po izpostavitvi celice kvasovke *S. cerevisiae* različnim sokovom. Ugotovili so, da večji privzem fenolnih spojin v celico ne povzroči večjega AOP *in vivo*. Poleg skupne vsebnosti fenolnih spojin, ki vstopijo v celico, je ključnega pomena za AOP tudi razmerje med njimi. V primeru, ko je v celico prešlo več antocianinov ter manj hidroksicimetnih kislin ter flavonolov, je bila znotrajcelična oksidacija manjša kot pri večjem vstopu hidroksicimetnih kislin in manjšem vstopu antocianinov. Pri tretiranju celice kvasovke *S. cerevisiae* s sokom ameriške borovnice je bil odstotek antocianinov, ki so prešli v celico 100 % (Slatnar in sod., 2012).

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov in statistične analize le-teh lahko sklepamo, da

- med sortami 'Excalibur', 'Jubileum' ter 'Reeves', ne glede na skladiščne pogoje, ni statistično značilnih razlik v vrednosti *in vivo* AOP,
- da skladiščenje sliv v MAP, povzroči višjo *in vivo* antioksidativno učinkovitost pri vseh treh sortah sliv, v primerjavi s skladiščenjem v NA,
- predhodna obdelava plodov sliv z vročo vodo pozitivno vpliva na *in vivo* AOP,
- skladiščenje v MAP + HWT daje boljši *in vivo* AOP kot skladiščenje v MAP in skladiščenje v NA + HWT daje boljši *in vivo* AOP kot skladiščenje v NA,
- najmanjši AOP so izkazovale vse tri sorte sliv skladiščene v navadni atmosferi,
- je povezanost med AOP izmerjenim *in vitro* ter AOP *in vivo* ohlapna.

6 POVZETEK

AOP sliv je močno povezan z vsebnostjo fenolov ne pa z vsebnostjo antocianinov, saj le-ti predstavljajo majhen del celotne vsebnosti fenolov v plodovih sliv (20 %) in malo vplivajo na splošno antioksidativno kapaciteto. Na vsebnost fenolnih spojin vplivajo številni faktorji, kot so sorta, sestava tal, zrelost plodov, načini obdelave sadje pred in po obiranju ter vrsta skladiščenja. UV-B sevanje in nizke temperature inducirajo akumulacijo v epidermalnih celicah. Večjo koncentracijo fenolov imajo rdeče in vijolično obarvani sadeži.

V magistrskem delu smo za analizo uporabili tri sorte sliv: 'Excalibur', 'Jubileum' in 'Reeves'. Obrane so bile v komercialni zrelosti na raziskovalni postaji Bioforsk Ullensvang v kraju Lofthus na Norveškem. Plodovi so bili skladiščeni v NA ali MAP, v temi in pri temperaturi 1 °C. Polovica sadežev celotnega vzorca je bila na dan obiranja tretirana z vročo vodo (52 °C, 2 minuti), nato pa skupaj z ostalo polovico skladiščena v NA ali v MAP. Naš namen je bil raziskati, kako skladiščenje, predhodna toplotna obdelava ter sorta vplivajo na AOP sliv. Primerjali smo tudi antioksidativni potencial ekstraktov sliv *in vitro* ter *in vivo*.

AOP *in vivo* smo določili z merjenjem znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovke *S. cerevisiae* po protokolu povzetem po Jakubowski in sod. (2000). Podatke *in vitro* analize smo povzeli po magistrskem delu z naslovom Vpliv modificirane atmosfere na skladiščne sposobnosti sliv (*Prunus domestica*) avtorice Anje Mahne Opatić (2012). Znotrajcelična oksidacija celic kvasovk se je znižala ob dodatku vseh vzorcev ekstraktov sliv, kar je posledica prisotnosti antioksidantov v le-teh.

Analiza *in vivo* antioksidativne učinkovitosti treh sort sliv ne glede na sorto kaže, da imajo najvišji AOP (najmanjši relativni prirast fluorescence) slive, ki so bile pred skladiščenjem obdelane z vročo vodo. Slive, skladiščene v MAP + HWT imajo najvišji AOP, ki je statistično enak slivam, skladiščenim v NA + HWT. Modificirana atmosfera in toplotna obdelava predstavljata oksidativni stres kar lahko inducira tvorbo novih antioksidantov. Prav tako pride do zmanjšanja aktivnosti encima polifenol oksidaze, kar vodi do manjše oksidacije fenolov. Tekom skladiščenja se vsebnost antocianinov znižuje (ne glede na pogoje skladiščenja), vendar MAP povzroči manjšo izgubo tovrstnih komponent. Številne študije kažejo, da toplotna obdelava sadja po obiranju vpliva na povečanje vsebnosti antioksidativnih encimov, karotenoidov in fenolnih spojin (Ummarat in sod., 2011).

