

ZELENA EKSTRAKCIJA ČEBULNIH LISTOV ZA PODALJŠEVANJE OBSTOJNOSTI OLJČNEGA OLJA

Raziskovalna naloga
Raziskovalno področje: Agrokultura

Avtor: Aleš Poljanšek, dijak 3. letnika

Mentorica: dr. Mihaela Skrt, asistentka za področje biokemije

Somentorja: dr. Ilja Gasan Osojnik Črnivec, docent za področje živilske kemije
mag. Nika Cebin, prof. kem.

Ljubljana, 2020

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorjema, dr. Mihaeli Skrt in dr. Ilji Gasanu Osojniku Črnicu za njuno podporo pri izvajanju eksperimentalnega dela na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Postopke sta mi natančno razložila, pomagala pri izvajanju poskusov in mi svetovala pri pisanju raziskovalne naloge. Z njuno pomočjo mi je bila olajšana pot do raziskovalnega dela.

Iskreno bi se rad zahvalil tudi mag. Niki Cebin, prof. kemije, ki mi je vzbudila zanimanje za raziskovalno delo in mi pomagala pri pisanju raziskovalne naloge.

Za lektorske popravke se zahvaljujem profesorici slovenščine, Nini Levstik.

Zahvalil bi se rad tudi svoji družini, ki mi je vseskozi stala ob strani in me podpirala.

KAZALO

ZAHVALA	2
KAZALO	3
KAZALO SLIK.....	5
KAZALO PREGLEDNIC.....	6
POVZETEK	7
ABSTRACT	7
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	8
1. UVOD S TEORETIČNIM DELOM.....	9
1.1 ČEBULA.....	9
1.2 SESTAVA ČEBULE.....	11
1.2.1 KVERCETIN.....	11
1.3 EKSTRAKCIJA.....	12
1.3.1 KONVENCIONALNE EKSTRAKCIJE	13
1.3.2 ZELENE EKSTRAKCIJE.....	14
1.4 PONOVNA UPORABA ČEBULNIH ODPADKOV	16
1.5 RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI	16
1.5.1 RADIKALI	16
1.5.1.1 OKSIDACIJA LIPIDOV	17
1.5.2 ANTIOKSIDANTI.....	17
1.6 OLJKA	18
1.6.1 ZGRADBA OLJKE.....	19
1.6.3 OLJKA V NAŠIH KRAJIH.....	19
1.7 PRIDOBIVANJE OLJČNEGA OLJA	20
1.7.1 SPRAVILO PRIDELKA	20
1.7.2 PREDELAVA OLJČNIH PLODOV.....	21
1.8 SESTAVA OLJČNEGA OLJA.....	22
1.8.1 TRIACILGLICEROLI	22
1.8.2 MINORNE KOMPONENTE GLICEROLNEGA IZVORA	22
1.8.3 NEGLICEROLNE SNOVI.....	23
1.9 OBSTOJNOST OLJČNEGA OLJA	23
1.10 MERITVE KAKOVOSTI OLJČNEGA OLJA	24
1.10.1 RAZVRSTITEV OLJČNIH OLJ	24
1.10.2 METODE OCENJEVANJA KAKOVOSTI IN PRISTNOSTI OLJČNIH OLJ ...	25
1.10.2.1 KEMIJSKE DOLOČITVE OLJČNIH OLJ	25

1.10.2.2 SENZORIČNO OCENJEVANJE	26
1.11 VPLIVI OLJČNEGA OLJA NA ZDRAVJE	27
2 HIPOTEZE	28
3 POSTOPKI PRI RAZISKOVALNI NALOGI	29
3.1 PRIPRAVA MATERIALA	29
3.2 EKSTRAKCIJA.....	29
3.3 DDPH METODA.....	32
3.3.1 REAGENTI IN TOPILA	32
3.3.2 POSTOPEK DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI ČEBULNIH EKSTRAKTOV	32
3.4 FOLIN-CIOCALTEUJEVA METODA	33
3.4.1 PRIPOMOČKI	34
3.4.2 REAGENTI IN TOPILA	34
3.4.3 POSTOPEK DOLOČANJA SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN S FOLI- CIOCALTEUJEVO METODO	35
3.4.3.1 UMERITVENA KRIVULJA	35
3.4.1.2 FOLIN CIOCALTEUJEVA METODA	35
3.5 RANCIMAT TEST	37
3.5.1 POGOJI DELOVANJA RANCIMATA	37
3.5.2 POSTOPEK	37
3.5.3 SESTAVA IN DELOVANJE RANCIMATA.....	37
4 REZULTATI	39
4.1 UČINKOVITOST EKSTRAKCIJE.....	39
4.2 DDPH METODA.....	40
4.3 FOLIN CIOCLATEUJEVA METODA.....	43
4.4 RANCIMAT METODA	45
5 RAZPRAVA.....	55
6 ZAKLJUČEK	57
7 VIRI.....	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Rumena čebula (zelenjava-pikapolonica.si, 2014)	10
Slika 2: Rdeča čebula (Zeleni svet, 2016).....	10
Slika 3: Strukturna formula kvercetina (https://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin , 2020)	11
Slika 4: Oljka (Delo, 2009)	18
Slika 5: Oljčno olje (Delo, 2019).....	22
Slika 6: Čebulni listi pred (posodica spodaj) in po mletju (posodica zgoraj) s krogličnim mlinom	29
Slika 7: Ekstrakcija v ultrazvočni kopeli (Shesto, SHE-UT8031-EUK)	30
Slika 8: Ekstrakcija s stresanjem na stresalniku (Kambič, WB-30 STE)	30
Slika 9: Liofilizator (Christ Alpha 1-2 LDplus)	31
Slika 10: Strukturna formula radikala DDPH·	32
Slika 11: Spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453).....	36
Slika 12: Rancimat (Metrohm, 743 Rancimat).....	38
Slika 13: Nastanek maščobnih kislin v merilni celici (Loyall)	38
Slika 14: Reakcijska celica in merilna celica (Loyall).....	38
Slika 15: Spremembe barve radikala DDPH· pri različnih razredčitvah ekstrakta	40
Slika 16: Antioksidativna učinkovitost vodnega čebulnega ekstrakta, pridobljenega s stresanjem.....	41
Slika 17: Antioksidativna učinkovitost vodnega čebulnega ekstrakta, pridobljenega z ultrazvokom.....	41
Slika 18: Antioksidativna učinkovitost etanolnega ekstrakta čebulnih listov, pridobljenega s stresanjem.....	42
Slika 19: Antioksidativna učinkovitost etanolnega ekstrakta čebulnih listov, pridobljenega z ultrazvokom.....	42
Slika 20: Umeritvena krivulja v vodnih raztopinah.....	44
Slika 21: Umeritvena krivulja v etanolnih raztopinah	44
Slika 22: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 1	46
Slika 23: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 2	46
Slika 24: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 3.....	46
Slika 25: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 4.....	46
Slika 26: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 5	47
Slika 27: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 6.....	47
Slika 28: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim s stresanjem iz čebulnih listov – A	47
Slika 29: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim s stresanjem iz čebulnih listov – B.....	48
Slika 30: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno ekstrakcijo iz čebulnih listov – A.....	48
Slika 31: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno ekstrakcijo iz čebulnih listov – B.....	48
Slika 32: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim etanolnim ekstraktom, pridobljenim s stresanjem iz čebulnih listov – A	49
Slika 33: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim s stresanjem iz čebulnih listov – B.....	49
Slika 34: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim etanolnim ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno ekstrakcijo iz čebulnih listov – A.....	49

Slika 35: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim etanolnim ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno ekstrakcijo iz čebulnih listov – B.....	50
Slika 36: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanimi prahom iz suhih čebulnih listov s količino skupnih fenolnih spojin 2,5 mg/ mL olja – A	50
Slika 37: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanimi prahom iz suhih čebulnih listov s količino skupnih fenolnih spojin 2,5 mg/ mL olja – B	50
Slika 38: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanimi prahom iz suhih čebulnih listov s količino skupnih fenolnih spojin 4,3 mg/ mL olja – A	51
Slika 39: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanimi prahom iz suhih čebulnih listov s količino skupnih fenolnih spojin 4,3 mg/ mL olja – B	51
Slika 40: Čebulni listi 400 x povečava	53
Slika 41: Čebulni prah 400 x povečava	53
Slika 42: Oljčno olje s čebulnimi listi.....	53
Slika 43: Oljčno olje s čebulnim ekstraktom.....	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Merila pristnosti oljčnih olj	25
Preglednica 2: Količina pridobljenega (volumen mokrega in masa suhega liofiliziranega) čebulnega ekstrakta ter učinkovitost ekstrakcije glede na vhodno maso suhih luskolistov. .	39
Preglednica 3: EC50	43
Preglednica 4: Masa galne kisline na maso ekstrakta.....	45
Preglednica 5: Oksidativna stabilnost oljčnega olja in oljčnega olja s čebulnimi ekstrakti in čebulnimi listi	52

POVZETEK

Suhi luskolisti čebule, ki jih pri procesiranju zelenjave in pripravljanju hrane obravnavamo kot odpadek, vsebujejo velike količine prostega kvercetina. Kvercetin upočasnjuje oksidacijo, deluje antioksidativno in bi se zato lahko uporabljal kot sredstvo za podaljševanje obstojnosti živil. Iz celic čebule pridobimo kvercetin z ekstrakcijo. Obstaja več ekstrakcijskih metod in pri našem raziskovalnem projektu smo se osredotočili na ekstrakcijo kvercetina z ultrazvočno kopeljo, ki sodi med zelene načine ekstrakcije. Le-to smo primerjali z ekstrakcijo kvercetina s stresanjem. Preizkušali smo tudi vpliv topila (etanola in vode) na učinkovitost ekstrakcije kvercetina kot poglavitne komponente antioksidativnih spojin v ekstraktu in preverili, kako alkoholni oziroma vodni ekstrakti vplivajo na oksidativno stabilnost oljčnega olja.

KLJUČNE BESEDE: antioksidanti, kvercetin, zelena ekstrakcija, konvencionalna ekstrakcija, antioksidativna učinkovitost, oljčno olje

ABSTRACT

The dry outer layer of onion, which is often considered as waste in vegetable processing and while cooking food, contains large amounts of free quercetin. Quercetin is an antioxidant, i.e. a substance which can slow down oxidation, therefore it can be used as a preservative. To acquire quercetin it must be extracted out of the plant cell. There are more ways to extract it and in our study we used an ultrasound-assisted green extraction technique and compared it with extraction in a shaker. We tested the influence of different solvents on extraction where quercetin was assumed to be the principal antioxidant. The prepared extracts were also examined for their effect on the oxidative stability of olive oil.

KEYWORDS: antioxidants, quercetin, green extraction, conventional extraction, antioxidant effectiveness, olive oil

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MK maščobna kislina

K absorbanca svetlobe pri določeni valovni dolžini

SFE superkritična ekstrakcija tekočin

PLE ekstrakcija s tekočino pod tlakom

UAE ekstrakcija z ultrazvokom

MAE ekstrakcija z mikrovalovnim sevanjem

PEF ekstrakcija z impulzivnim električnim poljem

HVED ekstrakcija z visokonapetostno električno razelektritvijo

HHF ekstrakcija pod visokim hidrostatičnim tlakom

R· alkilni radikal

O₂⁻ superoksidni anionski radikal

ROO· alkoksilni radikal

TO· tokoferolni radikal

GS· glutatilni radikal

H₂O₂ vodikov peroksid

Asc· askorbatni radikal

LH maščoba

LOO· deprotonizirana maščobna kislina

LO· deprotoniziran alkohol

L· molekula maščobe

LO aldehyd

LOH alkohol

·OH hidroksilni radikal

LOOH maščobna kislina

An antioksidant

An· radikal antioksidanta

DPPH· 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil

1. UVOD S TEORETIČNIM DELOM

1.1 ČEBULA

Čebula (*Allium cepa* L. var. *cepa*) iz rodu *Allium* sodi glede na različno klasifikacijo posamezne literature v družino lilijevk (*Liliaceae*) (Osvald in Kogoj-Osvald, 1994; Jakše, 2002) ali pa v družino lukovk (*Alliaceae*) (Jakše, 2002). Je ena izmed najstarejših vrtnin. V Sredozemlje se je razširila iz srednje in zahodne Azije. Slike in zapise o čebuli lahko najdemo v egipčanskih piramidah, pri antičnih umetnikih in v kitajskih spisih. Poleg kulinarične uporabe je bila čebula že v preteklosti cenjena kot zdravilna rastlina (Pušenjak, 2007).

Čebula je dvoletna, pogojno triletna rastlina in sodi med enokaličnice (Jakše, 2002). Poznamo tri načine gojenja čebule. Prvi način je sajenje čebulčka. V prvem letu se iz semen vzgoji čebulčke oziroma majhne čebulice, ki se jih posuši in naslednje leto zgodaj spomladi posadi (Pušenjak, 2007). Pri drugem načinu zelo zgodaj spomladi neposredno na stalno mesto posejemo semena, ki so črne barve in nekoliko izdolžene (Pušenjak, 2007) ali trikotne oblike (Jakše, 2002). Pri tretjem načinu iz semen vzgojimo sadike, ki jih nato posadimo na stalno mesto (Pušenjak, 2007). Čebulo izkopljemo iz zemlje, ko doseže tehnološko zrelost. Suho čebulo je potrebno ustrezno skladiščiti. Če jo skladiščimo v vlažnem, pretoplem in slabo zračnem prostoru, lahko pomrzne, začne poganjati ali plesneti (Osvald in Kogoj-Osvald, 1994). Sorte čebule lahko delimo v sorte kratkega dne in sorte dolgega dne. Poznamo dve domači selekciji, in sicer *belokranjka* in *ptujska rdeča* (Jakše, 2002).

Spodnji del rastline predstavlja skrajšano steblo oziroma čebulni krožec, iz katerega po propadu glavne korenine poženejo nadomestne ali adventivne korenine. Iz čebulnega krožca proti površju rastejo omeseneli luskolisti. Te obdaja prozorna ali rahlo obarvana povrhnjica, celotna čebulica pa je obdana s suhimi luskolisti, ki proti vrhu iz čebulnega vratu preidejo v zelene cevaste prave liste. Luskolisti so lahko vse od bele, rumene, rdečkaste do vijolično rdeče barve (Jakše, 2002).



Slika 1: Rumena čebula (zelenjava-pikapolonica.si, 2014)



Slika 2: Rdeča čebula (Zeleni svet, 2016)

Rumena čebula (Slika1) in rdeča čebula (Slika 2) sta najbolj uporabljeni čebuli v Sloveniji.

1.2 SESTAVA ČEBULE

Čebula vsebuje približno 89 % vode, 1,5 % proteinov, 9 % ogljikovih hidratov, ki jih pretežno zastopata glukoza in saharoza, 0,1 % maščob in 0,6 % drugih snovi, med katere sodijo aldehidi in ketoni, žveplove spojine, ki vplivajo na aromo čebule, encimi, vitamini, minerali in fenolne spojine (Hui, 1992).

V čebuli so prisotni vitamini B kompleksa, ki jim sledijo vitamini C, E, K in minerali: kalij, kalcij in fosfor (Žitnik, 2007).

Čebuli daje značilen vonj in aromo eterično olje alildisulfid. Poleg alildisulfida izmed žveplovih spojin na značilnosti čebule vplivajo dipropildisulfid, metilpropiltrisulfid, metilpropildisulfid, alilpropildisulfid, dimetildisulfid, dipropildisulfid in metil-*cis*-propenildisulfid. Druge žveplove spojine v čebuli so še tiosulfonska in tiocinska kislina ter tiopropionaldehid, ki povzročata solzenje, ko režemo čebulo (Hui, 1992).

Med fenolnimi spojinami, ki se nahajajo v čebuli, so najpogostejši flavonoidi, med katerimi je najpogostejši kvercetin s svojimi derivati, ki deluje kot antioksidant (Galdón in sod., 2008).

