



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Kaja HRIBAR

**SKUPNE FENOLNE SPOJINE IN
ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTA
KIMCHIJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Kaja HRIBAR

**SKUPNE FENOLNE SPOJINE IN ANTIOKSIDATIVNA
UČINKOVITOST EKSTRAKTA KIMCHIJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

**ANALYSIS OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS AND
ANTIOXIDANT ACTIVITY IN KIMCHI EXTRACTS**

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija 1. stopnje Živilstvo in prehrana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo, univerzitetni študijski program prve stopnje Živilstvo in prehrana je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Leo Pogačnik in za recenzentko doc. dr. Petro Terpinc.

Mentorica: izr. prof. dr. Lea POGAČNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: doc. dr. Petra TERPINC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentorica:

Recenzentka:

Datum zagovora:

Kaja Hribar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 579.67+663/664:547.56:543.2(043)=163.6
KG	fermentirana živila/kimchi/sok iz kimchija/ekstrakt iz kimchija/fenolne spojine/ antioksidanti/antioksidativna učinkovitost/analizne metode/Folin–Ciocalteu/DPPH
AV	HRIBAR, Kaja
SA	POGAČNIK, Lea (mentorica)/TERPINC, Petra (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2017
IN	SKUPNE FENOLNE SPOJINE IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTA KIMCHIJA
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
OP	VIII, 23 str., 1 pregl., 8 sl., 11 vir.
IJ	sl
Jl	sl
AI	Kimchi je tradicionalna fermentirana jed, ki izvira iz Koreje. Namen diplomskega dela je bilo pripraviti domači kimchi in ga primerjati s kupljenim. Tako iz kupljenega kot domačega kimchija smo želeli pripraviti vzorce soka in ekstrakte odcejenega kimchija ter v njih določiti skupne fenolne spojine in antioksidativno učinkovitost (AOU). V raziskavi smo uporabili pakirani korejski kimchi baechu znamke Chongga in kimchi, ki smo ga pripravili sami, in sicer s sedemdnevno in tridnevno fermentacijo ter sveži nefermentirani kimchi. V pripravljenih vzorcih soka in ekstrakta kimchija smo pred opravljanjem analiz določili vrednost pH z uporabo pH lističev. Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo v vzorcih domačega in kupljenega kimchija določili spektrofotometrično z uporabo Folin–Ciocalteujevega reagenta in rezultate analize izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline. AOU soka in ekstrakta kimchija smo določili z metodo lovljenja radikala DPPH• in rezultate analize podali kot ekvivalent troloksa. Najvišjo AOU smo določili v vzorcu domačega kimchija, ki smo ga pustili fermentirati tri dni (0,22 mg/g v soku in 0,38 mg/g v ekstraktu), in v vzorcu kupljenega kimchija (0,24 mg/g v vzorcu soka in 0,44 mg/g v ekstraktu). Ta dva vzorca sta se tudi najbolj približala v literaturi opisani optimalni vrednosti pH 4,2. Povprečna vrednost skupnih fenolnih spojin v vzorcih soka domačega kimchija znaša 0,27 mg/g, v ekstraktu pa 0,33 mg/g. V soku kupljenega kimchija je vsebnost 0,53 mg/g, v ekstraktu pa 0,42 mg/g. Iz opravljene raziskave lahko sklepamo, da čas fermentacije in vrednost pH, ki jo živilo doseže, vplivata na vsebnost fenolnih spojin in AOU.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1
DC UDC 579.67+663/664:547.56:543.2(043)=163.6
CX fermented foods/kimchi/kimchi juice/kimchi extracts/total phenolic compounds/
antioxidants/antioxidant activity/analytic methods /Folin–Ciocalteu/DPPH
AU HRIBAR, Kaja
AA POGAČNIK, Lea (supervisor)/TERPINC, Petra (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2017
TI ANALYSIS OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY IN KIMCHI EXTRACTS
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
NO VII, 23 p., 1 tab., 8 fig., 11 ref.
LA sl
Al sl/en
AB Kimchi is a traditional Korean fermented vegetable containing several ingredients.
The purpose of this thesis was to compare homemade nonfermented fresh kimchi as
well as kimchi fermented for seven and three days with store-bought kimchi by
determining antioxidant activity (AOU) and the total phenolic content in kimchi
juice and extracts. In our research, we used beachu kimchi by brand Chongga as
well as kimchi made at home from locally bought ingredients. We measured the pH
value of our samples with the use of pH paper. Total phenolic content of extracts
was determined spectrophotometrically according to Folin–Ciocalteu method, the
results of the analysis were expressed as an equivalent of the chlorogenic acid.
AOU was evaluated using DPPH• radical scavenging method. AOU was expressed
as trolox equivalent. The highest AOU was determined in homemade kimchi that
was left to ferment for three days (0,22 mg/g in juice and 0,38 mg/g in extract) as
well as in the store-bought kimchi (0,24 mg/g in juice and 0,44 mg/g in extract).
The pH values of these samples were close to the optimum pH value reported
elsewhere (pH 4,2). The average total phenolic compounds in homemade kimchi
juice was 0,27 mg/g and in in extracts 0,33 mg/g. The total phenolic compounds in
store-bought kimchi juice was 0,53 mg/g and in extract 0,42 mg/g. From our
research it can be concluded that fermentation duration and the pH value of kimchi
affects the total phenolic content and antioxidant activity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
1. 1 NAMEN DELA	1
1. 2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KIMCHI.....	3
2.2 RADIKALI	4
2.3 ANTIOKSIDANTI	5
2.4 FENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI V ŽIVILIH.....	7
3 MATERIAL IN METODE DE LA	8
3.1 MATERIALI	8
3.1.1 Priprava kimchija.....	8
3.1.2 Reagenti	8
3.2 METODE.....	8
3.2.1 Priprava vzorca soka kimchija.....	8
3.2.2 Priprava ekstraktov kimchija	8
3.2.3 Določitev vrednosti pH vzorcev soka in ekstraktov kimchija	9
3.2.4 Določitev koncentracije vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin–Ciocalteujevo metodo	9
3.2.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti (AOU) z metodo lovljenja radikala DPPH•.....	11
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	15
4. 1 VREDNOST pH.....	15
4. 2 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	15
4. 3 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST KIMCHIJA	17
5 SKLEPI	20
6 POVZETEK	21
7 VIRI	22

KAZALO SLIK

Slika 1: Kimchi (Lee, 2014)	3
Slika 2: Strukturna formula radikala DPPH• (Brand-Williams in sod., 1995).....	5
Slika 3: Umeritvena krivulja za določitev skupnih fenolnih spojin	10
Slika 4: Umeritvena krivulja za določitev antioksidativne učinkovitosti (AOU)	13
Slika 5: Vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg/g) v vzorcih soka in ekstraktov domačega in kupljenega kimchija; domači vzorec kimchija fermentiran 7 dni (D7), domači vzorec kimchija fermentiran 3 dni (D3), domači sveži vzorec kimchija brez fermentacije (D0), kupljeni vzorec kimchija (K).....	16
Slika 6: Vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg/g) v vzorcih soka in ekstraktov domačega in kupljenega kimchija; povprečna vsebnost fenolnih spojin (mg/g) domačih vzorcev kimchija (D), kupljeni vzorec kimchija (K)	17
Slika 7: Antioksidativna učinkovitost (AOU) (mg/g) vzorcev soka in ekstraktov domačega in kupljenega kimchija; domači vzorec kimchija fermentiran 7 dni (D7), domači vzorec kimchija fermentiran 3 dni (D3), domači sveži vzorec kimchija brez fermentacije (D0), kupljeni vzorec kimchija (K).....	18
Slika 8: Antioksidativna učinkovitost (AOU) (mg/g) vzorcev soka in ekstraktov domačega in kupljenega kimchija; domači vzorci kimchija (D), kupljeni vzorec kimchija (K).....	19