Najmanjši AOP so izkazovale vse tri sorte sliv skladiščene v navadni atmosferi, saj lahko ta povzroči hitrejšo oksidacijo fenolnih spojin. Razlike med NA in ostalimi skladiščnimi pogoji so statistično značilne. Statistično značilnih razlik v *in vivo* AOP sliv ni med

plodovi skladiščenimi v MAP in plodovi obdelanimi s toplo vodo in skladiščenimi v navadni atmosferi.

Skladiščenje v MAP + HWT daje boljši *in vivo* AOP kot skladiščenje v MAP in skladiščenje v NA + HWT daje boljši *in vivo* AOP kot skladiščenje v NA.

Rezultati *in vitro* analize antioksidativne učinkovitosti treh sort sliv ne glede na sorto kažejo, da je najvišji AOP pri tretiranju v MAP, sledijo ostali trije pogoji (NA, MAP + HWT ter NA + HWT), med katerimi ni statistično značilnih razlik. Razlike med MAP in ostalimi tretiranjmi so statistično značilne.

Rezultati vpliva sorte na *in vivo* AOP, ne glede na skladiščne pogoje in tretiranje po obiranju kažejo, da med sortami 'Excalibur', 'Jubileum' ter 'Reeves' ni statistično značilnih razlik.

Rezultati kažejo, da so korelacije med *in vitro* AOP ter *in vivo* AOP ohlapne in niso statistično značilne, saj so p vrednosti za vse primerjave večje od $\alpha = 0,05$ (Preglednica 11).

Razlike med AOP *in vitro* ter AOP *in vivo* so lahko posledica dveh različnih metod (indirektna metoda z DPPH• radikalom; merjenje znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovke *S. cerevisiae*), ki so bile uporabljene za določanje antioksidativnega potenciala. Razlike lahko pripišemo dejstvu, da pri *in vivo* tehniki določanja AOP reagirajo samo spojine, ki vstopijo v celice kvasovk.

7 VIRI

- Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitost: Učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Alam M. N. Bristi N. J., Rafiquzzaman. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 21: 143–152
- Alexander L., Grierson D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. Journal of Experimental Botany, 53, 377: 2039–2055
- Arion C. M., Tabart J., Kevers C., Niculau M., Filimon R., Beceanu D., Dommes J. 2014. Antioxidant potential of different plum cultivars during storage. Food Chemistry, 146: 485–491
- Brus R. 2012. Drevesne vrste na Slovenskem. Ljubljana, samozaložba: 406 str.
- Bu S. Y., Lerner M., Stoecker B. J., Boldrin E., Brackett D. J., Lucas E. A., Smith B. J. 2008. Dried plum polyphenols inhibit osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 and Inflammatory Mediators. Calcified Tissue International, 82: 475–488
- Cadenas E., Davies K. J. A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radical Biology and Medicine, 29: 222–230
- Cordova F. M., Watson R. R. 2011. Prunes and plums in health promotion. V: Bioactive foods and extracts: Cancer treatment and prevention. Watson R. R., Preedy V. R. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 205–210
- Diaz-Mula H. M., Zapata P. J., Valverde J. M., Valero D., Serrano M. 2011. Modified atmosphere packaging of yellow and purple plum cultivars. 2. Effect on bioactive compounds and antioxidant activity. Postharvest Biology and Technology, 61: 110–116
- Fallik E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). Postharvest Biology and Technology, 32: 125–134
- Ferrazzano G. F., Amato I., Ingenito A., Zarrelli A., Pinto G., Pollio A. 2011. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: A review. Molecules, 16: 1486–1507