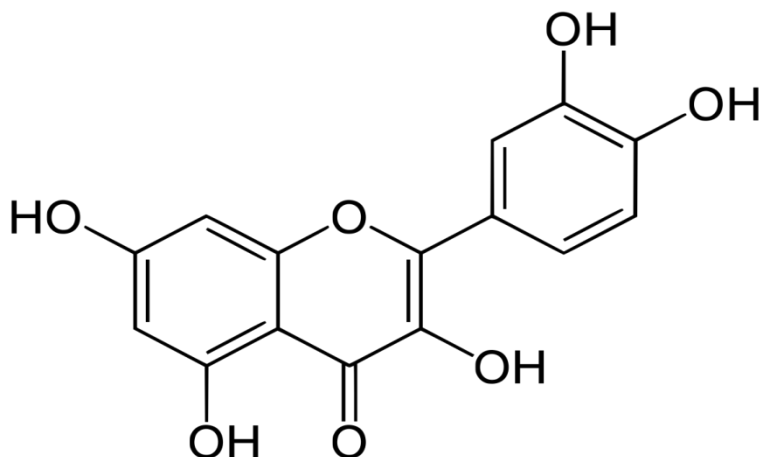
1.2.1 KVERCETIN

Molekulska formula: $C_{15}H_{10}O_7$

IUPAC ime: 2- (3,4-dihidroksifenil) -3,5,7-trihidroksi-4H-kromen-4-on

Molska masa: 302.236 g/mol

Temperatura tališča spojine: 316 °C



Slika 3: Strukturna formula kvercetina (<https://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>, 2020)

Kvercetin ($C_{15}H_{10}O_7$) je aglikon, ki spada v skupino flavonoidov, natančneje flavonolov (Li in sod., 2016). Osnoven skelet molekule je 3-hidroksiflavon (D'Andrea, 2015), ki ima na pozicijah 3, 3', 4', 5, 7 vezano -OH skupino. Ko se na molekulo kvercetina veže sladkor (glukoza, ramnoza, rutinoza), ga imenujemo glikozid

kvercetin. Prosti kvercetin je precej slabo topen v vodi in bolje topen v alkoholih. Topnost v vodi izboljša vezava sladkorja na molekulo kvercetina (Li in sod., 2016). Kvercetin je antioksidant in na podlagi oksidativnih lastnosti zmanjša možnost za nastanek kroničnih bolezni povezanih z oksidativnim stresom. Poleg tega se kvercetinu pripisujejo tudi druge zdravju ugodne lastnosti, kot so protirakotvorno, protivnetno, protialergijsko, protivirusno in protibakterijsko delovanje (D'Andrea, 2015).

Vrednost prostega kvercetina (Patil in Pike, 1995; Lee in Mitchell, 2011; Beesk in sod., 2010) se povečuje od notranjih proti zunanjim slojem čebule, pri čemer ga je največ v suhih luskolistih, ker tam poteka encimska hidroliza glukozidov kvercetina v prosti kvercetin (Beesk in sod., 2010). V jedilnem delu čebule je največ glukozidnih derivatov kvercetina, med katerimi sta najpogostejša kvercetin-3,4'-O-diglukozid in kvercetin-4'-O-monoglukozid (Lee in sod., 2008; Lee in Mitchell, 2011). Največ flavonoidov je v živih celicah prehodnega sloja, ker se v mrtvih celicah flavonoidi ne morejo več sintetizirati, v notranjosti pa se počasneje sintetizirajo zaradi pomanjkanja svetlobe (Justino, 2017).

Med vrstami čebul je s prostim kvercetinom najbogatejša šalotka (Cheng in sod. 2013), ki ji po vrsti sledijo rdeča čebula (19.93 mg/100 g kvercetina v listih), rumena čebula (13.27 mg/100 g v listih) (S. Dmitrienko, V. Kudrinskaya, V. Apyari, 2012) in bela čebula (Cheng in sod. 2013).

Kvercetin se poleg v čebuli nahaja tudi v drugih živilih rastlinskega izvora, kot so na primer kapre, brokoli, jabolka in paradižnik (D'Andrea, 2015).

1.3 EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je kemijska metoda, ki omogoča prenos molekul želene snovi iz trdne zmesi ali raztopine v drugo tekočo fazo s pomočjo topila. Ekstrakcija iz trdnih snovi (ekstrakcija trdno-tekoče) temelji na različni topnosti posameznih spojin v ekstrakcijskem topilu.

Ekstrakcija je osnovana na različni porazdelitvi snovi med ekstrakcijskimi topili in torej temelji na različni topnosti snovi v dvo- ali več faznih sistemih. Topnost snovi v topilu je odvisna od njene sposobnosti tvorjenja vezi s topilom, pri čemer ima velik vpliv polarnost oz. nepolarnost topljenca in topila. Pri makromolekulah na topnost vplivajo še razmerje med polarnimi in manj polarnimi skupinami, njihov medsebojni položaj, geometrija molekule in prisotnost drugih snovi (<https://sl.wikipedia.org/wiki/Ekstrakcija>).

Ekstrakcije snovi so neredko neekonomične, saj zahtevajo veliko časa in energije, hkrati pa so tudi okolju nevarne. Topila, ki jih uporabljamo pri konvencionalnih metodah, so namreč pogosto toksična. To je pripomoglo k razvoju tako imenovanih postopkov zelene ekstrakcije, pri katerih se toksična topila ne uporabljajo. Cilji zelene ekstrakcije so poleg učinkovitejše porabe energije in skrajšanja časa

ekstrakcije tudi povečanje mase končnega produkta, izboljšanje prenosa toplote, manjša velikost opreme, ki je potrebna za ekstrakcijo in varovanje okolja.

Principi zelene kemije, ki so glavni del postopkov zelene ekstrakcije, vključujejo realne analize za preprečevanja onesnaževanja in nastajanja nevarnih odpadkov. Temeljijo na varni zasnovi in sintezi produkta, uporabi netoksičnih topil in surovega materiala iz obnovljivih virov ter izboljšani energetski učinkovitosti (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

1.3.1 KONVENCIONALNE EKSTRAKCIJE

Konvencionalne vrste ekstrakcije so Soxhletova metoda, maceracija in parna destilacija (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Soxhletova metoda vključuje majhno količino suhega vzorca, preko katerega pretakamo/izparevamo topilo. Ta proces večkrat ponovimo, dokler ekstrakcija ni končana. Ta proces je optimiziran in v veliko primerih se je izkazal kot učinkovita metoda, toda hkrati zahteva veliko časa in predvsem topila (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Pri maceraciji zmeljemo vzorce na manjše delce, da se poveča površina vzorca v stiku s topilom. Nato se mešanica vzorca in topila premeša, da se pospeši difuzija in odstranjevanje koncentrirane raztopine iz vzorca. Ta postopek se je izkazal za enostavnega in učinkovitega in so ga zato dolgo časa uporabljali pri pridobivanju eteričnih olj ter drugih bioaktivnih spojin (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Parna destilacija je način ekstrakcije, s katerim pridobivamo hlapne frakcije v živilih. Zanja ne potrebujemo organskih topil, temveč samo vodo in 6-8 ur časa. Tehnika vključuje difuzijo vodne pare, toplotni razpad in hidrolizo. Z njo lahko fizično ločimo hlapne in nehlapne organske spojine. Hlapne spojine se nato iz matrice odstranijo z azeotropsko destilacijo, nato se jih kondenzira, zbere in shrani v florentinski bučki. Slabost parne destilacije je v tem, da je energijsko potratna in zahteva veliko časa, zaradi toplotnega razpada pa lahko pride do slabše kakovosti in sprememb v sestavi organskih komponent (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

1.3.2 ZELENE EKSTRAKCIJE

Med zelene ekstrakcije sodijo superkritična ekstrakcija tekočin (SFE), ekstrakcija s tekočino pod tlakom (PLE), ekstrakcija z ultrazvokom (UAE), ekstrakcija z mikrovalovi (MAE), ekstrakcija s pomočjo pulznega električnega polja (PEF), ekstrakcija z visokonapetostno električno razelektrivijo (HVED) in ekstrakcija pod visokim hidrostatičnim tlakom (HHF) (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Za superkritično ekstrakcijo tekočin je značilno, da se pod visoko temperaturo in visokim tlakom plini spremenijo v superkritično tekočino, kjer ni mogoče razlikovati med tekočino in plinom. Tovrstne tekočine imajo nižjo viskoznost od navadnih tekočin in se lažje širijo po matrici, imajo pa tudi nižjo površinsko napetost, ki omogoča, da topilo hitreje prodre v trdno snov. Najpogostejše superkritične tekočine so CO₂, propan in stisnjen utekočinjen naftni plin. Tehniko se uporablja predvsem za izolacijo napolarnih bioaktivnih spojin (karotenoidi in lipidi). Pri ekstrakciji polarnih spojin moramo dodati modifikatorje, kot so etanol, metanol, voda in aceton. Prednosti te tehnike so, da je pridobivanje ekstraktov hitro, selektivno in da ne zahteva posebnega čiščenja, poleg tega pa se jo lahko izvaja tudi z majhnimi količinami vzorca in jo lahko neposredno povežemo z analitičnimi kromatografskimi tehnikami (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Ekstrakcija s tekočino pod tlakom poteka pod višjo temperaturo in tlakom, kar omogoča lažji prodor topila v matrice. Tehnika je privlačna za uporabo, ker omogoča hitro ekstrakcijo ob manjši porabi topil. Tako se jo uporablja za ekstrakcijo antocianinov iz različnih rastlin, obetavna pa je tudi pri ekstrakciji bioaktivnih spojin iz sadja. Edina slaba stran je, da zahteva uporabo prefinjenih inštrumentov, ki lahko delujejo pri višji temperaturi in tlaku (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Ultrazvok je vrsta zvočnega valovanja, s frekvencami med 20 kHz in 100 MHz. Ultrazvok povzroča kavitacijo, kar pomeni nastajanje mehurčkov, ki se širijo in na koncu počijo. Pospešuje tudi prenos toplote in snovi preko motenj v celični steni, kar vodi k boljšemu sproščanju ciljne spojine. Ekstrakcija z ultrazvokom tako vključuje dva glavna fizikalna pojava, in sicer difuzijo skozi celično steno in izpiranje prek lomljenih celičnih sten. Ultrazvok lahko deluje neposredno, kar pomeni, da med virom ultrazvoka in tarčo ni ovir, lahko pa deluje tudi posredno, pri čemer kot medij najpogosteje uporabljamo vodo (ultrazvočna kopel). Z ultrazvokom lahko ekstriramo različne snovi, kot so esencialne maščobe, beljakovine, peptidi, barvila, pigmenti in druge bioaktivne spojine. Prednosti ultrazvoka so, da je relativno enostaven za uporabo in da zahteva relativno nizke naložbe v primerjavi z drugimi načini ekstrakcije (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Mikrovalovi sodijo v elektromagnetni spekter valovanja, in sicer v območje od 300 MHz do 300 GHz z dvema med seboj pravokotnima nihajnjima poljema. Tudi pri tem načinu ekstrakcije prodre topilo v matrico in povzroči difuzijo. Z mikrovalovi, ki oddajajo toploto, lahko pospešimo prenos toplote in zmanjšanje toplotnega

gradienta, kar privede do skrajšanja reakcijskega časa, povečanja donosa in izboljšanja čistosti v primerjavi z drugimi načini ogrevanja. S to metodo tako lahko ločimo eterična olja, antioksidante, pigmente, arome in tudi nekatere druge organske spojine (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Pri ekstrakciji s pomočjo impulzivnega električnega polja prehaja električni potencial skozi celično membrano in loči molekule glede na njihovo napetost. Odbojnost membrane tvori pore v membrani, kar poveča njihovo prepustnost in s tem učinkovitost ekstrakcije. Tako lahko pridobivamo dragocene spojine iz različnega sadja in zelenjave. Novejše prakse so pokazale, da PEF sodi med zelene načine ekstrakcije, saj zdaj kot topila uporabljajo vodo in agrotopila (etanol, metilni estri maščobnih kislin iz rastlinskih olj), poraba energije in rastlinskega materiala je zmanjšana, izvlečki so boljše kakovosti ter bolj čisti (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

V tehniki visokonapetostne električne razelektritve se električna energija z električnega vira vnese neposredno v vodno raztopino z dvema elektrodama, ki ustvarita električno polje. To povzroči mehurčkasto kavitacija, turbulenco in tlačne udarne valove, ki poškodujejo celice, pri čemer se lažje sprostijo spojine iz celice. Tehnika zaradi kavitacije spominja na ekstrakcijo s pomočjo ultrazvoka (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

Tehnologija visokega hidrostatičnega tlaka deluje pri pritisku 200-1000 MPa. Ustvarjena je bila kot alternativa toplotni obdelavi vzorcev, saj se s tem izognemo senzoričnim in fizikalno-kemijskim spremembam, ravno tako pa tudi spremembam v sestavi hranil. Velja za zelen način ekstrakcije velja, ker zahteva samo električno energijo in ne ustvarja odpadkov (Bromberger Sokuetta in drugi, 2018).

1.4 PONOVA UPORABA ČEBULNIH ODPADKOV

Med čebulne odpadke sodijo suhi luskolisti čebule, zunanje plasti čebule, korenine, steblo in čebule, ki so poškodovane ali pa so premajhne, da bi bile komercialne. Samo v EU nastane več kot 500.000 ton čebulnih odpadkov letno, zato so novi načini uporabe teh odpadkov zelo aktualni (<https://www.sciencedaily.com/releases/2011/07/110714073348.htm>, 2018).

Zunanje plasti čebule vsebujejo veliko prehranskih vlaknin, ki jih lahko dodamo živilom, da izboljšamo vsebnost vlaknin in s tem njihovo hranilno vrednost. V primerjavi z drugimi dodanimi prehranskimi vlakninami (pšenična vlakna), se lahko te uporabijo tudi pri »teksturno občutljivih« živilih, kot so mleko in mlečni izdelki (<http://www.new-ag.info/03-6/focuson/focuson4.html>, 2003).

Iz vlaken bele čebule so izločili tudi instantno zgoščevalno sredstvo, ki ima nizko kalorično vrednost in ne vsebuje maščob, beljakovin ali škroba in ima potencialno uporabnost pri hitrejši pripravi hrane (<http://www.new-ag.info/03-6/focuson/focuson4.html>, 2003).

Suhi luskolisti so ravno tako lahko vir prehranskih vlaknin, poleg tega pa lahko iz njih izluščimo številne flavonoide, ki delujejo kot antioksidanti (<https://www.sciencedaily.com/releases/2011/07/110714073348.htm>, 2018).

Čebulo lahko tudi kompostiramo, pri čemer moramo paziti, da jo zakopljemo vsaj 10 cm globoko v kompost, saj zaradi močnih vonjav in arome privablja škodljivce in prostoživeče živali, na kompostniku pa se pojavijo tudi glive (<https://homeguides.sfgate.com/can-compost-onions-72087.html>, 2018). Vendar zaradi številnih zanimivih spojin, ki jih vsebujejo tovrstni odpadki, kompostiranje ni najbolj učinkovit način uporabe odpadne čebule.

1.5 RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI

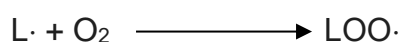
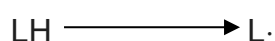
1.5.1 RADIKALI

Radikali so snovi, ki nastanejo, ko pride do homolitske cepitve kovalentne vezi. Zanje je potreben visok vložek energije. Nastajajo ob toplotnem segrevanju, svetlobi in ionizirajočem sevanju. Radikali lahko reagirajo s stabilno spojino, pri čemer sami preidejo v neradikalsko obliko, prej stabilna spojina pa postane radikal. Ker težijo k temu, da bi dosegli stabilno stanje, so zelo reaktivni. Glavni radikali so hidroksilni radikal ($\text{HO}\cdot$), alkilni radikal ($\text{R}\cdot$), alkoksilni radikal ($\text{RO}\cdot$), superoksidni anionski radikal (O_2^-), alkilperoksilni radikal ($\text{ROO}\cdot$), tokoferoksilni radikal ($\text{TO}\cdot$), glutatilni radikal ($\text{GS}\cdot$), vodikov peroksid (H_2O_2) in askorbatni radikal ($\text{Asc}\cdot$). Ti lahko v prevelikih količinah povzročijo oksidativni stres, kar pomeni nenadzorovano oksidacijo biomolekul (Iris in drugi, 2014; Abramovič, 2011).

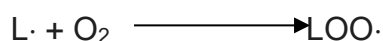
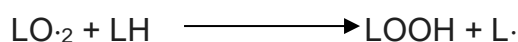
1.5.1.1 OKSIDACIJA LIPIDOV

Redoks reakcija je reakcija, pri kateri se odvijata redukcija in oksidacija. Pri tem se spremenijo oksidacijska števila elementov. Oksidacija je kemijska reakcija, pri kateri se snovi, ki odda elektrone, poveča oksidacijsko število. Redukcija je kemijska reakcija, pri kateri se snovi, ki sprejme elektrone, oksidacijsko število zmanjša. Reducent je snov, ki se oksidira. Oksidant je snov, ki se reducira. Maščobe razpadajo v oksidacijskem procesu, ki ga imenujemo avtooksidacija. Avtooksidacija lipidov je sestavljena iz več različnih faz:

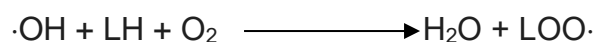
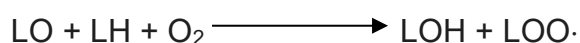
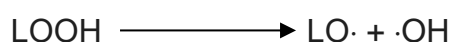
1. Inicijacija



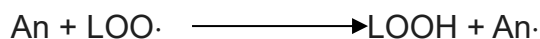
2. Propagacija



3. Razvejanje



4. Terminacija



Primarni produkti avtooksidacije so maščobne kisline.