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Okvirne vrednosti pH vzorcev soka in ekstraktov kimchija.....	15
--	----

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AOU	antioksidativna učinkovitost
c	molarna koncentracija
DPPH•	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
D7	domači vzorec kimchija, fermentiranega 7 dni
D3	domači vzorec kimchija, fermentiranega 3 dni
D0	domači sveži vzorec kimchija brez fermentacije
K	kupljeni vzorec kimchija
k	naklon umeritvene krivulje
w	masni delež

1 UVOD

Pred prihodom modernih tehnologij ohranjanja živil (npr. hlajenje, uporaba modificirane atmosfere in zmrzovanje) je bil proces fermentacije za ohranjanje živil rastlinskega izvora ključnega pomena. Ljudje uživajo fermentirana živila že vrsto let, metoda pa najverjetneje izvira iz Azije. Uživanje fermentiranih rastlinskih proizvodov je ljudem v severnih državah, kjer pridelki ne uspevajo skozi celo leto, omogočilo celoletni dostop do potrebnih vitaminov (npr. vitamin C), mineralov in prehranskih vlaknin. Dandanes je v Aziji korejsko živilo kimchi eno najbolj prepoznavnih in priljubljenih fermentiranih živil (Fan in Hansen, 2012).

Kronične in degenerativne bolezni, kot so kardiovaskularne bolezni, arterioskleroza, diabetes ter Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, so v veliki meri posledica oksidativnega stresa. Pri oksidativnih procesih pride do neravnovesja v organizmu zaradi tvorbe reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin (Kim in sod., 2014). Nastanek spojin v procesu oksidativnih sprememb tako ne povzroča zgolj poslabšanja senzorične in prehranske vrednosti v živilu, temveč tudi tvorbo za organizem strupenih spojin. Antioksidanti, prisotni v živilih, delujejo na številne dejavnike, kot so radikali, reaktivne kisikove zvrsti in kovinski ioni tako, da jih pretvorijo v manj reaktivne oblike in odstranjujejo iz organizma (Abramovič, 2011).

Količina prisotnih antioksidantov v izbranem živilu je odvisna predvsem od izbrane vrste rastline, kombinacije le-teh, vsebnosti antioksidantov v njih ter postopkov njene predelave. Škodljivi dejavniki, s katerimi se srečujemo v življenju, predstavljajo manjšo nevarnost ob ustrezni prehrani, dovolj bogati z antioksidanti in uravnoteženi tudi glede elementov v sledovih, ki so temeljnega pomena pri endogeni izgradnji antioksidantov (Kreft in sod., 2000).

Kimchi je živilo, bogato z vitamini, minerali in prehransko vlaknino. Za optimalno zorjen kimchi je značilna visoka vsebnost vitaminov skupine B, mlečnokislinskih bakterij in fenolnih spojin, ki delujejo v našem organizmu antioksidativno (Kim in sod., 2014).

1. 1 NAMEN DELA

V okviru diplomskega dela smo želeli pripraviti domači kimchi in ga primerjali s kupljenim. Tako iz kupljenega kot domačega kimchija smo želeli pripraviti vzorce soka in ekstrakta ter v njih določili skupne fenolne spojine in antioksidativno učinkovitost.

1. 2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da se bo vsebnost skupnih fenolov in antioksidativna učinkovitost vzorcev soka in ekstraktov odcejenega kimchija, pripravljenih iz domačega in kupljenega kimchija, med seboj razlikovala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KIMCHI



Slika 1: Kimchi (Lee, 2014)

Kimchi, prikazan na sliki 1, je tradicionalna fermentirana jed, ki izvira iz Koreje. Izraz 'Baechu' označuje najosnovnejšo tradicionalno različico kimchija, pri pripravi katerega kot sestavina prevladuje kitajsko zelje. Pri pripravi osnovnega kimchija baechu tako kot glavno sestavino uporabimo kitajsko zelje v kombinaciji z raznolikimi pomožnimi sestavinami, kot so ingver, azijska redkev daikon, fermentirana ribja omaka in korejski čili v prahu, ki daje živilu značilen pikanten okus in aromo (Fan in Hansen, 2012).

Ločimo številne postopke priprave kimchija, ki se med seboj razlikujejo glede na uporabo sestavin in glede na način priprave (domača ali industrijska proizvodnja). V Koreji je pri izdelavi kimchija za skoraj vsako regijo značilen svojevrsten postopek priprave in kombinacije sestavin. Na regijsko raznovrstnost vplivajo med drugim tudi vremenski pogoji in posledično razlika v kakovosti pridelka. Ocenjuje se, da je v Koreji kar preko 190 različnih vrst kimchija. V splošnem velja, da je kimchi najbolj okusen ne glede na sestavine, če fermentira dva do tri tedne pri temperaturi med 3 °C in 7 °C, ko doseže vrednost pH 4,2 in je vsebnost titrabilnih kislin med 0,6 % do 0,8 % (Fan in Hansen, 2012).

Princip priprave kimchija temelji na predpripravi zelenjave, vlaganju kitajskega zelja v slanico, združitvi vseh sestavin ter fermentaciji. Priprava kimchija Baechu se začne s predpripravo glavne sestavine kitajskega zelja, ki ga narežemo na kocke, debeline 3 do 5 cm, ki jih nato potopimo v slanico za 2 do 7 ur, na koncu pa speremo pod tekočo vodo in odcedimo. V ločeno posodo sesekljamo česen in ingver, dodamo narezano zeleno čebulo ter korejski čili v prahu in fermentirano ribjo omako, na koncu dodamo predhodno v

slanici pripravljeno in odcejeno kitajsko zelje. Tako pripravljeno mešanico nato prenesemo v posodo, primerno za fermentacijo, in pustimo do 3 tedne pri temperaturi od 2 °C do 10 °C, ali pa pustimo, da živilo fermentira do 3 dni pri sobni temperaturi. Po končani fermentaciji hranimo kimchi pri temperaturi hladilnika od 0 °C do 8 °C. Kimchi je živilo, ki ga po končani pripravi lahko uživamo na katerikoli stopnji fermentacije. Jed se navadno postreže hladna kot priloga (Fan in Hansen, 2012).