- Forman H. J., Davies K. J. A., Ursini F. 2014. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 66: 24–35
- Gallaher C. M., Gallaher D. D. 2009. Dried plums (prunes) reduce atherosclerosis lesion area in apolipoprotein E-deficient mice. *British Journal of Nutrition*, 101: 233–239
- Gordon M. H. 2003. Antioxidants. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press : 261–289
- Goulao L. F., Oliveira C. M. 2008. Review: Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 4–25
- Goulas V., Vicente A., Manganaris G. A. 2012. Structural diversity of anthocyanins in fruits. V: *Anthocyanins: Structure, biosynthesis and health benefits*. Motohashi N. (ed.). Hauppauge, Nova Science Publishers: 225–250
- Guan J., Dou S. 2010. The effect of MAP on quality and browning of cold-stored plum fruits. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8, 2: 113–116
- Hansmann C. F., Combrink J. C. 2003. Plums and related fruits. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 7. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 4606–4610
- Harbaum-Piayda B., Walter B., Bengtsson G. B., Hubbermann E. M., Bilger W., Schwarz K. 2010. Influence of pre-harvest UV-B irradiation and normal or controlled atmosphere storage on flavonoid and hydroxycinnamic acid contents of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*). *Postharvest Biology and Technology*, 56, 3: 202–208
- Harborne J. B. 1967. *Comparative biochemistry of the flavonoids*. Amsterdam, Academic Press: 383 str.
- Hoet P. H., Nemery B., Napierska D. 2013. Intracellular oxidative stress caused by nanoparticles: What do we measure with the dichlorofluorescein assay? *Nano Today*, 8: 223–227
- Hribar J. 2003. *Skladiščenje, zmrzovanje in priprava vrtnin za trg*. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 27 str.

- Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Sacharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29, 11: 1297–1301
- Jakubowski W., Bilinski T., Bartosz G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 5: 659–664
- Jazbec M., Vrabl S., Juvanc J., Babnik M., Koron D. 1995. Sadni vrt. Ljubljana, Kmečki glas: 375 str.
- Jie L., Wuliji O., Wei L., Zhi-Gang J., Hoseein A. G. 2013. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 24438–24475
- Kaulmann A., Jonville M. C., Schneider Y. J., Hoffmann L., Bohn T. 2014. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 155: 240–250
- Khorshidi S., Davarynejad G., Tehranifar A., Fallahi E. 2011. Effect of modified atmosphere packaging on chemical composition, antioxidant activity, anthocyanin, and total phenolic content of cherry fruits. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52, 5: 471–481
- Lombardi-Boccia G., Lucarini M., Lanzi S., Aguzzi A., Cappelloni M. 2004. Nutrients and antioxidant molecules in Yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1: 90–94
- Mahne Opatić A. 2012. Vpliv modificirane atmosfere na skladiščne sposobnosti sliv (*Prunus domestica*). Mag. delo-2 .st. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 69 str.
- Manganaris G. A., Vicente A. R., Crisosto C. H. 2008. Effect of pre-harvest and post-harvest conditions and treatments on plum fruit quality. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3: 009, doi: 10.1079/PAVSNNR20083009: 10 str.
- McArdle W. D., Katch F. I., Katch V. L. 2013. Sports and exercise nutrition. 4th ed. Philadelphia, Wolters Kluwer, Lippincott Williams and Wilkins: 681 str.

- Mehdi M. M., Rizvi S. I. 2013. N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride-based method for the measurement of plasma oxidative capacity during human aging. *Analytical Biochemistry*, 436: 165–167
- Mihalache Arion C., Tabart J., Kevers C., Niculau M. c, Filimon R., Beceanu D., Dommes J. 2014. Antioxidant potential of different plum cultivars during storage. *Food Chemistry*, 146: 485–491
- Miguel M. G. 2011. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1, 6: 7–15
- Mirdehghan S. H., Rahemi M., Serrano M., Guillen F., Martinez-Romero D., Valero D. 2006. Prestorage heat treatment to maintain nutritive and functional properties during postharvest cold storage of pomegranate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 22: 8495–8500
- Murkovic N. 2003. Phenolic compounds. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 7. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 4507 – 4514
- Niranjana P., Gopalakrishna R. K. P. Sudhakar R. D. V., Madhusudhan B. 2009. Effect of controlled atmosphere storage (CAS) on antioxidant enzymes and DPPH- radical scavenging activity of mango (*Mangifera indica* L.) cv. Alphonso. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 9: 779–792
- Okie W. R., Hancock J. F. 2008. Plums. V: *Temperate fruit crop breeding*. Hancock J. F. (ed.). Houten, Springer: 337–358
- Osredkar J. 2012. Oksidativni stres. *Zdravniški vestnik*, 81: 393–406
- Papas A. M. 1999. Determination of antioxidative status in humans. V: *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. Papas A. M. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 21–36
- Plumbe & Maufe LPP. 2013. Plums and other fruit. Norfolk Coast, Plumbe & Maufe LLP: 6 str.
<http://www.pmfarming.co.uk/plums/> (november, 2014)
- Puerta-Gomez A. F., Cisneros-Zevallos L. 2011. Postharvest studies beyond fresh market eating quality: Phytochemical antioxidant changes in peach and plum fruit during ripening and advanced senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 60: 220–224