Poleg antioksidanta (An) lahko reakcijo avtooksidacije zaključi še nastanek neradikalnih produktov rekombinacije ali nesorazmernost radikalov in razpad peroksida pri nastanku sekundarnih produktov avtooksidacije. Mednje spadajo aldehidi, ketoni, furanoni, laktoni, ogljikovodiki, organske kisline in polimeri (Ostrowska-Ligeza in drugi, 2010).

1.5.2 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so snovi, ki preprečujejo oksidacijo pomembnih bioloških molekul, kot so DNK, maščobne kisline ali beljakovine s prostimi radikali (Iris in drugi, 2014).

Največ antioksidantov vsebujejo rastline, saj so zaradi fotosinteze najbolj izpostavljene kisiku. Antioksidanti delujejo na več različnih načinov. Nekateri antioksidanti preprečujejo nastanek radikalov, drugi so encimi, ki uničujejo radikale, nekateri so vodotopne molekule, ki reducirajo radikale, obstajajo pa tudi

antioksidanti, ki absorbirajo elektrone ali odvečno energijo iz radikalov in jo razpršijo znotraj svoje kompleksne liofilne strukture (Iris in drugi, 2014).

Med najbolj znane naravne antioksidante sodijo vitamin C (askorbinska kislina), vitamin A (retinol), vitamin E (α -tokoferol), karotenoidi in flavonoidi, ki sodijo med rastlinske fenole (Iris in drugi, 2014).

Obstaja več kot 8.000 različnih rastlinskih fenolov. Najdemo jih skoraj v vseh rastlinskih organih in so ključnega pomena za rast in razvoj rastline. Pomembno vlogo imajo tudi pri njihovem razmnoževanju. Pomagajo tudi nadzorovati rast debeline stebela, pigmentacijo rastline, hkrati pa jo ščitijo pred različnimi patogeni. Najdemo jih tako v sadju in zelenjavi kot tudi v lubju olesenelih rastlin. Rastlinski fenoli se delijo na benzojske kisline (galna kislina), cimetove kisline (kofeinska kislina), flavone (apigenin), flavonole (kvercetin), flavanonole (taksolin) in flavanole (katehin) (Tanase in drugi, 2019).

Poleg naravnih antioksidantov obstajajo tudi sintetični antioksidanti, ki jih sintetiziramo v laboratorijih. Uporablja se jih kot konzervanse, ki preprečujejo oksidacijo lipidov. Delimo jih na primarne in na sekundarne antioksidante (Yadav in drugi, 2016).

1.6 OLJKA

Gojena oljka (*Olea europea sativa*) je drevo, ki je visoko okrog sedem metrov, z gosto krošnjo, skoraj pepelnato sivim deblom, s stebrno svetlikajočimi se listi in z velikimi mesnatimi, črnimi ali temno vijoličastimi plodovi. Sodi v družino oljnic, ki obsega 22 rodov, ki jim pripada več kot 500 vrst, med njimi poleg oljke tudi jesen, španski bezeg, forsitija in jasmin (Krese, 2001).

Izvira iz območja bližnjega vzhoda, od tam pa se je z Grki in Rimljani razširila tudi drugod po Sredozemlju, drugod po svetu pa so jo spoznali šele po dobi odkritij, in sicer na območjih s sredozemskim podnebjem (Sancin, 1990).



Slika 4: Oljka (Delo, 2009)

1.6.1 ZGRADBA OLJKE

Koreninski sistem oljke je močan, razraščan in širok, a hkrati tudi plitek. Koreninski sistem, razmnoževan vegetativno, je nekoliko bolj globok. Korenine oljke so znane po tem, da imajo visoko regeneracijsko sposobnost, in sicer zaradi vegetativnih korenin, ki izraščajo iz koreninskega vratu, ki povezuje koreninski sistem z deblom (Sancin, 1990).

Panj je del rastline, ki ga najdemo nad koreninskim vratom. Dobro je opazen predvsem na starejših rastlinah, saj je pri njih panj razpokan in iz njega izraščajo mlajši poganjki, ki jih imenujemo hiperplazije. Le-te lahko najdemo tudi na deblu, vejah in neposredno pod tlemi starejše rastline, iz njih pa se lahko razvijejo novi poganjki in tako nastane nova rastlina (Sancin, 1990).

Deblo leži med panjem in vejami in je pri mlajših rastlinah celovito in zdravo, medtem ko je pri starejših rastlinah razpokano in razvejano. Deblo se pri oljki ne debeli enakomerno, zaradi česar se drevo naguba, hkrati pa se debela zavijejo v obliki polževega vijaka, in sicer v levo (Sancin, 1990).

Veje se pri oljki razvijejo nepravilno in nimajo pravega razporeda, kot denimo pri češnji. Listi so na oljki stalno prisotni, saj je zimzelena rastlina (Sancin, 1990).

Listi ji odpadejo na vsakih dve do tri leta. Zgornja ploskev lista je temnozeleno in bleščeča, spodnja pa ima srebrno beli odtенок in je prekrita z dlačicami (Sancin, 1990).

Rastlina cveti junija, sami cvetovi so pri oljki dvospolni in se združujejo v socvetja, ki so v času cvetenja bele barve. Izraščajo večinoma iz enoletnih - kot tudi iz dvoletnih ali triletnih vej (Sancin, 1990).

Plodovi so okrogle ali podolgovate oblike in tehtajo 2-9 g pri sortah za predelavo v olje in 7-15 g pri sortah za vlaganje. Plod je sestavljen iz tanke kožice (epikarp), mesa, ki vsebuje olje (15-30 %), monosaharide, disaharide in polisaharide, esencialne aminokisliline, oleuropein, barvila in minerale (mezokarp), ter iz koščice (endokarp), ki vsebuje eno do dve semeni (Sancin, 1990).

1.6.3 OLJKA V NAŠIH KRAJIH

Oljka se v Sloveniji nahaja predvsem v slovenski Istri, najdemo pa jo tudi v Vipavski dolini in v Goriških Brdih. Vodilne sorte na Slovenskem so istrska belica, italijanske: leccino, frantoio, pendolino, pri namiznih oljkah pa ascolana in tenera, ki so izpodrinile navadno belico, črnico in bugo. Sredozemsko podnebje v Sloveniji ni izrazito, zato so za naše kraje značilne številne pozebe, ki drastično zmanjšajo število oljk v oljčnih nasadih (leta 1929, leta 1956), hkrati pa vpliva na poseben vonj in aromo oljčnega olja, zaradi česar je to visoko cenjeno (Vesel in drugi, 2017).

1.7 PRIDOBIVANJE OLJČNEGA OLJA

1.7.1 SPRAVILO PRIDELKA

Oljčno olje pridobivamo iz plodov oljke, tj. oljk. Plodovom začne naraščati teža približno dva meseca po oploditvi oziroma proti koncu julija ali v začetku avgusta, ko se začnejo v parenhimskih celicah nalagati maščobne celice v obliki oljnih kapljic. Kasneje se njihovo število močno poveča in pritiskajo citoplazmo proti celičnim stenam in pri dozorelih plodovih se oljne kaplje pojavijo tudi v medceličnini. Ko začne vsebnost klorofila v plodovih padati, začnejo le-ti dozorevati. Plodovi dozoriijo v decembru, ko se tudi akumulacija olja upočasni in pade vrednost reducirajočih sladkorjev na nizko raven (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

Čas optimalnega obiranja se pri posameznih sortah izredno razlikuje, a za večino sort, iz katerih pridobivamo oljčno olje, je značilno, da jih obiramo med oktobrom in decembrom oziroma januarjem, pri čemer se z zgodnejšim obiranjem izognemo večini škodljivcev in škodi, ki jo povzročijo vremenske nevšečnosti in izboljšamo kakovost olja na račun količine le-tega (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

Oljke lahko obiramo na več različnih načinov. V večjih nasadih obirajo plodove strojno, kar zmanjša stroške obiranja na račun učinkovitosti obiranja (na drevju lahko ostane tudi 20 % plodov). Namizne oljke in oljke za visokokakovostna olja trgamo z dreves. Tovrstne oljke so najkakovostnejše, a je hkrati tudi strošek obiranja največji. Plodove lahko tudi pobiramo s tal, kar sicer zahteva manj ročnega dela, toda pridelek, pobran na tak način, je najmanj kakovosten, saj se pomeša z zemljo in umazanijo. Marsikje plodove še vedno klatijo z dreves, vendar se ta način obiranja opušča, ker lahko s klatenjem poškodujemo tako veje kot tudi plodove. Smukanje ali česanje plodov z dreves je podobno trganju plodov z dreves, a ima nižje pridelovalne stroške in nižjo kakovost kot ročno obiranje (Veber, 2017).

Obrane plodove moramo čim prej vložiti ali iztisniti v olje, da ima to večjo kakovost. V primeru, da to ni mogoče, jih moramo uskladiščiti v sterilnem prostoru z nizko relativno zračno vlago in temperaturo 7-10 °C (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

1.7.2 PREDELAVA OLJČNIH PLODOV

Oljke stisnemo v oljčno olje v oljarnah. Te morajo stati daleč od industrijskih središč, saj ta izločajo v okolje razne nečistoče, ki se lahko pomešajo z oljem in mu poslabšajo kakovost. Oljke prevažamo iz skladišč v oljarne v zračnih zabojih. Najprej jih grobo očistimo in odstranimo bolne in poškodovane plodove ter tuje primesi. Nato plodove operejo v posebnem pralnem stroju, ki odstranjuje tudi tuje primesi (Veber, 2017; Sancin, 1990).

Plodove nato drozgam. Pri drozganju z mlinom zdrobimo celično steno, da lahko oljne kapljice izstopijo iz celice. Zaželeno je, da se meso čim bolj zmečka, hkrati pa se koščica ne sme preveč zdrobiti, da se pri kasnejši obdelavi lažje izcedi mošt. Olive lahko stiskamo z mlino s kamnitim mlinskim kamnom, čeprav se danes zaradi hitrejše in cenejše obdelave uporabljajo električni mlini (Sancin, 1990).

Mesenje je postopek v pridelavi oljčnega olja, pri katerem se majhne kapljice olja združujejo v večje, kar kasneje omogoča lažje ločevanje olja od vode. Tega ni potrebno narediti, če smo drozganje opravili z mlinskimi kamni (Sancin, 1990).

Mesenju sledi ekstrakcija olja iz drozge. To lahko počnemo s stiskanjem, s centrifugacijo, s perkolacijo ali z dekantacijo, te načine pa lahko tudi združimo, da dobimo boljšo kakovost in količino olja. Pri stiskanju drozgo stisnemo s prešami, da se sprostita olje in vegetativna voda, ki ju pozneje med seboj ločimo. Centrifugiranje loči med seboj oljne tropine in oljni sok, ki se ju nato loči v oljčno olje in vegetacijsko vodo. Ekstrakcija s perkolacijo ali kapilarnim vlekem izkorišča princip večje površinske napetosti na kovinah, kot jo ima voda. Pri tem v olju še vedno ostane nekaj vode, ki jo nato ločimo od olja. Dekantacija deluje na sistemu izločanja olja z elektroforezo. Drozgo razredčimo z vodo in nato damo v bazen z dvema elektrodama, ki razbijeta emulzijo, kar povzroči, da olje priplava na površje (Veber, 2017).

Olje nato ločimo od vode v separatorjih, ki izkoriščajo centrifugalno silo, da ločijo olje od vode (Veber, 2017).

Oljčno olje ima v sebi še vedno nekaj usedlin, ki povzročajo motnost olja. Olje lahko prečistimo s filtri ali pa počakamo, da se usedline posedejo in ga nato pretočimo (Veber, 2017).

Olje hranimo v temnem prostoru brez tujih vonjev in s temperaturo med 12 °C in 15 °C. Olje na vsakih šest mesecev pretočimo, da se znebimo usedlin. Po enem letu se mu prične kakovost slabšati (Sancin, 1990).



Slika 5: Oljčno olje (Delo, 2019)

1.8 SESTAVA OLJČNEGA OLJA

Oljčno olje je sestavljeno predvsem iz triacilglicerolov (98 %), v manjših količinah pa so prisotne tudi proste maščobne kisline, monoacilgliceroli in diacilgliceroli, glicerol in v zelo majhnih količinah (0,5-1 %) tudi negliceridne sestavine (Medved, 2015).

1.8.1 TRIACILGLICEROLI

Triacilgliceroli so sestavljeni iz glicerola, na katerega so vezane tri maščobne kisline, ki se delijo na nasičene, enkrat nenasičene in na večkrat nenasičene maščobne kisline. Sodiijo med umiljive frakcije olivnega olja, kar pomeni, da lahko iz njih ob prisotnosti močne alkalne raztopine naredimo milo. Najpogostejše maščobne kisline v oljčnem olju so oleinska kislina (55-83 %), linolna kislina (2,5-21 %), palmitinska kislina (7,5-20 %), stearinska (0,5-5 %) in palmitoleinska kislina (0,3-3,5 %), v manjših količinah pa so prisotne še linolenska, arašidova, eikozenojska, heptadekanojska, heptadecenojska, lignocerinska, behenska in miristinska kislina (Medved, 2015).

Najbolj je v oljčnem olju zastopan triacilglicerol, ki ima vezane tri oleinske kisline (40-59 %). Temu sledijo triacilgliceroli, sestavljeni iz palmitinske-oleinske-oleinske maščobne kisline (12-20 %), oleinske-oleinske-linolne maščobne kisline (12,5-20 %), palmitinske-oleinske-linolne maščobne kisline (5,5-7 %) in stearinske-oleinske-oleinske (3-7 %), v manjših količinah pa lahko najdemo tudi druge triacilgliceride (Medved, 2015).

1.8.2 MINORNE KOMPONENTE GLICEROLNEGA IZVORA

Minorne komponente glicerolnega izvora sodijo med neumiljive frakcije oljčnega olja. Mednje sodijo monoacilgliceroli, diacilgliceroli in gliceroli, ki nastanejo pri hidrolizi triacilglicerolov, pri kateri se iz triacilglicerola odcepijo molekule maščobne kisline. Pri hidrolizi nastanejo tudi proste maščobne kisline, ki niso vezane na glicerol ali na

kak drug alkohol. Pri kemični obdelavi oljčnega olja so v njem prisotne tudi *trans* maščobne kisline (Medved, 2015).

1.8.3 NEGLICEROLNE SNOVI

V oljčnem olju so prisotne tudi številne neglicerolne snovi, ki dajejo olju posebno aromo, preprečujejo staranje olja in imajo pomemben vpliv na biološke funkcije v človeškem telesu. Mednje spadajo triterpenski dialkoholi (uvaol in eritridiol), steroli (sitosterol, δ -5-avenasterol, kampesterol), pigmenti (klorofil, karoteni, ksantofili), ki vplivajo na barvo oljčnega olja, ogljikovodiki (skvalen), tokoferoli (α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol), ki so glavni antioksidanti v oljih in maščobah, alifatski alkoholi (dokožanol, tetrakožanol, heksakožanol, oktakožanol) in voski (estri maščobnih kislin z maščobnimi alkoholi) (Medved, 2015).

Mednje spadajo tudi fenolne komponente, ki vplivajo na aromo z značilnim grenkim okusom in dodatno prispevajo k vrhunski stabilnosti oljčnega olja, saj so zelo močni antioksidanti, kar pomeni, da tako kot tokoferoli zavirajo hidrolizo triacilglicerolov in oksidacijo nenasičenih triacilglicerolov. Mednje spadajo oleuropein, ki poskrbi za grenak okus oljčnega olja, in ligstrozid, ki sta nastala kot sekundarna metabolita sekoroidov, luteolin in apigenin, ki sta nastala kot sekundarna produkta falvonoidov, pinosresinol, 1-acetopinosresinol in 1-hidroksipinosresinol, ki so nastali kot sekundarni metaboliti lignanov, in nekateri enostavni biofenoli, kot so galna kislina, kavna kislina, cimetna kislina in ferulna kislina. Ligstrozid in oleuropein lahko dodatno razpadeta na aromatske ogljikovodike tirosole in na hidroksitirosole, ki nimajo več antioksidativne učinkovitosti (Medved, 2015).

1.9 OBSTOJNOST OLJČNEGA OLJA

Oljčno olje se prvih šest mesecev po predelavi imenuje oljčni mošt, v obdobju med 6 mesecev in 1 letom po predelavi se imenuje mlado olje, oljčno olje, ki je starejše od 1 leta, pa se imenuje staro olje. Oljčna olja s starostjo izgubljajo dobre lastnosti, kot sta sadežna aroma in obarvanost. Tako so po 12-18 mesecih precej slabše obarvana in bistra. Deviška oljčna olja je zato priporočljivo hraniti od 12 do 18 mesecev, medtem ko lahko rafinirana oljčna olja hranimo od 6 do 12 mesecev (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

Najpomembnejši vzrok za kvar masti in olj je oksidacija. Primarni produkti oksidacije lipidov so hidroperoksidi, ki so zelo nestabilni. Iz njih nastajajo sekundarni produkti oksidacije, kot so ogljikovodiki, alkoholi, ketoni in aldehidi, ti pa se lahko oksidirajo še naprej do karboksilnih kislin.