Do procesa fermentacije pride predvsem zaradi naravno prisotnih kvasovk in mlečnokislinskih bakterij. Na začetku fermentacije kimchija je aktivna predvsem anaerobna bakterija *Leuconostoc mesenteroides*, ki se od preostalih mlečnokislinskih bakterij razlikuje po sposobnosti delovanja kljub visoki koncentraciji soli ali sladkorja. V živilu se zaradi heterofermentativnega delovanja metabolizma bakterije *Leuconostoc mesenteroides* poveča vsebnost CO₂ in koncentracija kislin ter posledično zniža vrednost pH kimchija, kar prepreči rast drugih nezaželenih mikroorganizmov. Sproščeni CO₂ zamenja prisotni kisik ter ustvarja anaerobne pogoje, ki so nujni za nadaljnjo delovanje laktobacilov. Zmanjšana vsebnost kisika prav tako preprečuje procese oksidacije in pripomore k ohranjanju barve živila ter stabilizaciji naravno prisotne askorbinske kisline (vitamina C). Ko se vrednost pH kimchija zniža pod 4,9, bakterija *Leuconostoc mesenteroides* preneha delovati in v ospredje pridejo druge mlečnokislinske bakterije, kot so *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus Brevis*, *Pediococcus cerevisiae* in *Lactobacillus Plantarum* (Fan in Hansen, 2012).

Pomembni dejavniki, ki vplivajo na fermentacijo kimchija, so predvsem raznolikost naravno prisotnih mikroorganizmov, koncentracija soli v živilu, fermentabilni ogljikovi hidrati ter druga prisotna hranila, prisotnost inhibitornih dejavnikov in kisika ter vrednost pH in temperatura. Pomembno pa vpliva na pravilen potek fermentacije kimchija tudi vlaganje kitajskega zelja v slanico, saj pride do izločanja vode in hranil zaradi osmotskega tlaka. Z vlaganjem v slanico zatremo delovanje nezaželenih bakterij, ki bi kasneje lahko povzročale kvar, ter hkrati ustvarimo ugodne pogoje za delovanje želenih mlečnokislinskih bakterij (Fan in Hansen, 2012).

2.2 RADIKALI

Orbitale skoraj vseh stabilnih molekul zasedata po dva elektrona. Kot radikale označujemo tiste atome, ione, molekule ali dele molekul, za katere velja, da imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron, to pomeni da se elektron v orbitali nahaja sam. Tvorba radikalov poteka s procesom homolitske cepitve kovalentne enojne vezi, gre za visokoenergetsko potraten proces, kjer iz spojine AB nastaneta radikala A• in B•. Proces lahko prikažemo z enačbo:

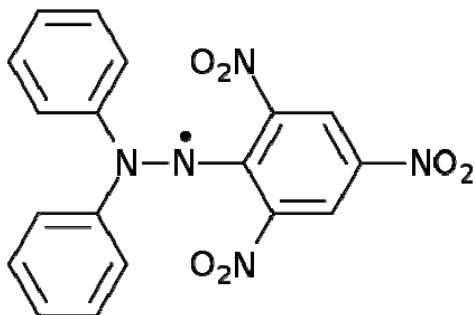


Na nastanek radikalov vplivajo dejavniki, kot so toplota, svetloba in ionizacijsko sevanje. Radikali pa lahko nastanejo tudi pri reakciji med radikalom $A\bullet$ in stabilno spojino B, pri čemer preide prvotni radikal v neradikalno obliko in se tvori nov radikal $B\bullet$:



V procesu verižne radicalske reakcije v sosledju ponavljajočih se dogodkov tako nastanek enega radikala privede do nastanka naslednjega radikala. Kot zvrst veljajo radikali za precej reaktivne, saj težijo k stabilnem stanju molekule ter posledično zaradi svoje kemijske nespecifičnosti hitro reagirajo z večino drugih ustreznih molekul v okolici. V bioloških sistemih radikali tako reagirajo z večino molekul, kot so lipidi, proteini, DNA in ogljikovi hidrati. Radikalna pretvorba različnih molekul v bioloških sistemih pa pogosto vodi v oblike spojin, ki so navadno nezaželene (Abramovič, 2011).

Molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, poznana tudi kot DPPH•, prikazana na sliki 2, je stabilen radikal, ki nastane pri premestitvi prostega elektrona preko celotne molekule. Delokalizacija prostega radikala se kaže v temno vijoličnem obarvanju z absorpcijskim maksimumom v območju 520 nm. Pogosto se uporablja za določanje antioksidativne učinkovitosti vzorcev (Molyneux, 2003).



Slika 2: Strukturna formula radikala DPPH• (Brand-Williams in sod., 1995)

2.3 ANTIOKSIDANTI

V živilstvu označujemo antioksidante kot tiste spojine, ki sestavljajo živilo in delujejo kot lovilci prostih radikalov, lahko tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa delujejo kot reducenti in zmanjšajo ali v celoti preprečijo pojav oksidativnih sprememb v živilu. Antioksidanti tako preprečujejo pojav žarkosti ali druge oksidativne spremembe, ki se odražajo v spremembi senzoričnih ter prehranskih lastnosti živila. V prehranskem smislu antioksidanti predstavljajo snovi z endogenim in eksogenim delovanjem v našem telesu in delujejo kot zaščita pred negativnim delovanjem prostih radikalov, kovinskih ionov in raznih drugih

snovi, ki delujejo v našem telesu oksidativno (Vidrih in Kač, 2000). Antioksidanti so strukturno precej raznolika skupina snovi. Zaradi lažje predstave in sistematičnosti jih zato razvrščamo glede na izvor, strukturo, fizikalno-kemijske lastnosti ter glede na mehanizem delovanja in po možnosti regeneracije. Vse snovi, ki jih opredeljujemo kot antioksidante, so v prvi vrsti reducenti, saj v reakcijah z radikali ali oksidanti nudijo vodikov atom ali elektron. Cilj vsake reakcije antioksidantov je pretvorba reaktivnega radikala ali oksidanta v manj reaktivni radikal ali nereaktivni produkt. Pri reakciji med spojino z antioksidativnim delovanjem in radikalom vedno sledi nastanek stabilnega radikala, ki v večini primerov ni več sposoben reakcij oksidacije. Med antioksidante uvrščamo tudi kelatorje, ki imajo sposobnost koordinativne vezave bakrovih in železovih kovinskih ionov ter tako preprečitve katalize radikalske reakcije (Pečar in Mravljak, 2015).

Antioksidativni učinek je odvisen od vrste antioksidanta, mehanizma njegovega delovanja, sodelovanja z drugimi prisotnimi antioksidanti ter v primeru vnosa zunanjih antioksidantov tudi od sposobnosti absorpcije v prebavilih, količine odmerka le-tega, pogostosti vnosa v telo in njegovega izločanja (Pečar in Mravljak, 2015).

Po izvoru so spojine z antioksidativnim delovanjem lahko naravno prisotne ali pa sintetične. Antioksidanti, ki so si lahko strukturno različni, imajo kljub temu pogosto podoben mehanizem delovanja, nekateri učinkujejo tudi preko različnih mehanizmov. Lahko delujejo z neposredno reakcijo z reaktivnimi radikalskimi zvrstmi ali pa posredno upočasnijo oz. popolnoma preprečijo njihov nastanek, pri tem se antioksidativne molekule pretvarjajo v oblike, ki še vedno delujejo antioksidativno ali pa ne. Glede na učinek delovanja jih tako opredelimo kot primarne in sekundarne antioksidante (Abramovič, 2011).