- Racchi M. L. 2013. Antioxidant defenses in plants with attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants*, 2: 340–369
- Rama M. V., Narasimham P. 2003. Controlled-atmosphere storage: Effects on fruit and vegetables. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 3. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1607–1615
- Robertson T. R. 2003. Use of modified-atmosphere packaging. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1186–1190
- Roginsky V., Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235–254
- Serrano M., Martinez-Romero D., Guillen F., Castillo S., Valero D. 2006. Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 1: 61–68
- Shebis Y., Iluz D., Kinel-Tahan Y., Dubinsky Z., Yehoshua Y. 2013. Natural antioxidants: function and sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4: 643–649
- Slatnar A., Jakopič J., Štampar F., Veberič R., Jamnik P. 2012. The effect of bioactive compounds on *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of different berry juices. *PLoS ONE*, 7, 10: e47880, doi: 10.1371/journal.pone.0047880: 8 str.
- Slimestad H., Vangdal E., Brede C. 2009. Analysis of phenolic compounds in six Norwegian plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 11370–11375
- Smith A. G., Day B. P. F. 2003. Effect of modified-atmosphere packaging on food quality. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1157–1163
- Stewart D., Oparka J., Johnstone C., Iannetta P. P. M., Davies H. V. 1999. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on soft fruit quality. Annual report 1998/1999. Dundee, James Hutton Institute: 119–124
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. V: *Plant biochemistry*. Dey P. M., Harborne J. B. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 387–416
- Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2014. *Sadjarstvo*. 3. dopolnjena izd. Ljubljana, Kmečki glas: 415 str.

- Tan S. C., Considine M. 2006. Storage conditions for fresh fruit and vegetables. *Farmnote*, 145: 4 str.
- Topp B. L., Russell D. M., Neumüller M., Dalbó M. A., Liu W. 2012. Plum. V: *Handbook of plant breeding: Fruit breeding*. Vol. 8. Badens M. L., Byrne D. H. (eds.). New York, Springer: 571–621
- Ummarat N., Matsumoto T. K., Wall M. M., Seraypheap K. 2011. Changes in antioxidants and fruit quality in hot water-treated 'Hom Thong' banana fruit during storage. *Scientia Horticulturae*, 130, 4: 801–807
- USDA. 2015. USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28: Plums, raw. Washington, United States Department of Agriculture: 2 str.
<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2353?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=plum> (maj, 2015)
- Usenik V., Kastelec D., Veberič R., Štampar F. 2008. Quality changes during ripening of plums (*Prunus domestica* L.). *Food Chemistry*, 111: 830–836
- Usenik V., Štampar F., Veberič R. 2009. Anthocyanins and fruit colour in plums (*Prunus domestica* L.) during ripening. *Food Chemistry*, 114: 529–534
- Vangdal E., Flatland S., Nordbø R. 2007. Fruit quality changes during marketing of new plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *Horticultural Science (Prague)*, 34, 3: 91–95
- Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101–114
- Zakrajšek T., Raspor P., Jamnik P. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism — characterization at cellular and proteome level. *Journal of Proteomics*, 74: 2837–2845
- Zhang M., Xiao G., Peng J., Salokhe V. M. 2003. Effects of modified atmosphere package on preservation of strawberries. *International Agrophysics*, 17: 143–148
- Wang H., Joseph J. A. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 5/6: 612–616

Winterbourn C. C. 2014. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840: 730–738

ZAHVALA

Vse naše sanje se lahko uresničijo – Če le imamo pogum, da gremo z njimi. (W. Disney)

Za strokovno pomoč pri izdelavi magistrskega dela, za prijaznost, spodbudo in dostopnost, se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Rajku Vidrihu in somentorici izr. prof. dr. Poloni Jamnik.