Oksidacijska stabilnost olja ali maščobe je določena kot čas, potreben za doseg kritične točke oksidacije (indukcijski čas). Odvisna je od individualnih značilnosti olja, kot so vsebnost nenasičenih maščobnih kislin, vsebnosti naravnih antioksidantov, sledi kovin in stopnje oksidiraniosti. Da bi lahko določili stabilnost olja v krajšem času, oksidacijo pospešimo, na primer s povišanjem temperature in izpostavljenostjo olja

zraku ali kisiku. Zadnje čase je vse bolj razširjena metoda rancimat, ki omogoča avtomatizirano določevanje oksidacijske stabilnosti. Metoda je enostavna, zahteva malo dela in minimalni nadzor med določevanjem. Vzorec olja termostatiramo pri visoki temperaturi, najpogosteje pri temperaturi med 100 in 130 °C. Olje prepihujemo z zrakom, ki ga vodimo v destilirano vodo. Po določenem času segrevanja začne v olju kot produkt oksidacije nastajati med drugim tudi mravljična kislina, ki jo s tokom zraka vodimo v destilirano vodo. Prevodnost vode se poveča, kar spremljamo s pomočjo vanjo potopljenih elektrod. Indukcijski čas definiramo kot čas, v katerem določimo prevoj krivulje prevodnosti destilirane vode, lahko pa tudi kot čas, ko prevodnost v destilirani vodi doseže neko vnaprej izbrano vrednost.

1.10 MERITVE KAKOVOSTI OLJČNEGA OLJA

1.10.1 RAZVRSTITEV OLJČNIH OLJ

Oljčna olja delimo na več kategorij. Olja, ki jih pridobimo samo z mehanskim obdelovanjem, sodijo med deviška oljčna olja, olja, ki jih pridobimo s pomočjo kemijske obdelave, se imenujejo rafinirana oljčna olja in olja, ki jih pridobimo s pomočjo topil, imenujemo olja iz oljčnih tropin (Vesel in drugi, 2009).

Deviško oljčno olje delimo na ekstra deviško oljčno olje, fino deviško oljčno olje, navadno deviško oljčno olje in na lampante oljčno olje. Ekstra deviško oljčno olje ima najvišjo kakovost, fino deviško oljčno olje ima višjo kakovost kot navadno deviško oljčno olje, medtem ko je lampante oljčno olje slabe kakovosti in kot tako neprimerno za prehrano (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

Olja oljčnih tropin delimo na surovo olje oljčnih tropin, ki je namenjeno rafiniranju, rafinirano olje oljčnih tropin, in na olje oljčnih tropin, ki je mešanica rafiniranega olja oljčnih tropin in deviškega oljčnega olja (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

V trgovini lahko najdemo le olja naslednjih kategorij:

- ekstra deviško oljčno olje, ki je bolj kakovostno, pridobljeno neposredno iz oljk zgolj z mehanskimi postopki,
- deviško oljčno olje, ki je pridobljeno neposredno iz oljk in zgolj z mehanskimi postopki,
- oljčno olje, ki je mešanica deviškega oljčnega olja in rafiniranega oljčnega olja,
- olje iz oljčnih tropin, ki je mešanica deviškega oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

1.10.2 METODE OCENJEVANJA KAKOVOSTI IN PRISTNOSTI OLJČNIH OLJ

Vrsto olja in kakovostne razrede opredeljujemo s kemijskimi določitvami in senzoričnim ocenjevanjem določenih olj. S kemičnimi analizami ugotavljamo kakovostne parametre in pristnost olj, medtem ko uporabljamo senzorično ocenjevanje le za deviška oljčna olja (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

1.10.2.1 KEMIJSKE DOLOČITVE OLJČNIH OLJ

Preglednica 1: Merila pristnosti oljčnih olj

Vrsta olja	Vsebnost prostih MK, %	Peroksidno število mmol O ₂ /kg	K232	K270	K270 po absorpciji na Al ₂ O ₃	K
Ekstra deviško oljčno olje	M 1,0	M 10,0	M 2,5	M 0,20	M 0,10	M 0,01
Fino deviško oljčno olje	M 2,0	M 10,0	M 2,6	M 0,25	M 0,10	M 0,01
Navadno deviško oljčno olje	M 3,3	M 10,0	M 2,6	M 0,25	M 0,10	M 0,01
Lampante* oljčno olje	M 3,3	M 10,0	M 3,7	M 0,25	M 0,11	/
Oljčno olje	M 1,5	M 7,5	M 3,3	M 1,0	/	M 0,13
Rafinirano oljčno olje	M 0,5	M 2,5	M 3,4	M 1,25	/	M 0,16
Surovo olje oljčnih tropin	m 2,0	/	/		/	/
Rafinirano olje oljčnih tropin	M 0,5	M 2,5	M 5,5	M 2,5	/	M 0,25
Olje oljčnih tropin	M 1,5	M 7,5	M 5,3	M 2,0	/	M 0,20

* svetilno olje, ni za prehrano

V preglednici 1 predstavlja M najvišje dovoljene vrednosti, m pa najnižje dovoljene vrednosti posameznih parametrov (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

1.10.2.2 SENZORIČNO OCENJEVANJE

Senzorična analiza je znanstvena disciplina, ki meri, analizira in interpretira reakcije na tiste značilnosti živil, ki jih zaznamo s petimi osnovnimi čuti: z vidom, okusom, vohom, s sluhom in tipom. Sodobne metode senzorične analize živil so povezane z razvojem znanosti na področju analiznih metod živil in fiziologije senzoričnega zaznavanja videza in barve živil, vonja, okusa, teksture oziroma celovite arome živil (Bučar-Miklavčič in drugi, 2015).

Metoda za senzorično ocenjevanje določa postopek ocenjevanja senzoričnih značilnosti deviškega oljčnega olja in razvrščanje v kakovostne razrede. Metoda določa merila za senzorično ocenjevanje deviškega oljčnega olja, obsega poseben besednjak in standardizirane pogoje za ocenjevanje. Aroma oljčnega olja je definirana kot celovita kombinacija vonjalnih, okušalnih in trigeminalnih zaznav med okušanjem (Bučar-Miklavčič in drugi, 2015).

Delo ocenjevalne komisije poteka v senzoričnem laboratoriju, ki je zasnovan tako, da zagotavlja delo v primernem, udobnem in standardiziranem okolju. Ta mora vsebovati predpisane kozarce z vzorci (14-16 ml olja), ki so označeni z naključno izbranimi kombinacijami števil ali črk z neizbrisljivim pisalom brez vonja, urno steklo, ocenjevalni list z navodili za njegovo uporabo, svinčnik ali pero (za vnos podatkov lahko tudi računalnik), narezana jabolka za nevtralizacijo okusa in kozarec vode sobne temperature. Kozarec mora biti temno obarvan, da barva, ki pri senzoričnem ocenjevanju sicer nima vpliva, ne bi vplivala na okus olja (Bučar-Miklavčič in drugi, 2015; Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

Ocenjevalna komisija (panel) je sestavljena iz vodje in osmih do dvanajstih preizkuševalcev, ki morajo biti usposobljeni, da razlikujejo med podobnimi vzorci (Bučar-Miklavčič in drugi, 2015).

Vzorci se ocenjujejo v standardiziranih kozarcih, pokritih z urnim steklom. Kozarci vsebujejo 14-16 ml olja, segretega na 28-30 °C. Najprimernejši čas za ocenjevanje je zjutraj, saj se takrat vonji in aroma najbolj zaznavajo. Preizkuševalec najprej dvigne kozarec in ga zavrti, da se olje razporedi po notranji površini kozarca. Nato sname urno steklo in z enakomernimi, počasnimi in globokimi vdihom voha vzorec, dokler si ne ustvari mnenja o njem (največ 30 s). Nato da v usta majhen požirek olja (približno 3 ml) in ga razporedi po vsej ustni votlini, da zazna vse okuse olja. Na dan se lahko ocenjuje največ tri serije po štiri vzorce, da se izognemo kontrastu, do katerega bi prišlo, če bi vzorce ocenjevali enega za drugim. Ker se občutljivost okušanja zaradi zaporednega pokušanja izgubi, je treba ostanke olja odstraniti iz ust. To storimo z žvečenjem koščka jabolka, ki se ga nato izpljune v umivalnik. Usta lahko tudi poplaknemo z vodo sobne temperature (Bučar-Miklavčič in drugi, 2015).

Pozitivne vonjave oljčnega olja so sadežno, grenko in pikantno, medtem ko so negativne vonjave oljčnega olja pregreto, plesnivo/vlažno, morklja, zakisano,

kovinsko, po segretem ali zažganem, seno/les, grobo, strojno olje, rastlinska voda, slanica in črvivo (Bučar-Miklavčič in drugi, 1997).

Ekstra deviško oljčno olje ima prevladujoč vonj po zelenem z dodatkom vonja po pekočem, sladkem in sadežnem, deviško oljčno olje ima vonj po zelenem z dodatkom vonja po trpkem, gorčici, sladkem in po različnem sadju. Olje z napako zakisano ima prevladujoč vonj po kislem, vsebuje pa tudi vonjave po lesu, žarkem, sladkem, vinu in plesni. Olje z napako pregreto/morklja ima vonj po pregetih plodovih, po gnilem, sadnem, kislem in žarkem, olje z napako plesnivo/vlažno ima vonj po plesnivem, po milu, po lesu in po zemlji, olje z napako žarko pa ima vonj po žarkem, po masti, po olju, po lesu in po kislem (Bučar-Miklavčič in drugi, 2015).

Vodja panela nato uredi podatke. Kot srednja vrednost je pri ocenjevanju kakovosti najuporabnejša mediana, ker osamelci ne vplivajo na njeno vrednost. Na podlagi mediane napak in mediane sadežnosti nato razvrstimo oljčna olja v posamezne kategorije. Ekstra deviško oljčno olje ima mediano napak enako 0 in mediano sadežnosti večjo od 0, deviško oljčno olje ima mediano napak večjo od 0 in manjšo od 3,5 in mediano sadežnosti večjo od nič, lampantno oljčno olje pa ima mediano napak večjo od 3,5; v primeru, da je mediana napak manjša od 3,5, pa mora imeti mediano sadežnosti enako nič (Bučar-Miklavčič in drugi, 2015).

1.11 VPLIVI OLJČNEGA OLJA NA ZDRAVJE

Oljčno olje dokazano pomaga vzdrževati funkcije srčno-žilnega sistema, prehrana na osnovi oljčnega olja pa pripomore k izboljšanju fizioloških funkcij srčno-žilnega sistema, k zdravju srca, zmanjšuje oksidativni stres in izboljša stanje krvnih lipidov, zmanjšuje tudi tveganje za nastanek koronarne srčne bolezni. Namesto nasičenih maščob raje uživajmo oljčno olje, saj tako pripomoremo k zmanjšanju ravni holesterol v krvi (Vesel in drugi, 2017).

Oljčni biofenoli imajo veliko biološko uporabnost predvsem kot antioksidanti, ki zmanjšujejo oksidativni stres, ki je posledica čezmernih oksidacijskih procesov v našem telesu. Koncentracija končnih razpadnih produktov oljčnih biofenolov v krvi in s tem povezana učinkovitost le-teh v telesu, je zelo odvisna od oblike, v kateri jo zaužijemo. Pri biofenolih v oljčnem olju je tako najbolj primerno, da jih zaužijemo v obliki oljčnega olja, saj so raziskave pokazale, da je biološka uporabnost snovi večja, če jih uživamo v izvorni obliki. Pri oljčnem olju namreč pride do sinergije med sekoridoidi, flavonoidi, lignani in alfa-tokoferolom (vitamin E). Biofenoli lahko tudi zaustavijo ali vsaj zmanjšajo rast raka. Glede na antioksidativno stanje olja lahko karotenoidi delujejo antioksidativno ali prooksidativno (Vesel in drugi, 2017).

2 HIPOTEZE

1. Suhi liofilizirani čebulni ekstrakti bodo učinkovitejši pri ohranjanju oksidativne stabilnosti oljčnega olja kot suhi čebulni listi.
2. Etanolni ekstrakti čebulnih listov bodo imeli višjo antioksidativno učinkovitost kot vodni ekstrakti čebulnih listov.
3. Čebulni ekstrakti, ki smo jih pridobili s pomočjo ultrazvočnih valov, bodo vsebovali več fenolnih spojin kot čebulni ekstrakti, ki smo jih pridobili s stresanjem.
4. Tako ekstrakti kot suhi listi bodo imeli pri uporabljenih koncentracijah negativen vpliv na senzorične lastnosti oljčnega olja.

3 POSTOPKI PRI RAZISKOVALNI NALOGI

3.1 PRIPRAVA MATERIALA

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali suhe luskoliste navadne čebule, ki smo jih pridobili kot odpad iz gostinskega obrata. Najprej smo ločili suhe luskoliste od preostalega dela čebule in jih posušili. Nato smo posušene liste zmleli s kavnim mlinčkom in nato še dvakrat po eno minuto s krogličnim mlinom (Retsch MM 400) pri frekvenci 300/s. V vsaki kapsuli so bile 4 čajne žličke suhih listov in 4 kroglice s premerom 15 mm.



Slika 6: Čebulni listi pred (posodica spodaj) in po mletju (posodica zgoraj) s krogličnim mlinom

3.2 EKSTRAKCIJA

Pri ekstrakciji smo najprej v 50 ml epruveto zatehtali 3 g zmletih posušениh listov in nato dodali 30 ml topila ter raztopino dobro premešali na vrtinčniku. Ker smo naredili dva načina ekstrakcije pri dveh različnih topilih in naredili tri vzorce na isti način ekstrakcije pri enem topilu, smo uporabili dvanajst 50 ml epruвет in 36 g listov. Topili, ki smo ju uporabili, sta bili MiliQ voda (bidestilirana voda) in 70 % raztopina etanola v MiliQ vodi.

Polovico raztopin smo nato 30 minut stresali na stresalniku, drugo polovico pa za 30 minut potopili v ultrazvočno kopel, ki je delovala s frekvenco 40 kHz in z močjo 100 W. Temperaturo smo ohranjali med 12 in 15 °C tako, da smo vodi v ultrazvočni kopeli dodajali led. Ko smo končali s stresanjem oziroma z ultrazvočno kopeljo, smo vzorce dali v centrifugo za 10 minut pri 3800 obratih/min in nato topilo z raztopljenimi

snovmi odlili v ustrezno označene menzure. V epruvete, v katerih je ostal sediment, smo nato še enkrat dodali topilo, jih stresali ali dali v ultrazvočno kopel za 30 minut in centrifugirali deset minut pri 3800 obratih/min, topilo pa odlili v menzuro, v kateri je bilo topilo po prvem centrifugiranju. Ta postopek smo ponovili še enkrat in ko smo še tretjič odlili topilo, smo dobili celoten ekstrakt, ki smo ga prefiltrirali preko filtrirnega papirja ter izmerili prostornino prefiltriranega ekstrakta.



Slika 7: Ekstrakcija v ultrazvočni kopeli (Shesto, SHE-UT8031-EUK)



Slika 8: Ekstrakcija s stresanjem na stresalniku (Kambič, WB-30 STE)

Vodni ekstrakt smo odpipetirali v 15 ml epruvete in jih shranili v zamrzovalniku pri temperaturi – 80 °C. V vsako epruveto smo odpipetirali 5 ml vodnega ekstrakta. Vodni ekstrakti so bili tako pripravljene za liofilizacijo.

Etanolnim ekstraktom smo morali pred liofilizacijo še odstraniti topilo etanol. To smo naredili z odparevanjem topila na rotavaporju. Rotavapor (Buchi) je naprava, pri kateri z zniževanjem tlaka dosežemo, da poteče destilacija tudi pri nižjih temperaturah, ker imajo tekočine pri nižjem tlaku nižjo temperaturo vrelišča. To je zelo pomembno za koncentriranje raztopin s spojinami, ki so nestabilne pri višjih temperaturah. Temperatura vrelišča topila pri nizkem tlaku je odvisna od lastnosti topila.