Med antioksidante, ki so v živilih lahko naravno prisotni, možna pa je tudi umetna sinteza, uvrščamo predvsem tokoferole ter askorbinsko in citronsko kislino z derivati. Med sintetične antioksidante, ki jih pridobivamo zgolj s kemijsko sintezo, uvrščamo estre galne kisline, terciarni butiliran hidroksikinon (TBHQ), butiliran hidroksitoulén (BHT), butiliran hidroksianizol (BHA) ter eritrobinsko kislino (Abramovič, 2011).

Primarni antioksidanti učinkovito sodelujejo v reakcijah lovljenja radikalov, mednje uvrščamo spojine, ki vsebujejo hidroksilno skupino (fenolne spojine), sulfhidrilno skupino (cistein, glutation) ali amino skupino (sečna kislina, proteini, spermin). Med primarne antioksidante prištevamo tudi askorbinsko kislino in provitamin β -karoten. Za spojine, ki jih uvrščamo med sekundarne antioksidante, velja, da same radikalov ne pretvarjajo v stabilnejše spojine, delujejo posredno in s tem zmanjšajo učinek prooksidantov. S sinergističnim delovanjem povečajo učinek primarnih oksidantov. V skupino sekundarnih antioksidantov s sposobnostjo vezave kovinskih ionov v komplekse uvrščamo EDTA, vinsko in citronsko kislino, fosforjevo(V) in fitinsko kislino in nekatere polifosfate,

fosfolipide, aminokisline, peptide, proteine in flavonoide. V skupino sekundarnih antioksidantov, ki delujejo kot lovilci prostega kisika pa uvrščamo askorbinsko kislino, askorbil palmitat, β -karoten in sulfite (Abramovič, 2011).

2.4 FENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI V ŽIVILIH

Fenolne spojine so strukturno zelo raznolika skupina spojin, ki učinkujejo antioksidativno in se v rastlinah tvorijo kot sekundarni metaboliti. Njihova prisotnost je pogoj za normalno delovanje celice, saj sodelujejo pri vzdrževanju osnovnih življenjskih funkcij. Za rastline so pomembne zlasti pri procesu rasti in razmnoževanja, pri obrambi pred škodljivimi mikroorganizmi in zajedalci, hkrati pa nudijo zaščito pred zunanjimi stresnimi dejavniki. Fenolne spojine vsebujejo vsaj en aromatski obroč, na katerem je vezana ena ali več hidroksilnih spojin (Kočevar Glavač, 2013).

Fenolne spojine lahko razvrstimo na enostavne fenole ali benzokinone, fenolne kisline, naftokinone, ksantone, stilbene, flavonoide, lignane, biflavonoide, lignine, kumarine in kondenzirane tanine. V prehranskem smislu imajo najpomembnejšo vlogo fenolne kisline, flavonoidi in tanini (Abramovič, 2011).

Fenolne kisline imajo enostavno zgradbo, na aromatski obroč je lahko posredno preko hidroksicimetne skupine ali pa neposredno preko hidroksibenzojske skupine vezana karboksilna skupina. Daleč največjo skupino med fenolnimi spojinami predstavljajo flavonoidi, slednje razdelimo na flavane, flavanone, flavanole, katehine, izoflavanone, flavone, flavonole, izoflavone, halkone in antocianidine. Fenolne kisline in flavonoidi se manj pogosto nahajajo v prosti obliki in so običajno povezani s sladkornimi enotami v glikozide. Fenolne skupine se s hidroksikarboksilnimi kislinami in monosaharidi povezujejo v estre, lahko tvorijo tudi vezi z alkoholi, amini in flavonoidi. Tanini so skupina fenolnih spojin z relativno visoko molsko maso, in jih delimo na hidrolizabilne in kondenzirane tanine (Abramovič, 2011).

Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin se odraža v sposobnosti lovljenja prostih radikalov, redoks potencialu in vezavi kovinskih kompleksov v stabilne komplekse. Ločimo dva mehanizma reakcij fenolnih spojin z radikali. Mednje sodita reakcija preko prenosa vodikovega atoma in reakcija s prenosom elektrona. Na učinkovitost fenolnih spojin kot antioksidantov vplivajo dejavniki iz okolja in pogoji, v katerih snov deluje, ter prisotnost drugih antioksidantov v okolju. Poleg tega na antioksidativno učinkovitost vplivajo tudi dejavniki, ki se nanašajo na lastnosti antioksidanta, kot so strukturne lastnosti, intramolekulske vodikove vezi, sterične prepreke, redoks potencial, kislinsko-bazne lastnosti, interakcija s topilom, topnost in porazdelitvene lastnosti, hlapnost in toplotna stabilnost ter koncentracija, v kateri se antioksidant nahaja (Abramovič, 2011).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Priprava kimchija

V raziskavi smo uporabili predpakirani korejski kimchi baechu znamke Chongga in kimchi, ki smo ga pripravili sami. Pri pripravi domačih vzorcev kimchija baechu smo kot glavno sestavino uporabili predhodno v slanici vloženo kitajsko zelje, kateremu smo dodali sveže nastrgan ingver, česen, azijsko redkev daikon, por, mlado čebulo in pasto korejskega čilija. Prvi vzorec domačega kimchija je fermentiral sedem dni (D7) pri sobni temperaturi, drugi vzorec smo pustili fermentirati tri dni (D3) pri sobni temperaturi, tretji vzorec pa je bil sveže pripravljen kimchi (D0), brez fermentacije. Vse sestavine za pripravo kimchija smo kupili na Ljubljanski tržnici. Pri pripravi smo uporabili korejsko čili pasto znamke CJ Haechandle. Po končani fermentaciji so bili vzorci in sok kimchija zamrznjeni in shranjeni pri temperaturi - 20 °C.

3.1.2 Reagenti

Pri delu smo uporabili analitsko čiste reagente podjetja Merck, Sigma in Fluka. Za pripravo raztopin smo uporabili bidestilirano vodo. Reagenti, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu, so navedeni pri opisu posamezne eksperimentalne metode.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorca soka kimchija

V centrifugirke smo odpipetirali po 1,5 mL soka in ga 5 minut centrifugirali pri 25.230×g. Supernatant smo prenesli v nove centrifugirke. Zaradi večje motnosti smo vzorec soka kupljenega kimchija tudi mikrofiltrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm. Tako pripravljene vzorce smo uporabili v nadaljnjih analizah.

3.2.2 Priprava ekstraktov kimchija

V plastične 50 mL epruvete smo zatehtali po 10 g odcejenega kimchija in vzorcem dodali po 20 mL 2 % (v/v) očetne kisline. 2 % očetne kisline smo pripravili tako, da smo 2 mL očetne kisline (Merck, Nemčija) odpipetirali v 100 mL merilno bučko in razredčili z destilirano vodo do oznake. Vzorec smo nato najprej ekstrahirali z rotor-stator homogenizatorjem Ultra-Turrax, nato ostanek prefiltrirali skozi dvojno plast gaze ter 1,5 mL vzorca prenesli v centrifugirke in ga 5 minut centrifugirali pri 25.230×g. Supernatant smo prenesli v nove centrifugirke in tako pripravljene vzorce uporabili v nadaljnjih analizah.