Zahvalila bi se tudi dr. Tanji Petelinc, za trud in potrpežljivost ter pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Za temeljit in strokoven pregled magistrske naloge se zahvaljujem recezentu izr. prof. dr. Blažu Cigiću.

Za pomoč pri urejanju literature se zahvaljujem Lini Burkan Makivić, univ. dipl. inž.

Posebna zahvala gre moji družini, ki me je spodbujala in podpirala vsa leta študija.

Na koncu je zahvala namenjena vsem, katere nisem poimensko omenila, ki pa sami zelo dobro vedo, da so prispevali pomemben delček v mozaik mojega magistrskega dela, mi stali ob stran in verjeli vame.

*"Ko hodiš,
pojdi zmeraj do konca.
Spomladi do rožne cvetice,
poleti do zrele pšenice,
jeseni do polne police,
pozimi do snežne kraljice,
v knjigi do zadnje vrstice,
v življenju do prave resnice,
v sebi do rdečice čez eno in drugo lice.
A če ne prideš ne prvič, ne drugi
do krova in pravega kova
poskusi: vnovič in zopet in znova." (Tone Pavček)*

PRILOGE

Priloga A: Povprečni prirast fluorescence (PF) in relativni prirast fluorescence (RPF) vzorcev sliv različnih sort, skladiščenih v NA

	Kontrola		NA	
	PF	RPF	PF	RPF
'Excalibur'	9,703	1	9,253	0,954
'Jubileum'	13,108	1	12,042	0,919
'Reeves'	14,417	1	14,005	0,971

$$\text{PF} : \frac{F_{120} - F_0}{F_0}$$

$$\text{RPF} : \left(\frac{PF_{\text{vzorec}}}{PF_{\text{kontrola}}} \right)$$

Priloga B: Povprečni prirast fluorescence (PF) in relativni prirast fluorescence (RPF) vzorcev sliv različnih sort, skladiščenih v MAP

	Kontrola		MAP	
	PF	RPF	PF	RPF
'Excalibur'	17,852	1	13,868	0,777
'Jubileum'	16,310	1	13,652	0,837
'Reeves'	14,417	1	12,710	0,881

Priloga C: Povprečni prirast fluorescence (PF) in relativni prirast fluorescence (RPF) vzorcev sliv različnih sort, skladiščenih v NA + HWT

	Kontrola		NA + HWT	
	PF	RPF	PF	RPF
'Excalibur'	17,852	1	14,308	0,802
'Jubileum'	13,110	1	9,514	0,726
'Reeves'	11,509	1	9,759	0,848

Priloga D: Povprečni prirast fluorescence (PF) in relativni prirast fluorescence (RPF) vzorcev sliv različnih sort, skladiščenih v MAP + HWT

	Kontrola		MAP + HWT	
	PF	RPF	PF	RPF
'Excalibur'	14,042	1	9,117	0,650
'Jubileum'	9,270	1	6,020	0,691
'Reeves'	11,509	1	8,903	0,774

Priloga E: Relativni prirast fluorescence pri slivah glede na sorto in pogoje skladiščenja

Sorta	Skladiščenje	Relativni prirast fluorescence (Povprečne vrednosti $\pm$ SD)
'Excalibur'	NA	$0,95 \pm 0,01^{Aa}$
	MAP	$0,78 \pm 0,02^{Ba}$
	NA + HWT	$0,80 \pm 0,01^{Bab}$
	MAP + HWT	$0,65 \pm 0,02^{Cb}$
'Jubileum'	NA	$0,92 \pm 0,02^{Aa}$
	MAP	$0,84 \pm 0,05^{Aa}$
	NA + HWT	$0,73 \pm 0,00^{Bb}$
	MAP + HWT	$0,69 \pm 0,03^{Bb}$
'Reeves'	NA	$0,97 \pm 0,11^{Aa}$
	MAP	$0,87 \pm 0,23^{Aa}$
	NA + HWT	$0,84 \pm 0,04^{Aa}$
	MAP + HWT	$0,77 \pm 0,00^{Aa}$

A,B,C-skupine z različno črko v indeksu se glede na način skladiščenja med seboj statistično značilno razlikujejo; a,b,c-skupine z različno črko v indeksu se glede na sorto med seboj statistično značilno razlikujejo