Topilo z raztopljenimi snovmi damo v bučko, ki jo vstavimo v rotavapor. Začetni zračni tlak v rotavaporju postopoma znižujemo, vendar pazimo, da topilo ne zavre. Ko opazimo prve destilirane kapljice etanola v hladilniku in zbiralni bučki, tlak ustalimo in ob konstantnem vrtenju bučke v vodni kopeli pri 45 °C pustimo, da etanol izhlapi. Ko se to zgodi, izklopimo rotavapor, prelijemo preostanek raztopine v menzuro, izmerimo prostornino raztopine in celotno raztopino razdelimo 8 mL alikvote v 15 mL epruvete. Etanol, ki je pri procesu nastal, odlijemo stran. Raztopine v epruveh nato zamrznemo v zamrzovalniku pri temperaturi - 80 °C. Tako so vzorci pripravljene za liofilizacijo.

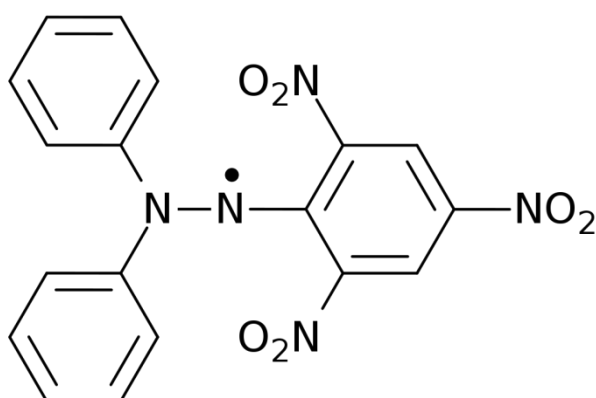
Vzorci v epruveh vsebujejo nekaj vode, ki jo moramo odstraniti za pridobitev suhega ekstrakta. To počnemo z liofilizacijo. Vzorce damo v liofilizator (Christ Alpha 1-2 LDplus), ki suši pri temperaturi - 50 °C in pri visokem vakuumu, kar povzroči, da voda v vzorcih sublimira in tako ostane le suhi liofilizirani ekstrakt čebulnih listov.



Slika 9: Liofilizator (Christ Alpha 1-2 LDplus)

3.3 DDPH· METODA

DDPH· test je ena izmed najstarejših metod za določitev sposobnosti antioksidantov za lovljenje radikalov. Določitev temelji na reakciji med stabilnim radikalom 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil(DDPH·) in antioksidantom. Antioksidant odda vodikov atom in DPPH· preide v nereaktivno obliko 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH-H). Radikal DDPH· absorbira svetlobo pri valovni dolžini 517 nm. Učinek preiskovanih antioksidantov na vsebnost radikala pri različnih koncentracijah antioksidanta določimo tako, da s spektrofotometrom izmerimo znižanje absorbance pri ustrezni valovni dolžini. Znižanje absorbance je posledica spremembe barve iz vijolične v rumeno, ko preide radikal DDPH· v stabilen radikal DPPH-H (Abramovič, 2011).



Slika 10: Strukturna formula radikala DDPH·

3.3.1 REAGENTI IN TOPILA

Raztopina DDPH· (0,1 mmol/L): zatehtamo 1,97 mg DDPH·, prenesemo v 50 ml bučko in nato 96 % etanol dolijemo do oznake. Reagent je obstojen največ 2 dni.

3.3.2 POSTOPEK DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI ČEBULNIH EKSTRAKTOV

Najprej smo raztopili vzorce liofiliziranih čebulnih ekstraktov. Etanolna čebulna ekstrakta, ki smo ju pridobili s stresanjem in z ultrazvokom, smo najprej raztopili v 3 ml 70 % etanola, koncentracija raztopljenega ekstrakta je bila tako pri etanolnem ekstraktu, ki smo ga pridobivali s stresanjem, 23,8 mg/mL, pri etanolnem ekstraktu, ki smo ga pridobili z ultrazvokom, pa 41,14 mg/ml. Nato smo etanolni čebulni ekstrakt, pridobljen z ultrazvokom, redčili s 70 % etanolom, tako da smo dobili 60x, 50x, 40x, 30x, 20x, 15x, 10x, 8x, 6x in 4x redčene raztopine čebulnih ekstraktov. Za določanje antioksidativne učinkovitosti smo tako analizirali raztopine etanolnega ekstrakta iz čebulnih listov v razponu od 0,686 mg/mL do 10,29 mg/mL. Etanolne čebulne ekstrakte, pridobljene s stresanjem, smo razredčili s 70 % etanolom, tako da smo dobili 30 x, 20 x, 15 x, 10 x, 8 x, 6 x, 4 x in dvakratne razredčitve, kar pomeni,

da smo analizirali raztopine s koncentracijo ekstrakta v razponu od 0,793 mg/mL do 11,900 mg/mL. Voden ekstrakt čebulnih spojin, pridobljen z ultrazvokom, smo najprej raztopili v 1,8 ml bidestilirane vode, koncentracija ekstrakta je bila tako 10 mg/mL, medtem ko smo vodne ekstrakte, pridobljene s stresanjem, raztopili v 2,5 ml bidestilirane vode, koncentracija ekstrakta je bila tako 7,2 mg/mL. Nato smo obe vrsti vodnih ekstraktov razredčili tako, da smo dobili 10 x, 5 x, 3 x in 2 x razredčitve raztopin.

Nato smo v posamezno epruveto odmerili najprej 2,9 ml 0,1 mM raztopine DDPH· in nato 0,1 ml ustrezno razredčenega vzorca. Vsebinsko smo premešali na vrtinčniku in po 30 min inkubacijske dobe v temi na sobni temperaturi pomerili absorbanco pri 517 nm proti slepemu vzorcu. Slep vzorec je bila 96 % raztopina etanola. Kontrolni vzorec smo pripravili tako, da smo v kiveto odmerili 2,9 ml 0,1 mM raztopine DDPH· in nato 0,1 ml 96 % raztopine etanola. Vsebinsko smo nato premešali na vrtinčniku in nato izmerili absorbanco pri 517 nm proti slepemu vzorcu.

Antioksidativno sposobnost ekstrakta izrazimo kot koncentracijo ekstrakta, ki zniža začetno količino DPPH· radikala za polovico, to je učinkovita koncentracija, $EC_{50_{DPPH}}$.

3.4 FOLIN-CIOCALTEUJEVA METODA

Folin Ciocalteujeva metoda se tradicionalno uporablja za določitev skupnih fenolnih spojin. Dejansko metoda opiše sposobnost antioksidanta, saj temelji na sposobnosti preiskovalne spojine, da odda elektron, ki reducira molibden v kompleksu fosfomolibden/fosfovolfram. Donor elektrona je fenoksidni anion (AO^-), ki nastane pri alkalnih pogojih po deprotonaciji -OH skupine v molekuli fenolne spojine. Reducirana oblika kompleksa, ki modro obarva reakcijsko zmes, absorbira svetlobo pri valovni dolžini 765 nm. Vsebnost omenjenega kompleksa pri različnih koncentracijah antioksidanta določimo spektrofotometrično. Večja vrednost za absorbanco pokaže na boljšo redukcijsko sposobnost preiskovanih polifenolov. Slabost Folin Ciocalteujeve metode je v tem, da FC reagent reagira z vsemi fenolnimi -OH spojinami, vključno z aromatskimi aminokislinami in z reducirajočimi zvrstmi, kot so askorbinska kislina, reducirajoči sladkorji in organske kisline (Abramovič, 2011).

3.4.1 PRIPOMOČKI

50 ml epruveta

100 ml bučka

15 ml epruveta

steklene epruvete

avtomatske pipete

vrtinčnik

analitska tehtnica

spektrofotometer

1,5 ml Eppendorf epruvete

centrifuga

kapalka

3.4.2 REAGENTI IN TOPILA

Folin Ciocalteujev reagent (FC), ki je razredčen z bidestilirano vodo v razmerju 1:2, 20 % raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3): v 50 ml epruveto zatehtamo 4 g Na_2CO_3 in nato dodamo 16 g vode ter mešamo, dokler se topljenec ne raztopi

bidestilirana voda

raztopina 70 % etanola

raztopina galne kisline (0,01 mg brezvodne galne kisline/ml)

3.4.3 POSTOPEK DOLOČANJA SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN S FOLI-CIOCALTEUJEVO METODO

3.4.3.1 UMERITVENA KRIVULJA

Pri Folin Ciocalteujski metodi najprej pripravimo umeritveno krivuljo. V Eppendorfove epruvete odmerimo reagente v naslednjem vzorcu:

0,2 ml raztopine ustrezno razredčene galne kisline (topili: bidestilirana voda, raztopina 70 % etanola)

0,125 ml redčenega Folin Ciocalteujevega reagenta

0,125 ml raztopine 20 % raztopine Na₂CO₃

0,55 ml bidestilirane vode

Eppendorfove epruvete nato premešamo in pustimo v temi za 40 minut. V primeru, da je raztopina motna, jo nato centrifugiramo pri 13000 RCF (Relative Centrifugal Force) za deset minut. Nato raztopini pomerimo absorbanco pri 765 nm proti slepemu vzorcu.

Slepemu vzorcu namesto razredčene raztopine galne kisline na začetku odmerimo 0,2 ml bidestilirane vode ali raztopine 70 % etanola.

3.4.1.2 FOLIN CIOCALTEUJEVA METODA

Ko imamo umeritveno krivuljo pripravljeno, lahko opravimo Folin Ciocalteujsko metodo še z raztopljenimi liofiliziranimi ekstrakti čebulnih listov in določimo skupne fenolne spojine. Pri tem v Eppendorf epruvete odmerimo reagente po enakem zaporedju kot pri pripravi vzorcev za umeritveno krivuljo, s tem da namesto razredčene raztopine galne kisline dodamo ustrezno razredčen vzorec liofiliziranega čebulnega ekstrakta. Vodni ekstrakt, ki je bil pridobljen s stresanjem, raztopimo v 5 ml bidestilirane vode in nato 10 x redčimo. Vodni ekstrakt, pridobljen z ultrazvokom, raztopimo v 10 ml bidestilirane vode in nato 10 x redčimo. Obe vrsti etanolnih čebulnih ekstraktov raztopimo v 10 ml 70 % etanola in nato 100 x redčimo. Eppendorf epruvete ravno tako pustimo za 40 minut v temi, raztopljene vzorce v njih centrifugiramo in pomerimo absorbanco pri 765 nm proti slepemu vzorcu. Skupne fenolne spojine izrazimo kot ekvivalent mase galne kisline, preračunane v ekstraktu oz. prahu čebulnih listov.



Slika 11: Spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453)

3.5 RANCIMAT TEST

Rancimat test je priznana metoda določanja oksidativne stabilnosti različnih lipidnih sistemov. Posredno omogoča raziskave učinka dodanih spojin oz. izvlečkov z antioksidativnim delovanjem na napredovanje oksidacije v lipidnih sistemih. Rancimat test je elektrokemijska metoda, ki temelji na spremembah elektrolitske prevodnosti vodne raztopine, v katero uvajamo maščobne kisline, ki so nastale kot posledica oksidativnega procesa v lipidnem sistemu (Abramovič, 2011).

3.5.1 POGOJI DELOVANJA RANCIMATA

Rancimat je pri naših poskusih deloval pri temperaturi 120 °C in ob zračnem toku 20 l/h. Največji čas merjenja je bil nastavljen na 30 ur.

3.5.2 POSTOPEK

V oljčno olje dodamo čebulni ekstrakt tako, da je v olju 2,5 mg ekvivalenta galne kisline/ ml olja. Suspenzijo nato premešamo, damo v ultrazvočno kopel in stresamo, da se ekstrakt raztopi v oljčnem olju. Zatem vzorec centrifugiramo 10 min pri 3800 RPM, da ekstrakt, ki se ne raztopi, obleži na dnu. Nato odpipetiramo 3 mL oljčnega olja z ekstraktom v epruveto, ki jo vstavimo v rancimat. Vanj vstavimo tudi čašo s 60 mL bidestilirane vode.

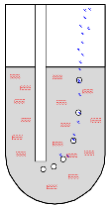
Oksidativno stabilnost oljčnega olja smo merili tudi z dodatkom zmletih čebulnih listov. V 15 mL plastično epruveto smo dodali 1,3 g listov (količina skupnih fenolnih spojin je 2,5 mg ekvivalenta galne kisline/ ml olja), v 50 mL epruveto pa smo dodali 2,25 g listov, obema dodali 10 mL oljčnega olja, kar je pomenilo, da je bila vrednost skupnih fenolnih spojin 4,3 mg ekvivalenta galne kisline/ ml olja. Vse skupaj smo premešali in pustili čez noč. Naslednji dan smo vzorce olja z dodanim prahom čebulnih listov centrifugirali 10 min pri 4000 obratih/min. 3 ml olja z dodatkom čebulnih listov smo odpipetirali v reakcijsko celico rancimata. V merilno celico smo dodali 60 ml bidestilirane vode.

3.5.3 SESTAVA IN DELOVANJE RANCIMATA

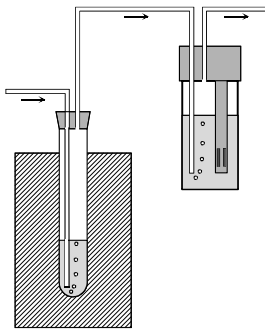
Rancimat sestavljata termostatsko kontroliran del in merilna celica, ki sta med seboj povezana s cevko, po kateri se pretakajo maščobne kisline. Maščobne kisline nastanejo pri oksidativni razgradnji lipidov, ki je v rancimatu ob stalnem dotoku kisika v lipidni sistem in ob visoki temperaturi veliko hitrejša. Tok zraka nato maščobne kisline potisne po cevki v merilno celico, ki vsebuje prevodno celico, potopljeno v bidestilirano vodo. Merilna celica meri prevodnost v vodni raztopini, saj se z disociacijo maščobnih kislin v bidestilirani vodi povečuje.



Slika 12: Rancimat (Metrohm, 743 Rancimat)



Slika 13: Nastanek maščobnih kislin v merilni celici (Loyall)



Slika 14: Reakcijska celica in merilna celica (Loyall)

4 REZULTATI

4.1 UČINKOVITOST EKSTRAKCIJE

Preglednica 2: Količina pridobljenega (volumen mokrega in masa suhega liofiliziranega) čebulnega ekstrakta ter učinkovitost ekstrakcije glede na vhodno maso suhih luskolistov.

Vrsta topila/način ekstrakcije	Volumen pridobljenega mokrega ekstrakta (mL)	Masa suhega ekstrakta (mg)	Masa čebulnih listov, iz katerih smo pridobili ekstrakt (g)	Delež suhega ekstrakta glede na maso suhe snovi (%)
voda/ stresanje	235	827	9,000	9,19
voda/ ultrazvok	240	776	9,000	8,62
70 % etanol/ stresanje	240	815	9,000	9,06
70 % etanol/ ultrazvok	244	1073	9,000	11,92

Na podlagi rezultatov v preglednici 2 lahko sklepamo, da je najbolj učinkovita ekstrakcija z uporabo 70 % etanola in ultrazvoka. Pri drugih načinih ekstrakcije ni videti opaznejših razlik.

4.2 DDPH· METODA

Sposobnost lovljenja radikala DDPH· in s tem antioksidativno učinkovitost ekstraktov čebulnih listov smo izrazili kot koncentracijo antioksidantov, ki je potrebna, da se začetna količina DDPH· radikala zmanjša za 50 %. Večja kot je EC50 v reakcijski mešanici, manj učinkovit je ekstrakt v lovljenju radikala DDPH· in ima tako manjšo antioksidativno učinkovitost.



Slika 15: Spremembe barve radikala DDPH· pri različnih razredčitvah ekstrakta

Na sliki 15 je kontrolni vzorec spodaj levo in slepi vzorec nad njim. Desno ležijo vzorci, v katerih sta radikal DPPH in raztopina vzorca pri različnih razredčitvah. Manj kot je vzorec razredčen, manj radikala DPPH je v njem in bolj se barva v PS (polistirenskih) kivetah spremeni iz vijolične v rumeno.