3.2.3 Določitev vrednosti pH vzorcev soka in ekstraktov kimchija

V vzorcih soka in ekstraktov kimchija smo pred opravljanjem analiz določili vrednost pH z uporabo pH lističev in priložene barvne primerjalne tabele seta za določanje okvirne vrednosti pH znamke Macherey-Nagel.

3.2.4 Določitev koncentracije vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin–Ciocalteujevo metodo

Folin–Ciocalteujeva metoda je ena izmed tradicionalnih metod za določitev skupnih fenolnih spojin. Fenoksidni anion deluje kot donor elektrona, ta nastane v alkalnem okolju po deprotonaciji –OH skupine v molekuli fenolne spojine. Reducirana oblika kompleksa, ki povzroči modro obarvanje reakcijske zmesi, ima absorpcijski maksimum v območju 765 nm. Vsebnost reduciranega kompleksa določamo v analizi spektrofotometrično. Višja kot je vrednost izmerjene absorbance, boljša je redukcijska sposobnost preiskovanih antioksidantov (Abramovič, 2011).

Slabost uporabljene Folin–Ciocalteujeve metode pri določanju vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vzorcu temelji na dejstvu da Folin–Ciocalteujev reagent nespecifično reagira z vsemi fenolnimi –OH skupinami, vključno z aromatskimi aminokislinami ter drugimi reducirajočimi zvrstmi, med katere sodijo tudi askorbinska kislina, reducirajoči sladkorji in organske kisline (Abramovič, 2011).

Reagenti:

- Folin–Ciocalteujev reagent (Fluka, Nemčija)
- Na₂CO₃ (Merck, Nemčija)
- Etanol (Merck, Nemčija)
- Klorogenska kislina (Sigma – Aldrich, Nemčija)

Aparature:

- Spektrofotometer (Hewlett-Packard model HP-8453, ZDA)
- Vrtinčnik MS3 Basic (IKA, Nemčija)
- Tehnica (Mettler Tolerado AT201, Švica)
- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija; Galison, Francija)
- Ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52, Nemčija)
- Centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija)

Pribor:

- Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, steklene epruvete.

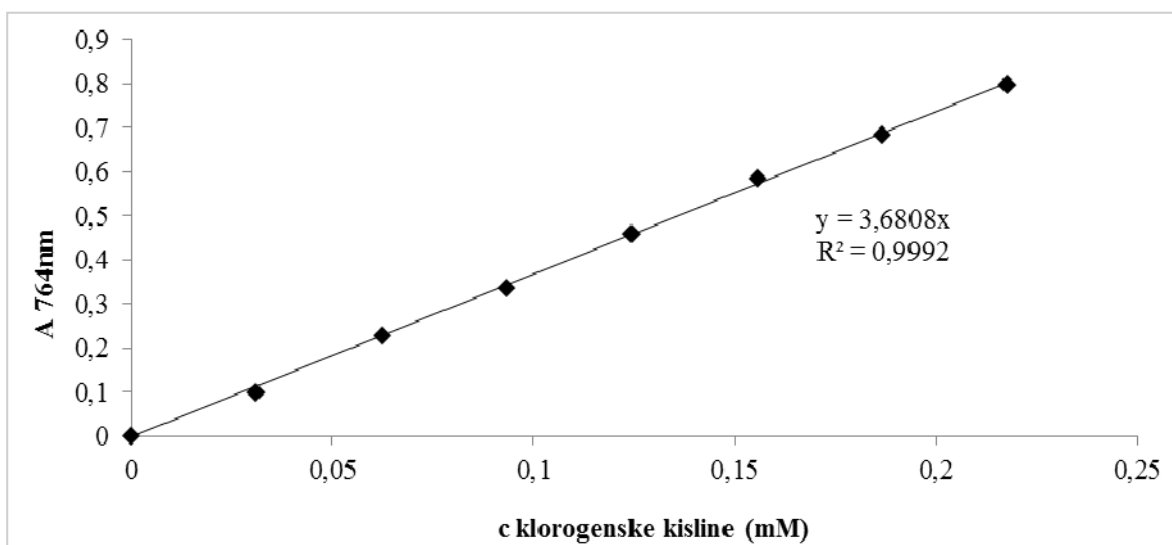
- Ostalo: merilec časa, aluminijasta folija, epice (Eppendorf, Nemčija; Starsted, Nemčija), plastične ladjice za tehtanje na analitski tehtnici, spatule, čopiči, nastavki za pipetiranje (Eppendorf, Nemčija; Gilson, Francija), rokavice, puhalka, kapalka.

Priprava raztopin:

- Raztopino 2 % (w/v) Na_2CO_3 smo pripravili tako, da smo v 10 mL bučko zatehtali 2 g Na_2CO_3 in jo dopolnili do oznake z bidestilirano vodo.
- Raztopino Folin–Ciocalteujevega reagenta smo pripravili tako, da smo Folin–Ciocaltejev reagent razredčili z vodo v razmerju 1:2, reagent je občutljiv na svetlobo zato smo ga shranili v temnem prostoru. Obstočnost reagenta je 1 dan.
- 0,9 mM raztopino klorogenske kisline, ki smo jo uporabili pri izdelavi umeritvene krivulje, smo pripravili tako, da smo v 25 mL bučko zatehtali 7,99 mg klorogenske kisline in z etanolom dopolnili do oznake.

Priprava umeritvene krivulje:

Pri pripravi umeritvene krivulje za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin–Ciocaltejevo metodo (slika 3) smo kot standardno raztopino uporabili klorogensko kislino. V centrifugirke smo odpipetirali od 25 μL do 175 μL standardne raztopine 0,9 mM klorogenske kisline in do končnega volumna 725 μL dodali raztopino 2 % oetne kisline ter dobro premešali. V tako pripravljene raztopine smo nato najprej dodali po 125 μL Folin–Ciocalteujevega reagenta, nato pa po 5 min še 125 μL raztopine 2 % Na_2CO_3 . Po točno 60 min inkubacije v temnem prostoru smo izmerili absorbanco pri 746 nm. Slepí vzorec smo pripravili brez standardne raztopine, k 725 μL 2 % oetne kisline smo dodali 125 μL Folin–Ciocalteujevega reagenta, nato pa po 5 min še 125 μL raztopine 2 % Na_2CO_3 ter nato postopali kot pri preostalih vzorcih. Vse meritve smo izvedli v dveh ponovitvah.



Slika 3: Umeritvena krivulja za določitev skupnih fenolnih spojin

Potek analize vzorcev:

V centrifugirke smo odpipetirali po 50 μL vzorca soka kimchija in 150 μL vzorca ekstrakta kimchija. Vsem smo do končnega volumna 725 μL dodali raztopino 2 % očetne kisline. K tako razredčenim vzorcem smo najprej dodali 125 μL Folin–Ciocalteujevega reagenta ter nato po 5 min še 125 μL raztopine 2 % Na_2CO_3 . Po točno 60 min inkubacije v temnem prostoru smo izmerili absorbanco pri 746 nm. Slepí vzorec smo pripravili enako kot pri pripravi umeritvene krivulje. Vse meritve smo izvedli v dveh ponovitvah.