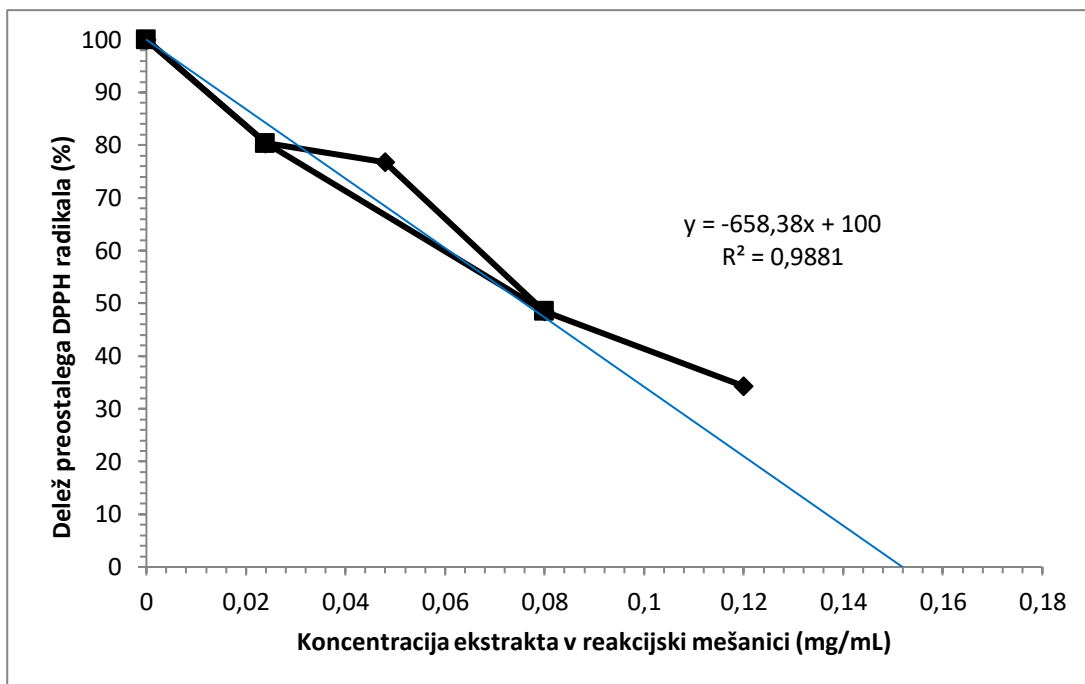
Delež začetne vrednosti radikala, ki so ga antioksidanti pretvorili v neaktivno obliko, izrazimo kot delež inhibicije in ga izrazimo iz naslednje zveze:

$$W_{inhDDPH} = [(A_{k\ 517\ (t=0)} - A_{vz\ 517\ (t=x)}) / A_{k\ 517\ (t=0)}] \times 100\%$$

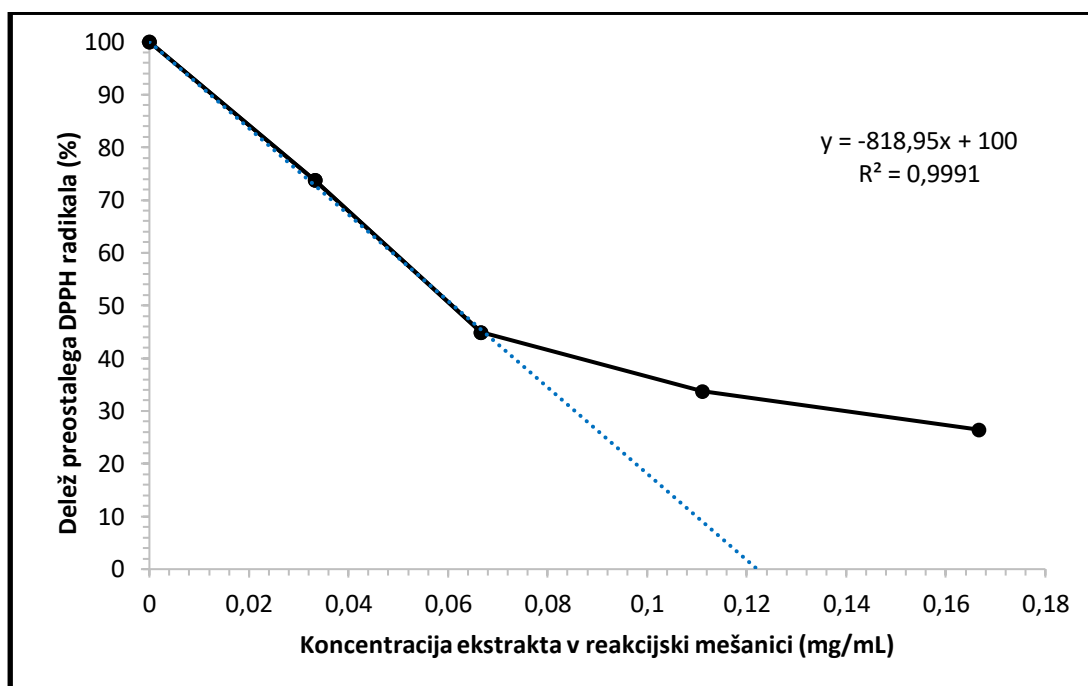
Delež začetne količine DDPH·, ki po določenem času ostane v reakcijski zmesi ($W_{preostale\ DDPH\cdot}$), pa izračunamo takole:

$$W_{preostale\ DDPH} = (A_{vz\ 517\ (t=x)} - A_{k\ 517\ (t=0)}) \times 100\%$$

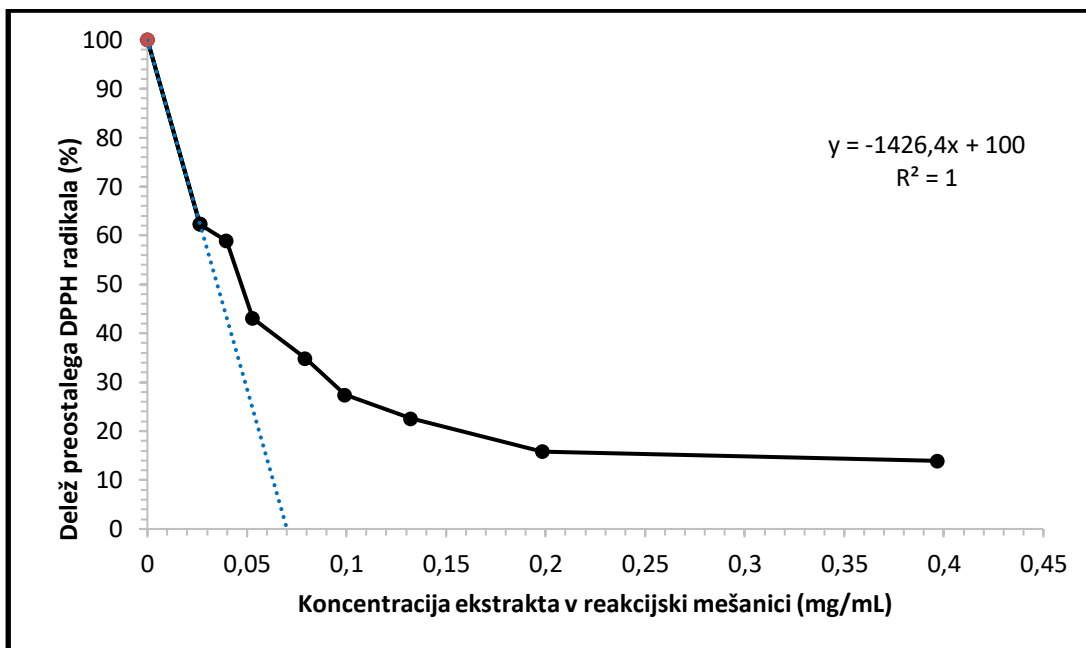
Pri tem v obeh enačbah $A_{vz\ 517\ (t=x)}$ predstavljata absorbanco vzorca pri valovni dolžini 517 nm ob času $t=x$ in $A_{k\ 517\ (t=0)}$ absorbanco kontrolnega vzorca pri valovni dolžini 517 nm ob času $t=0$.



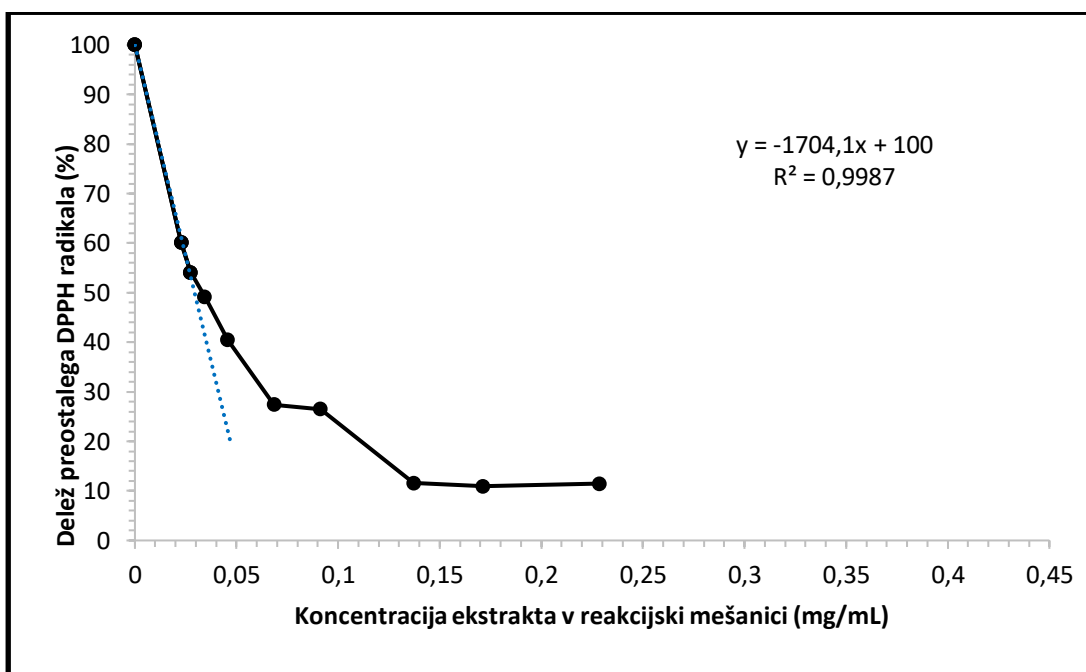
Slika 16: Antioksidativna učinkovitost vodnega čebulnega ekstrakta, pridobljenega s stresanjem



Slika 17: Antioksidativna učinkovitost vodnega čebulnega ekstrakta, pridobljenega z ultrazvokom



Slika 18: Antioksidativna učinkovitost etanolnega ekstrakta čebulnih listov, pridobljenega s stresanjem



Slika 19: Antioksidativna učinkovitost etanolnega ekstrakta čebulnih listov, pridobljenega z ultrazvokom

Iz grafov, ki prikazujejo delež preostalega DDPH· radikala v odvisnosti od koncentracije ekstrakta v reakcijski mešanici, lahko izračunamo EC50 ekstraktov v reakcijski mešanici po naslednji formuli:

$$EC_{50 \text{ DDPH}} = -50 \% / k$$

(k predstavlja naklon premice na grafu)

EC50 ekstrakta v raztopini pomeni, da moramo k 2,9 ml 0,1 mM raztopini radikala DDPH· dodati 0,1ml raztopine ekstrakta s koncentracijo EC50, da se bo začetna koncentracija radikala DDPH· zmanjšala za 50 %.

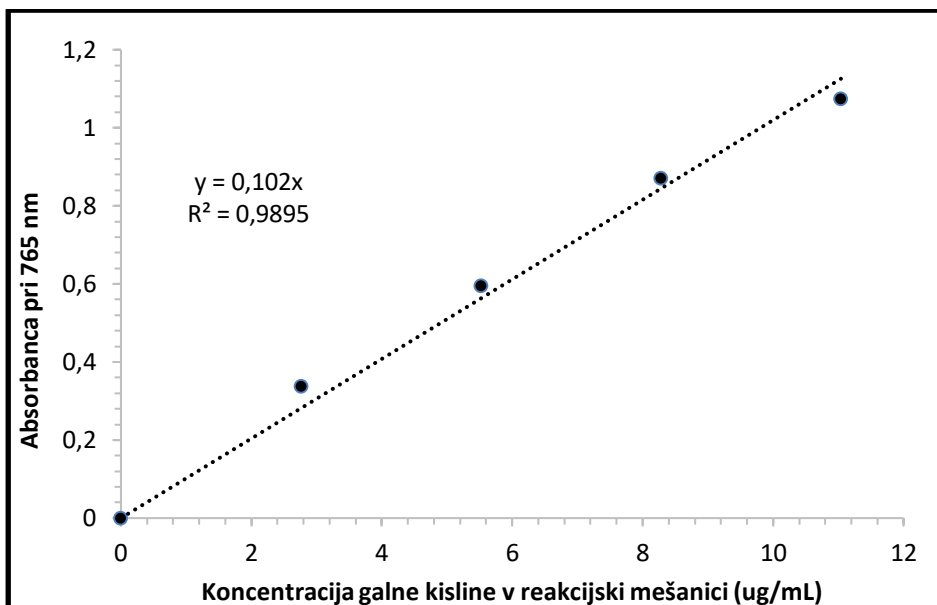
Preglednica 3: EC50

Vrsta ekstrakta	EC50 ekstrakta v reakcijski mešanici (mg/ml)	EC50 ekstrakta v raztopini (mg/ml)
Čebula voda/ stresanje	0,076	2,28
Čebula voda/ ultrazvok	0,061	1,83
Čebula etanol/ stresanje	0,035	1,05
Čebula etanol/ ultrazvok	0,029	0,88

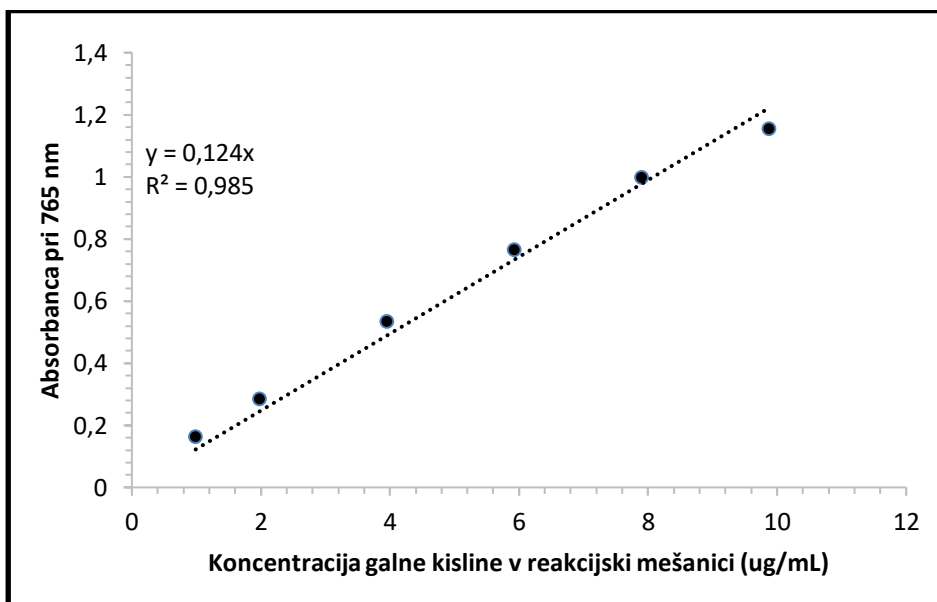
Iz tabele je razvidno, da ima ekstrakcija, pri kateri smo kot topilo uporabili 70 % etanol, ki je manj polarno topilo kot bidestilirana voda, več kot dvakrat manjši EC50 in ima zato bistveno višjo antioksidativno učinkovitost. Ravno tako ima ekstrakcija ob pomoči ultrazvoka za približno 20 % manjši EC50 kot ekstrakcija s stresanjem in ima tako višjo antioksidativno učinkovitost.

4.3 FOLIN CIOCLATEUJEVA METODA

A₇₆₅ narašča premosorazmerno s koncentracijo antioksidantov. Ravno tako velja to tudi za galno kislino. Graf absorbance pri valovni dolžini 765 nm v odvisnosti od koncentracije galne kisline nam pri določanju koncentracije skupnih fenolnih spojin predstavlja t.i. umeritveno krivuljo.



Slika 20: Umeritvena krivulja v vodnih raztopinah



Slika 21: Umeritvena krivulja v etanolnih raztopinah

Iz absorbance vzorca pri 765 nm in iz smernega koeficienta premice umeritvene krivulje nato izračunamo koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi.

$$V_{r.zm} = A_{765} / k$$

Iz koncentracije fenolnih spojin nato izračunamo koncentracijo fenolnih spojin v razredčenem vzorcu po naslednjem principu:

$$V_{raz.v} = (V_{r.zm} \times V_{r.zm}) / V$$

Pri tem znaša $\gamma_{\text{raz.v}}$ koncentracijo v razredčenem vzorcu $V_{\text{r.zm}}$ volumen reakcijske zmesi, ki je pri opisanem postopku 1 ml, V pa znaša prostornino ustrezno razredčenega vzorca, ki je pri postopku enaka 0,2 ml.

Da dobimo koncentracijo fenolnih spojin v nerazredčeni raztopini, uporabimo naslednjo formulo:

$$\gamma = \gamma_{\text{raz.v}} \times \text{razredčitev vzorca, ki je v reakcijski mešanici}$$

Nato pomnožimo masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin s prostornino topila v vzorcu, da dobimo maso skupnih fenolnih spojin. Rezultat delimo s 1000 in nato še z maso ekstrakta, da dobimo ekvivalent mase galne kisline v mg na mg ekstrakta.

Preglednica 4: Masa galne kisline na maso ekstrakta

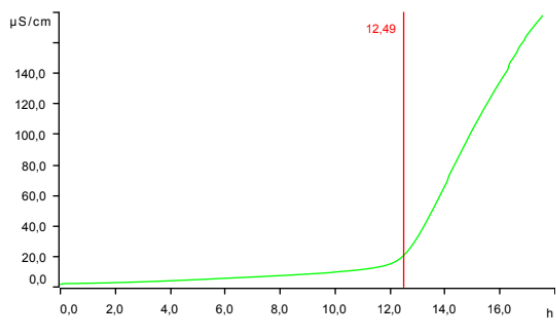
Vzorec	Masa galne kisline v mg na mg ekstrakta
Čebula voda stresanje	0.169 ± 0.004
Čebula voda ultrazvok	0.183 ± 0.004
Čebula etanol stresanje	0.253 ± 0.004
Čebula etanol ultrazvok	0.248 ± 0.007

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je vsebnost fenolnih spojin večja pri etanolnih ekstraktih kot pri vodnih ekstraktih, kar je bilo pričakovati, saj se fenolne spojine bolje topijo v organskih topilih kot v vodi. Način ekstrakcije pri etanolnih ekstraktih ne vpliva na koncentracijo fenolnih spojin, medtem ko je pri vodnih ekstraktih večja vsebnost fenolnih spojin pri ekstraktih, pridobljenih z ultrazvokom kot pri tistih, ki so bili pridobljeni s stresanjem.

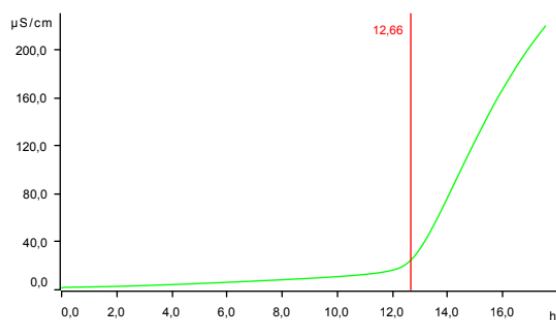
4.4 RANCIMAT METODA

Pri rancimat metodi rancimat izriše graf prevodnost v odvisnosti od časa. Hkrati izmeri tudi čas, pri katerem se električna prevodnost začne povečevati, saj začnejo nastajati maščobne kisline, ki delujejo kot prevodnik v merilni celici. Čas, pri katerem se električna prevodnost povečuje zelo počasi, imenujemo inkubacijski čas. Daljši kot je čas, večjo oksidativno stabilnost ima olje.

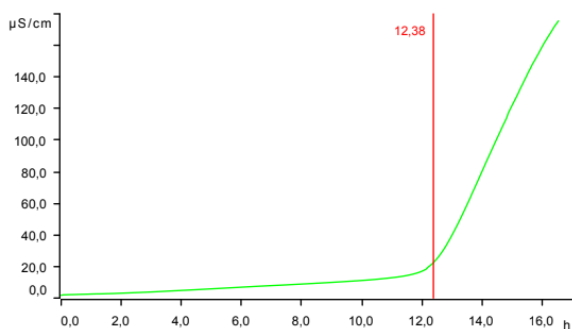
Pri rancimat metodi smo iz grafov izrazili čas indukcije. Če je čas indukcije oljčnega olja z dodatkom čebulnih listov ali ekstraktov večji, kot je pri kontroli (samo oljčno olje), to pomeni, da ima tako oljčno olje večjo oksidativno stabilnost, če pa je čas indukcije manjši kot pri kontroli, pa ima olje manjšo oksidativno stabilnost kot kontrola.



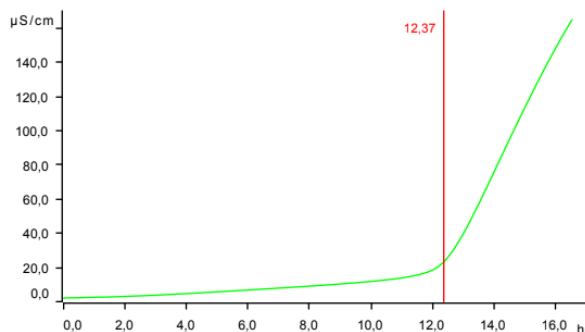
Slika 22: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 1



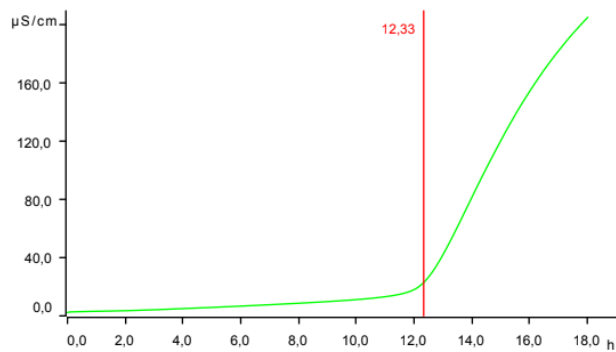
Slika 23: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 2



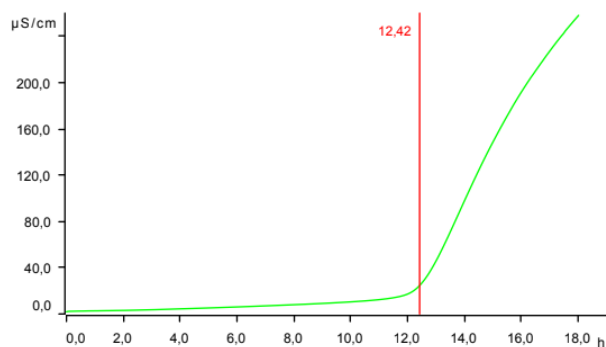
Slika 24: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 3



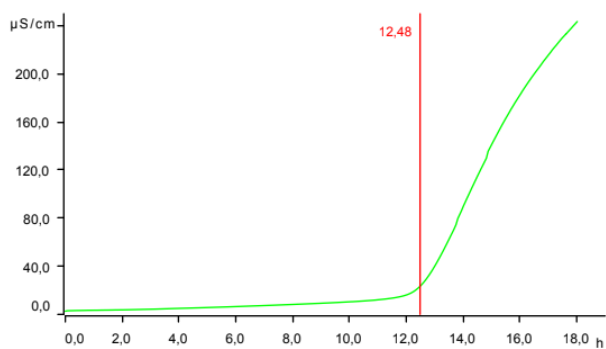
Slika 25: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 4



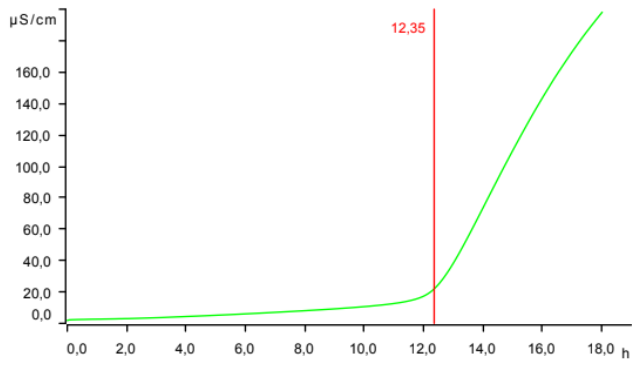
Slika 26: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 5



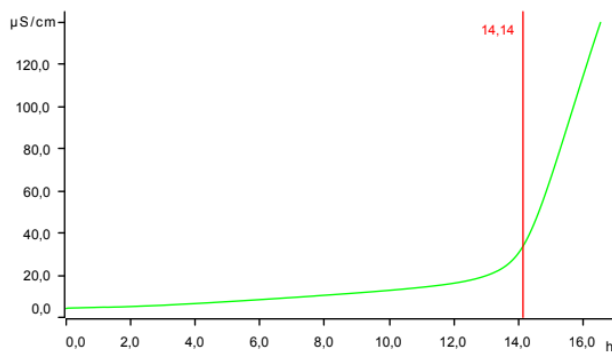
Slika 27: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja – kontrola 6



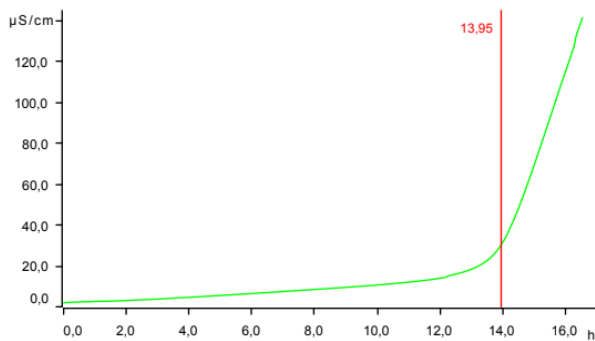
Slika 28: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim s stresanjem iz čebulnih listov – A



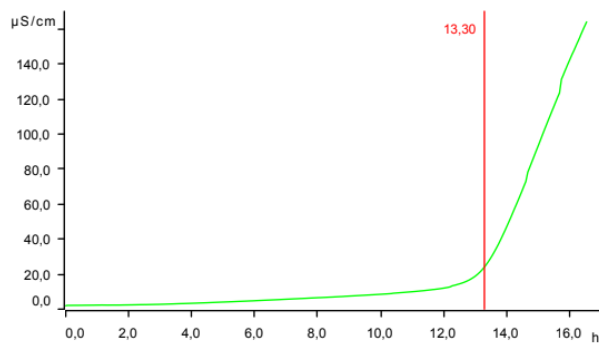
Slika 29: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim s stresanjem iz čebulnih listov – B



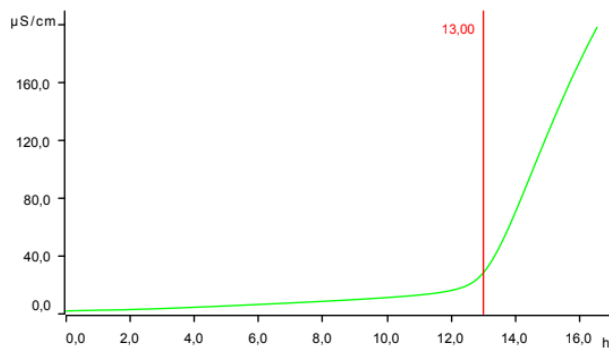
Slika 30: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno ekstrakcijo iz čebulnih listov – A



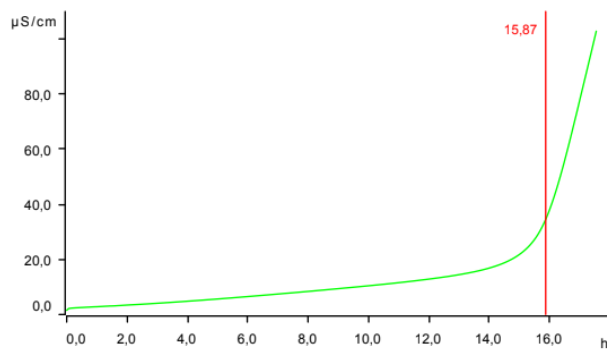
Slika 31: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno ekstrakcijo iz čebulnih listov – B



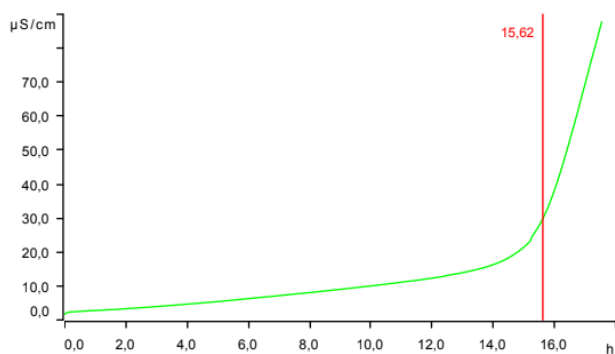
Slika 32: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim etanolnim ekstraktom, pridobljenim s stresanjem iz čebulnih listov – A



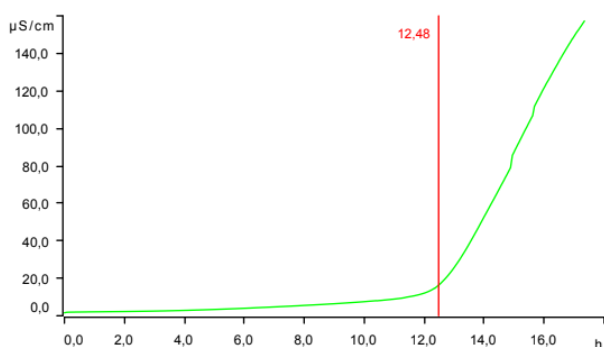
Slika 33: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim vodnim ekstraktom, pridobljenim s stresanjem iz čebulnih listov – B



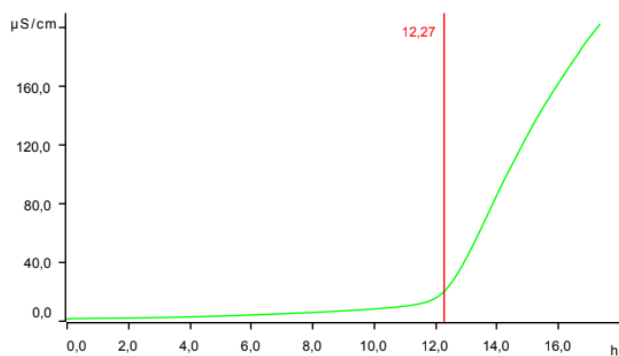
Slika 34: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim etanolnim ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno ekstrakcijo iz čebulnih listov – A



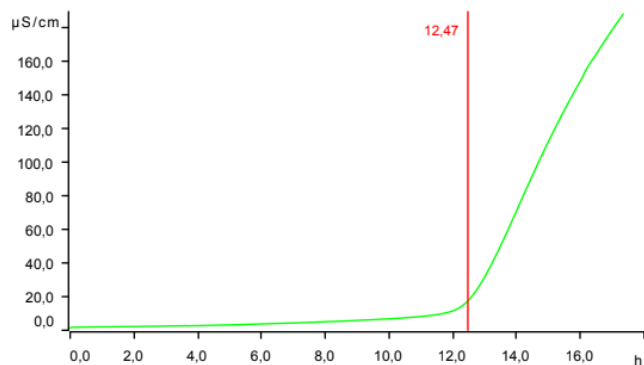
Slika 35: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanim etanolnim ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno ekstrakcijo iz čebulnih listov – B



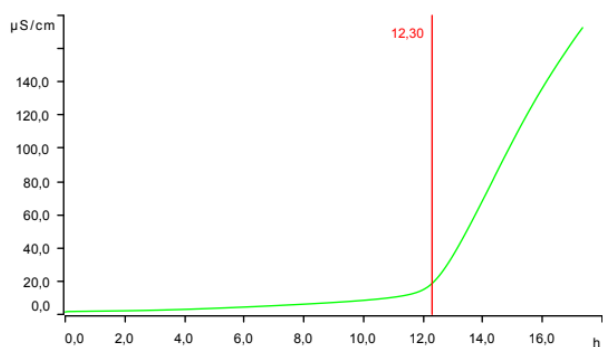
Slika 36: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanimi prahom iz suhih čebulnih listov s količino skupnih fenolnih spojin 2,5 mg/ mL olja – A



Slika 37: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanimi prahom iz suhih čebulnih listov s količino skupnih fenolnih spojin 2,5 mg/ mL olja – B



Slika 38: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanimi prahom iz suhih čebulnih listov s količino skupnih fenolnih spojin 4,3 mg/ mL olja – A



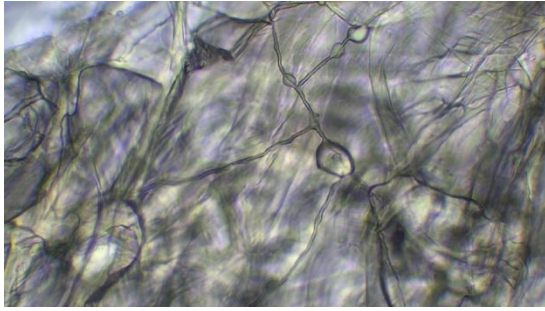
Slika 39: Analiza oksidativne stabilnosti oljčnega olja z dodanimi prahom iz suhih čebulnih listov s količino skupnih fenolnih spojin 4,3 mg/ mL olja – B

Preglednica 5: Oksidativna stabilnost oljčnega olja in oljčnega olja s čebulnimi ekstrakti in čebulnimi listi

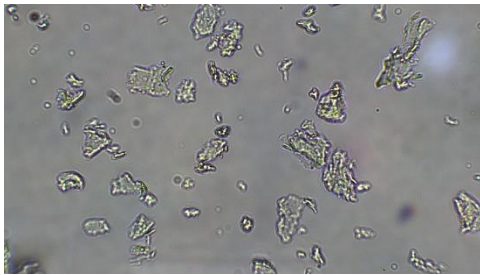
Vrsta vzorca	Čas indukcije vzorca A	Čas indukcije vzorca B	Povprečni čas indukcije	Povprečni čas indukcije kontrole	Razlika
Čebulni ekstrakt voda/stresanje	12,48 h	12,38 h	12,43 h	12,47 h	-0,04 h
Čebulni ekstrakt voda/ultrazvok	14,14 h	13,95 h	14,05h	12,47 h	1,58 h
Čebulni ekstrakt etanol/stresanje	13,30 h	13,00 h	13,15 h	12,47 h	0,68 h
Čebulni ekstrakt etanol/ultrazvok	15,87 h	15,62 h	15,75 h	12,47 h	3,28 h
Čebulni listi 130 mg/ml olja	12,48 h	12,27 h	12,38 h	12,47 h	-0,09 h
Čebulni listi 225 mg/ml olja	12,47 h	12,30 h	12,39 h	12,47 h	-0,08 h

Iz preglednice 5 je razvidno, da ima oljčno olje, ki mu je bil dodan ekstrakt, pridobljen z etanolom in z ultrazvokom, najvišji indukcijski čas in s tem največjo oksidativno stabilnost, saj je čas indukcije za več kot tri ure daljši kot pri kontroli. Sledita mu vpliv ekstrakta čebulnih listov, pridobljen z vodo in ultrazvokom, (približno 1,5 ure) in ekstrakt čebulnih listov, pridobljen z etanolom in s stresanjem (približno 0,7 ure). Čebulni ekstrakt, pridobljen z vodo in s stresanjem in čebulni listi, dodani v oljčno olje, so imeli nižji indukcijski čas od kontrole.