Izračun:

Iz vrednosti absorbance, izmerjene pri 746 nm za preiskovani vzorec, in naklona premice umeritvene krivulje smo izračunali koncentracijo skupnih fenolnih spojin v reakcijski zmesi (c_{rz}). V vzorcu soka in ekstrakta (c_{vz}) smo izračunali koncentracijo skupnih fenolnih spojin z upoštevanjem redčitvenega faktorja:

$$c_{\text{rz}} = A_{746} / k \quad \dots (3)$$

$$c_{\text{vz}} = (c_{\text{rz}} \times V_{\text{rz}}) / V_{\text{vz}} \quad \dots (4)$$

k naklon umeritvene krivulje
 V_{rz} volumen reakcijske zmesi (725 μL)
 V_{vz} volumen razredčenega vzorca (50 μL vzorec soka, 150 μL vzorec ekstrakta)

Končni rezultat smo podali v obliki masnega deleža in vsebnost skupnih fenolnih spojin v kimchiju izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline:

$$w = (c_{\text{vz}} \times M_{\text{kk}}) / \rho \quad \dots (5)$$

w masni delež (mg/g)
 c_{vz} koncentracija skupnih fenolnih spojin v vzorcu soka ali vzorcu ekstrakta
 M_{kk} molska masa klorogenske kisline (354,31 g/mol)
 ρ gostota soka kimchija (1,00 g/mL)

Pri izračunu masnega deleža ekstrakta kimchija smo upoštevali še zatehto in količino dodanega ekstrakcijskega topila.

3.2.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti (AOU) z metodo lovljenja radikala DPPH•

Metodo lovljenja radikala DPPH• uvrščamo med najstarejše metode za določanje antioksidativne učinkovitosti preiskovanih snovi (Brand-Williams in sod., 1995).

Določanje AOU ekstrakta z metodo lovljenja radikala DPPH• temelji na reakciji med stabilnim radikalom 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom (DPPH•) in antioksidantom. Gre za reakcijo pri kateri antioksidant odda vodikov atom in spojina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom preide v nereaktivno obliko 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H). Delovanje antioksidantov na vsebnost radikala DPPH•, ki absorbira svetlobo pri valovni dolžini 517 nm, določimo spektrofotometrično. Merimo znižanje absorbance pri ustrezni valovni dolžini, ki je posledica spremembe barve vijolične v rumeno ob prehodu radikala DPPH• v stabilno obliko DPPH-H (Abramovič, 2011).

Rezultate analize in sposobnost antioksidantov za lovljenje radikala DPPH• navadno podajamo kot delež inhibicije radikala DPPH• ali kot delež začetne količine radikala DPPH•, ki po določenem času ostane v reakcijski zmesi. Rezultat lahko podamo tudi kot koncentracijo antioksidantov, ki je potrebna, da se začetna količina DPPH• zmanjša za 50 % ali kot čas, ki je potreben, da dosežemo 50 % znižanje začetne koncentracije količine DPPH•. Antioksidativna učinkovitost vzorca se lahko izrazi tudi kot ekvivalent standardnega antioksidanta (Abramovič, 2011), kar smo storili pri naši analizah.

Reagenti:

- 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH•) (Sigma, Nemčija)
- 99 % metanol (Merck, Nemčija)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil kromat -2-karboksilna kislina (Troloks) (Sigma, Nemčija)
- Ocetna kislina (Merck, Nemčija)

Aparature:

- Spektrofotometer (Hewlett-Packard model HP-8453, ZDA)
- Magnetno mešalo (IKA Werke RCT Basic, Nemčija)
- Vrtinčnik MS3 Basic (IKA, Nemčija)
- Tehnica (Mettler Tolerado AT201, Švica)
- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija; Galison, Francija)

Pribor:

- Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, merilni valj, lij, erlenmajerice.
- Ostalo: Merilec časa, aluminijasta folija, epice (Eppendorf, Nemčija; Starsted, Nemčija), plastične ladjice za tehtanje na analitski tehtnici, spatule, čopiči, nastavki za pipetiranje (Eppendorf, Nemčija; Gilson, Francija), rokavice, puhalka, kapalka.

Priprava raztopin:

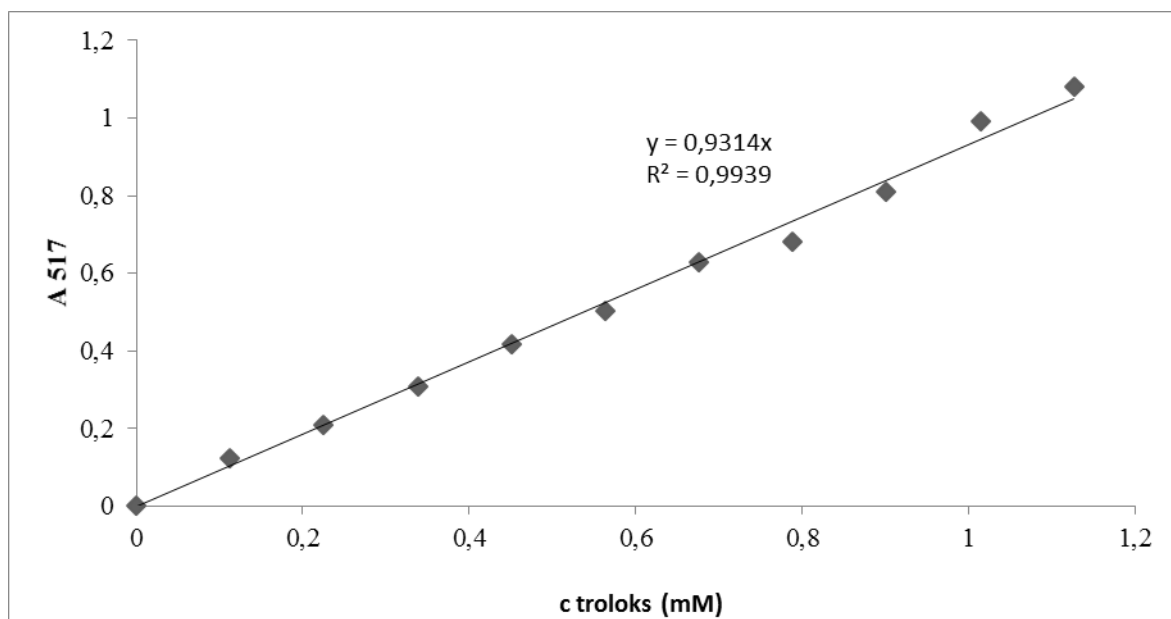
- 0,11 mM raztopino 2,2-difenil-1-pikril-hidrazila (DPPH•) smo pripravili tako, da smo 3,04 g radikala raztopili v 72 mL 99 % metanola in mešali na magnetnem mešalu 20 min. Med mešanjem smo čašo z raztopino radikala zaščitili pred

svetlobo z uporabo aluminijaste folije. Po končani pripravi smo raztopino shranili v temnem prostoru. Raztopino DPPH• smo zaradi neobstoynosti vedno pripravljali tik pred analizo .

- 2 % oetno kislino smo pripravili iz 2 mL oetne kisline (Merck, Nemčija), ki smo jih odpipetirali v 100 mL merilno bučko in razredčili z destilirano vodo do oznake.
- 1,13 mM raztopino troloksa, ki smo jo uporabili pri izdelavi umeritvene krivulje, smo pripravili tako, da smo 2,82 mg troloksa raztopili v 10 mL merilni bučki, ki smo jo do oznake dopolnili z 2 % oetno kislino.

Priprava umeritvene krivulje:

Pri pripravi umeritvene krivulje (slika 4) smo kot standard uporabili 1,13 mM raztopino troloksa. V centrifugirke smo odpipetirali od 5 do 50 µL standarda in dopolnili do končnega volumna 50 µL z 2 % raztopino oetne kisline. K tako pripravljenim raztopinam smo v centrifugirke dodali po 1 mL radikala DPPH•, jih zaprli in dobro premešali. Stojalo s centrifugirkami smo postavili v temen prostor in po 1 h izmerili absorbanco pri 517 nm. Slepí vzorec smo pripravili le z 50 µL 2 % raztopine oetne kisline brez dodatka standarda, dodali pa smo 1 mL radikala DPPH•. Vse meritve smo izvedli v dveh ponovitvah.



Slika 4: Umeritvena krivulja za določitev antioksidativne učinkovitosti (AOU)

Potek analize vzorcev:

Pri analizi smo pripravili vzorce za analizo soka kimchija, tako, da smo k 40 µL vzorca soka dodali 2 % oetno kislino do končnega volumna 50 µL in 1 mL standardne raztopine radikala DPPH•. Pri analizi smo pripravili vzorce za analizo ekstraktov kimchija tako, da

smo k 50 µL vzorca ekstrakta dodali 1 mL standardne raztopine radikala DPPH•. Po točno 60 min smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Kontrolni vzorec smo pripravili tako, da smo k 1 mL raztopine radikala DPPH• dodali 50 µL metanola, dobro premešali in točno po 60 min izmerili absorbanco pri 517 nm. Kot slepi vzorec za umerjanje spektrofotometra smo uporabili raztopino metanola. Analizo smo opravljali v dveh ponovitvah.

Izračun:

Iz vrednosti absorbance, izmerjene pri 517 nm, za preiskovani vzorec in naklona premice umeritvene krivulje smo izračunali AOU v reakcijski zmesi (c_{rz}). V vzorcu soka in ekstrakta (c_{vz}) smo izračunali AOU z upoštevanjem redčitvenega faktorja:

$$c_{rz} = A_{746} / k \quad \dots (6)$$

$$c_{vz} = (c_{rz} \times V_{rz}) / V_{vz} \quad \dots (7)$$

k naklon umeritvene krivulje
 V_{rz} volumen reakcijske zmesi (725 µL)
 V_{vz} volumen razredčenega vzorca (50 µL vzorec soka, 150 µL vzorec ekstrakta)

AOU v kimchiju smo izrazili kot masni delež ekvivalenta troloksa:

$$w = (c_{vz} \times M_T) / \rho \quad \dots (8)$$

w masni delež (mg/g svežega vzorca)
 c_{vz} koncentracija skupnih fenolnih spojin v vzorcu soka ali vzorcu ekstrakta
 M_T molska masa klorogenske kisline (354,31 g/mol)
 ρ gostota soka kimchija (1,00 g/mL)

Pri izračunu AOU v ekstraktu kimchija smo upoštevali še zatehto in količino dodanega ekstrakcijskega topila.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4. 1 VREDNOST pH

V vzorcih soka in ekstraktov kimchija smo pred opravljanjem analiz določili vrednost pH z uporabo pH lističev. Približne vrednosti pH analiziranih vzorcev so podane v preglednici 1.

Preglednica 1: Okvirne vrednosti pH vzorcev soka in ekstraktov kimchija

Vzorec	Vrednost pH v soku	Vrednost pH v ekstraktu
D7	3	4
D3	4	4
D0	3	3
K	4	4

Legenda: domači vzorec kimchija, fermentiran 7 dni (D7), domači vzorec kimchija, fermentiran 3 dni (D3), domači sveži vzorec kimchija brez fermentacije (D0), kupljeni vzorec kimchija (K)

V splošnem velja, da je kimchi najbolj okusen, ko doseže vrednost pH 4,2. Najbolj optimalni vrednosti pH se je približal vzorec ekstrakta kimchija, fermentiranega sedem dni, in vzorca soka in ekstrakta domačega kimchija, fermentiranega tri dni, in kupljenega kimchija.

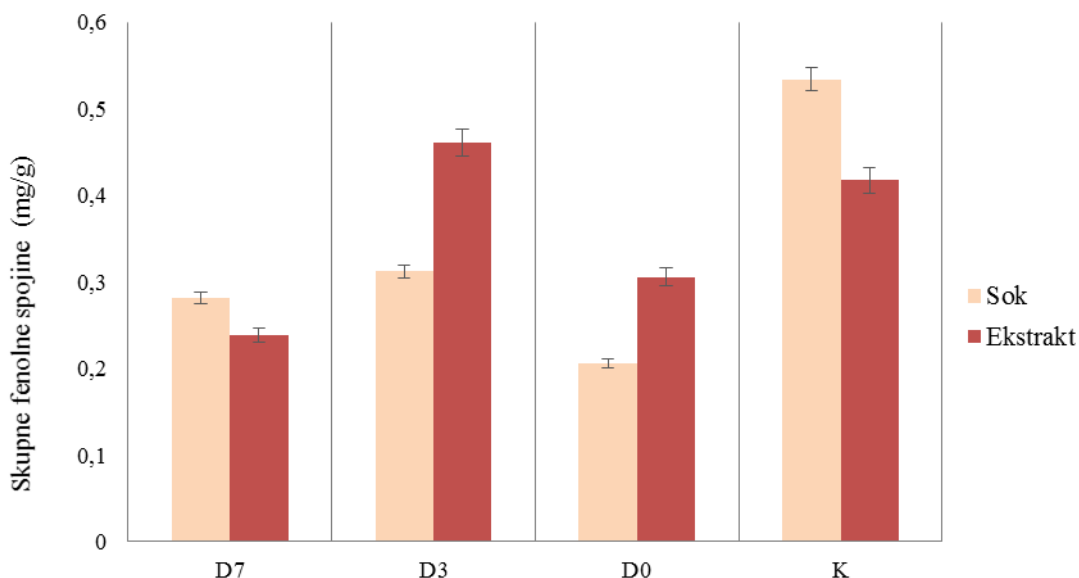
V raziskavi, ki so jo opravili Kim in sod. (2014), so spremljali antioksidativno delovanje vzorcev kimchija. Fermentacija vseh vzorcev kimchija je potekala do vrednosti pH 5,6 (sveži kimchi), 4,3 (optimalno fermentiran kimchi) in 3,8 (prekomerno fermentiran kimchi). Optimalno fermentiran vzorec ter prekomerno fermentiran vzorec sta izkazala višjo vrednost AOU kot sveži kimchi.

4. 2 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo v vzorcih domačega in kupljenega kimchija določili spektrofotometrično z uporabo Folin–Ciocalteujevega reagenta. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v kimchiju izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline (mg/g svežega vzorca).