Glede na to, da smo količino ekstraktov in listov pripravili tako, da je bila koncentracija skupnih fenolnih spojin enaka v vseh vzorcih, lahko sklepamo, da z različnimi topili in različnimi načini ekstrakcije, ekstrahiramo različno učinkovite antioksidante. Ultrazvok je očitno bolj učinkovit s stališča zelene ekstrakcije antioksidantov, ki podaljšujejo oksidativno stabilnost oljčnega olja. To pa je tudi v skladu z določeno antioksidativno učinkovitostjo ekstraktov.

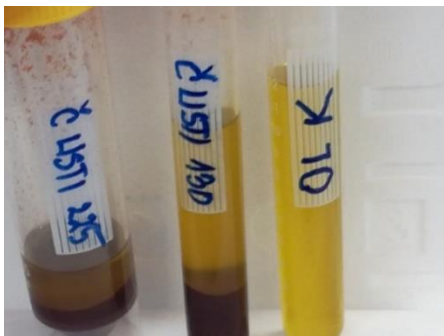


Slika 40: Čebulni listi 400 x povečava

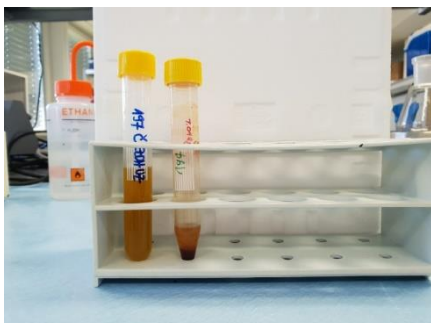


Slika 41: Čebulni prah 400 x povečava

Oljčno olje z dodatkom čebulnega prahu ni podaljšalo oksidativne stabilnosti oljčnega olja, kar pomeni, da je bilo samo mletje čebulnih listov neučinkovito. Iz tega lahko sklepamo, da mletje čebulnih listov v krogljčnem mlinu ni v zadostni meri poškodovalo celice čebulnih listov (Sliki 40 in 41).



Slika 42: Oljčno olje s čebulnimi listi



Slika 43: Oljčno olje s čebulnim ekstraktom

Barva oljčnega olja z dodanimi ekstrakti postane bolj rdečkasta (Slika 43) v primerjavi z oljčnim oljem brez dodanih ekstraktov, oljčnemu olju z dodanimi čebulnimi listi pa se barva ni spremenila (Slika 42). Vonj je bil tako pri oljčnem olju, ki smo mu dodali ekstrakte, kot tudi pri oljčnem olju, ki smo mu dodali čebulne liste, enak kot pri oljčnem olju brez dodatkov. Okus pri oljčnem olju s čebulnimi ekstrakti je bil pikanten in rahlo sladkega okusa, a je še vedno prevladoval okus po oljčnem olju. Okus oljčnega olja z dodanimi čebulnimi listi je bil le malenkost bolj pikanten kot oljčno olje brez dodatkov.

5 RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi smo se osredotočili na vpliv na oksidativno stabilnost oljčnega olja iz ekstraktov, pridobljenih iz luskolistov rumene čebule, za katere je dokazano, da vsebujejo fenolne spojine. V ta namen smo iz čebulnih luskolistov pridobili ekstrakte in jim določili antioksidativno učinkovitost ter skupne fenole spojine. Na koncu smo preverili, ali ima oljčno olje z dodanimi ekstrakti in prahom iz čebulnih luskolistov posledično izboljšano oksidativno stabilnost in spremenjene senzorične lastnosti.

Izkazalo se je, da ima oljčno olje z dodatkom liofiliziranega ekstrakta čebulnih spojin tako pri etanolnih ekstraktih, ki smo jih pridobili z ultrazvokom in s stresanjem, kot pri vodnih ekstraktih, ki smo jih pridobili z ultrazvokom, večjo oksidativno stabilnost v primerjavi s kontrolnim vzorcem oljčnega olja. Pri vodnih čebulnih ekstraktih, ki smo jih pridobili s stresanjem, ni bilo opazne razlike v primerjavi s čistim oljčnim oljem. Tako lahko prvo hipotezo, ki pravi, da so suhi liofilizirani čebulni ekstrakti učinkovitejši pri ohranjanju oksidativne stabilnosti oljčnega olja, potrdimo. To, da liofilizirani ekstrakti, pridobljeni s stresanjem v vodi, niso imeli nobenega učinka na oksidativno stabilnost oljčnega olja, lahko razložimo s tem, da je antioksidativna učinkovitost ekstrakta manjša od antioksidativne učinkovitosti drugih ekstraktov in da je bila vsebnost skupnih fenolnih spojin manjša kot pri drugih ekstraktih. Oljčno olje je že v osnovi bogato z antioksidanti. Le-ti učinkovito upočasnjujejo oksidacijo in s tem omogočajo, da je v primerjavi z drugimi rastlinskimi olji oljčno olje zelo stabilno. Zato je bila lahko antioksidativna učinkovitost spojin v oljčnem olju višja od antioksidativne učinkovitosti dodanega ekstrakta. Takšen ekstrakt bi lahko v prihodnje preizkusili z uporabo drugih olj z nižjo stabilnostjo.

V raziskavo smo vključili tudi zmlete čebulne luskoliste, za katere se je izkazalo, da oljčnemu olju ne zvišajo oksidativne stabilnosti. To pomeni, da prostega kvercetina, ki je shranjen v suhih čebulnih luskolistih, ne moremo pridobiti zgolj z namakanjem v olju. To potrjuje dejstvo, da se prosti kvercetin ne nahaja v medceličnici, ampak v celici.

Drugo hipotezo lahko potrdimo, saj imajo čebulni ekstrakti, pridobljeni z etanolom, večjo antioksidativno učinkovitost kot čebulni ekstrakti pridobljeni z vodo. To pomeni, da se je v etanolu raztopilo več polifenolnih spojin, tudi kvercetina, ki je v glavni meri odgovoren za antioksidativno učinkovitost čebule. Prav tako so imeli ekstrakti, pridobljeni z ultrazvokom, večjo antioksidativno učinkovitost kot ekstrakti, ki smo jih pridobili samo s stresanjem.

Tretjo hipotezo, ki pravi, da bodo čebulni ekstrakti, ki smo jih pridobili s pomočjo ultrazvočnih valov, vsebovali več skupnih fenolnih spojin kot čebulni ekstrakti, ki smo jih pridobili s stresanjem, lahko le delno potrdimo. Več fenolnih spojin je bilo opaznih le pri čebulnih ekstraktih, pri katerih smo kot topilo uporabili vodo. Pri čebulnih ekstraktih, pri katerih smo uporabili etanol, ni bilo videti razlike v vsebnosti fenolnih

spojin med ekstrakti, pridobljenimi z ultrazvokom in ekstrakti, pridobljenimi s stresanjem. To pomeni, da so bile v suhem liofiliziranem ekstraktu čebule etanol/stresanje prisotne tudi druge reducirajoče fenolne spojine, ki ne vplivajo na antioksidativno učinkovitost. To je razvidno na rezultatih večje antioksidativne učinkovitosti čebulnega ekstrakta etanol/ultrazvok v primerjavi s čebulnim ekstraktom etanol/stresanje.

Oljčno olje ima prevladujoč vonj po zelenem in okus po sadežnem, grenkem in pikantnem. Oljčno olje, ki smo mu dodali liofiliziran čebulni ekstrakt, ni imelo nobene razlike v vonju, barva je bila rdečkasta, okus je bil pikanten z noto rahlo sladkega okusa, pri čemer je še vedno prevladoval okus oljčnega olja, medtem ko olje z dodatkom čebulnih listov ni imelo razlike ne v vonju in ne v barvi, okus pa je bil rahlo pikanten. Sklepamo lahko, da se senzorične lastnosti oljčnega olja ob dodatku čebulnega ekstrakta in čebulnih listov niso nič poslabšale, saj so vse našete spremembe v okusu pozitivne značilnosti oljčnega olja, ki je višje kakovosti. Tako oljčno olje z dodatkom čebulnih ekstraktov in oljčno olje z dodatkom čebulnih listov nista imela slabših senzoričnih lastnosti, kot jih sicer ima oljčno olje, kar smo predpostavili v četrti hipotezi.

Pri oljčnem olju, ki smo mu dodali liofilizirane čebulne ekstrakte, se je barva spremenila iz rumeno-zelene v rdečkasto-rjavo, pri oljčnem olju, ki smo mu dodali suhe čebulne liste, pa se barva samega oljčnega olja ni spremenila. Tu je potrebno izpostaviti, da se pri senzoričnem ocenjevanju ne preverja barve, saj se oljčna olja, pridobljena iz različnih sort oljke po barvi precej razlikujejo med seboj. To prav tako pomeni, da potrošnik, ki bi dobil oljčno olje z dodatkom liofiliziranih čebulnih ekstraktov, nima razloga za skrb, saj drugačna barva olja ne pomeni, da je le-to žarko, ampak to, da gre za oljčno olje z dodanimi ekstrakti, ki podaljšujejo njegovo stabilnost.

6 ZAKLJUČEK

V raziskovalni nalogi smo se osredotočili na preverjanje učinkovitosti ekstrakcije fenolnih spojin iz suhih čebulnih luskolistov z ultrazvokom in ekstrakcije s stresanjem, pri čemer smo uporabljali topilo bidestilirano vodo in 70 % etanol. Pri različnih ekstraktih smo preverjali antioksidativno učinkovitost in skupno vrednost fenolnih spojin, na koncu pa smo še izmerili njihov vpliv na oksidativno stabilnost oljčnega olja. Kot najučinkovitejša se je izkazala ekstrakcija čebulnih luskolistov z ultrazvokom, pri čemer smo kot topilo uporabili 70 % etanol. Učinkovita sta bila tudi ekstrakt čebulnih luskolistov, pridobljen v vodi z ultrazvokom, in ekstrakt čebulnih luskolistov, pridobljen v etanolu s stresanjem, medtem ko se je ekstrakt, pridobljen v vodi s stresanjem, izkazal za manj učinkovitega.

Da bi lahko bolje razumeli in uporabljali zelene ekstrakcije, predlagamo dodatne raziskave na tem področju. Na suhih čebulnih luskolistih bi lahko preizkusili še druge načine zelene ekstrakcije, kot so npr. superkritična ekstrakcija tekočin, ekstrakcija s tekočino pod tlakom, ekstrakcija s pomočjo mikrovalovnega sevanja in ekstrakcija s pomočjo impulzivnega električnega polja. Z njimi lahko izoliramo rastlinske fenolne spojine z namenom, da bi ugotovili, kateri način ekstrakcije iz rastlinskega materiala je najbolj primeren za njihovo izolacijo.

Prikazali smo, da ima odpadni material, ki ostaja pri predelavi čebule, visoko antioksidativno učinkovitost in je kot tak primeren za uporabo v novih funkcionalnih živilih, bodisi kot funkcionalni dodatek bodisi kot sredstvo za podaljševanje njihove obstojnosti. Na ta način ta odvečni material koristno uporabimo in prispevamo k ekonomiki proizvodnje pridelkov in živil na eni strani ter trajnostnem razvoju na drugi. Podaljševanje obstojnosti s pripravljenimi ekstrakti smo prikazali na primeru oljčnega olja in dosegli podaljšanje obstojnosti, ki prevedeno iz eksperimentalnih pogojev v praksi pomeni okvirno podaljšan rok trajanja od enega do štirih mesecev glede na uporabljen vzorec.

7 VIRI

- [1] Abramovič H. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti: Učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu bioznanosti. 2011. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo. ISBN: 978-961-6333-92-4.
- [2] Bešter E. Oksidacijska stabilnost oljčnih olj slovenske istre: doktorska disertacija. 2007. Ljubljana. Univerza v Ljubljani: Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dd_bester_erika.pdf.
- [3] Bromberger Sokuetta M, de Marsillac Terra L in Peixoto Bastos C. Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA-Journal of food*, 2018, št. 16. ISSN: 1947-6337.
- [4] Bučar-Miklavčič M. et al. 1997. Oljka in oljčno olje. Ljubljana: ČZD Kmečki glas. ISBN: 961-203-129-0.
- [5] Bučar-Miklavčič M. et al. 2015. ABC o senzoričnem zaznavanju: senzorično ocenjevanje oljčnega olja in namiznih oljk.
- [6] Can you compost onions? SFGATE. 2018. [23.2.2020]. <https://homeguides.sfgate.com/can-compost-onions-72087.html>
- [7] Dry onion skin has a use: Science daily.com. 19. julij 2011. [23.2.2020]. <https://www.sciencedaily.com/releases/2011/07/110714073348.htm>
- [8] Ekstrakcija. 4. Februar 2018. [3.3.2020]. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Ekstrakcija>
- [9] Emmett S. Adding value to onion waste. *New agriculturalist on-line*. 1. november 2003. [23.2.2020]. <http://www.new-ag.info/03-6/focuson/focuson4.html>
- [10] Gois Ruivo da Silva M. Optimization of quercetin extraction from onion skin: Determination of antioxidant capacity and anti-diabetic activity. 2019. Universidade de Lisboa.
- [11] Hui H.Y. *Encyclopedia of food science and technology*, Volume 3. 1992. New York: Wiley-Interscience. ISBN: 047-150-799-7.
- [12] Iris F.F.B, Siu-Wai C. Antioxidants in Food: Content, Measurement, Significance, Action, Cautions, Caveats, and Research Needs. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2014, št. 71. ISSN: 1043-4526.
- [13] Krese M. 2001. Oljka in njeno olje. Maribor: Mladinska knjiga. ISBN: 86-11-16083-5.
- [14] Loyall U. Stability measuring Instruments: 743 Rancimat. Metrohm Ltd.
- [15] Medved E. 2015. Potvorbe oljčnega olja, diplomski seminar. Ljubljana: Univerza v Ljubljani: Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo.

- [16] Ostrowska-Ligeza E. et al. Kinetics of commercial olive oil oxidation: Dynamic differential scanning calorimetry and Rancimat studies. *European Journal Lipid Science Technology*, Februar 2010, 268-274. ISSN: 1438-9312.
- [17] Quercetin. Wikipedia. 2. Februar 2020. [21.2.2020]. <https://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>
- [18] Sancin V. 1990. Velika knjiga o oljki. Trst: Založništvo tržaškega tiska.
- [19] Štrumbelj E. 2019. Vsebnost kvercetina v rdeči, rumeni in beli čebuli (*Allium cepa* L.): diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani: Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo.
- [20] Tanase C, Cosarcă S in Muntean D.L. A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *mdpi.com*. 26. marec 2019. [28.2.2020] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6470986/>
- [21] Veber S. 2017. Tehnologija oljčnega olja včasih in danes: diplomski seminar. Ljubljana: Univerza v Ljubljani: Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo.
- [22] Vesel V. et al. 2009. Oljka: živilo, zdravilo, lepotilo. Ljubljana: ČZD Kmečki glas. ISBN: 978-961-203-360-6.
- [23] Yadav A. et al. Antioxidants and its functions in human body - A Review. *Research Environmental Life Sciences*, Avgust 2016, 1328-1331. ISSN: 0974-4908
- [24] Žitnik K. Vpliv izbranih parametrov pri cvrenju čebule na kakovost končnega izdelka: diplomska naloga. 2007. Maribor: Živilska šola Maribor: Višja strokovna šola.