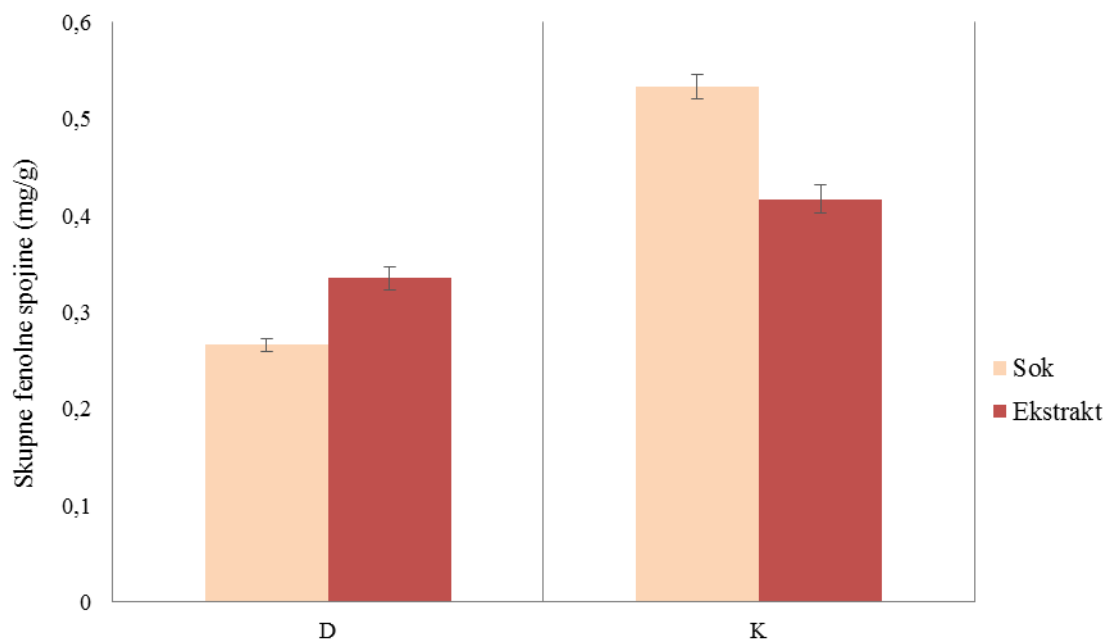
Iz rezultatov slike 5 je razvidno, da se vsebnosti skupnih fenolnih spojin med različno pripravljenimi domačimi vzorci kimchija razlikujejo, prav tako se razlikuje vsebnost skupnih fenolnih spojin v soku in ekstraktu kimchija. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v primeru domačega kimchija pri vzorcu kimchija, ki smo ga pustili fermentirati tri dni, znaša 0,31 mg/g v soku in 0,46 mg/g v ekstraktu kimchija. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcu sveže pripravljenega kimchija (brez fermentacije) znaša v soku 0,21 mg/g, v ekstraktu pa 0,31 mg/g. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v domačem kimchiju pri vzorcu, ki smo ga pustili fermentirati tri dni in v sveže pripravljenem kimchiju, je večja v ekstraktu kot v soku kimchija. V vzorcu kimchija, ki smo ga pustili fermentirati sedem dni

in v vzorcu kupljenega kimchija pa je vsebnost skupnih fenolnih spojin višja v soku kot v ekstraktu. V vzorcu kimchija, ki smo ga pustili fermentirati sedem dni znaša vsebnost skupnih fenolnih spojin v soku 0,28 mg/g, v ekstraktu pa 0,24 mg/g. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v kupljenem kimchiju znaša v soku 0,53 mg/g, v ekstraktu pa 0,42 mg/g.



Slika 5: Vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg/g) v vzorcih soka in ekstraktov domačega in kupljenega kimchija; domači vzorec kimchija fermentiran 7 dni (D7), domači vzorec kimchija fermentiran 3 dni (D3), domači sveži vzorec kimchija brez fermentacije (D0), kupljeni vzorec kimchija (K)

Vsebnost skupnih fenolnih spojin je višja tako v soku kot tudi v ekstraktu kupljenega kimchija v primerjavi s povprečnimi vrednostmi doma pripravljenega kimchija (slika 6). Povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin doma pripravljenega kimchija je v višja v ekstraktu (0,33 mg/g) kot v soku (0,27 mg/g). Pri kupljenem kimchiju pa je nasprotno višja vsebnost skupnih fenolnih spojin v soku (0,53 mg/g) v primerjavi z ekstraktom (0,42 mg/g). Razlog za višjo vsebnost fenolnih spojin v soku kupljenega kimchija v primerjavi z ekstraktom gre po vsej verjetnosti pripisati različnim izhodnim sestavinam (zelje in začimbe: npr. čili v prahu), pa tudi postopku fermentacije. Na razliko med preiskovanimi vzorci domačega kimchija je najverjetneje vplival različen čas fermentacije ter vrednost pH, ki so jo vzorci kimchija dosegli po končani fermentaciji. Najbolj optimalni vrednosti pH se je približal vzorec ekstrakta kimchija, fermentiranega sedem dni, in vzorca soka in ekstrakta domačega kimchija, fermentiranega tri dni, ter kupljenega kimchija. Dani vzorci so izražali tudi najvišjo vsebnost skupnih fenolnih spojin.

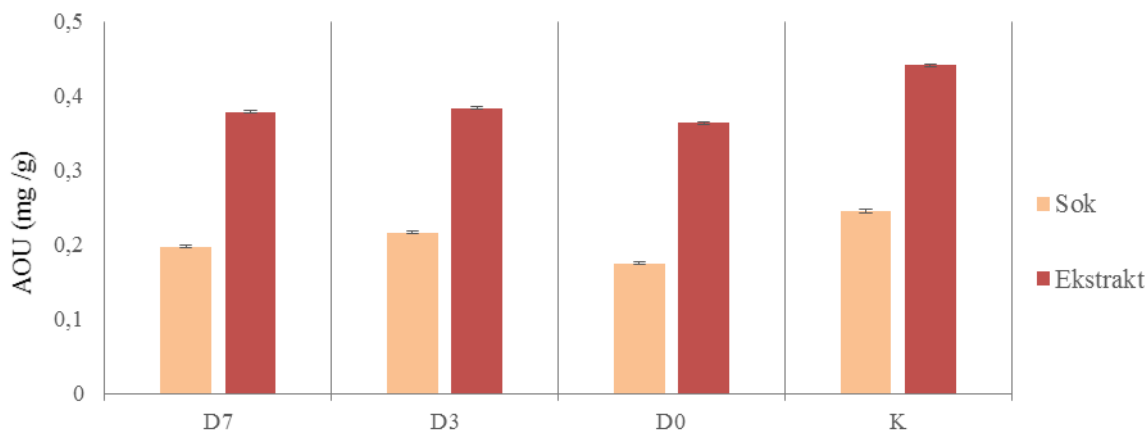


Slika 6: Vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg/g) v vzorcih soka in ekstraktov domačega in kupljenega kimchija; povprečna vsebnost fenolnih spojin (mg/g) domačih vzorcev kimchija (D), kupljeni vzorec kimchija (K)

4. 3 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST KIMCHIJA

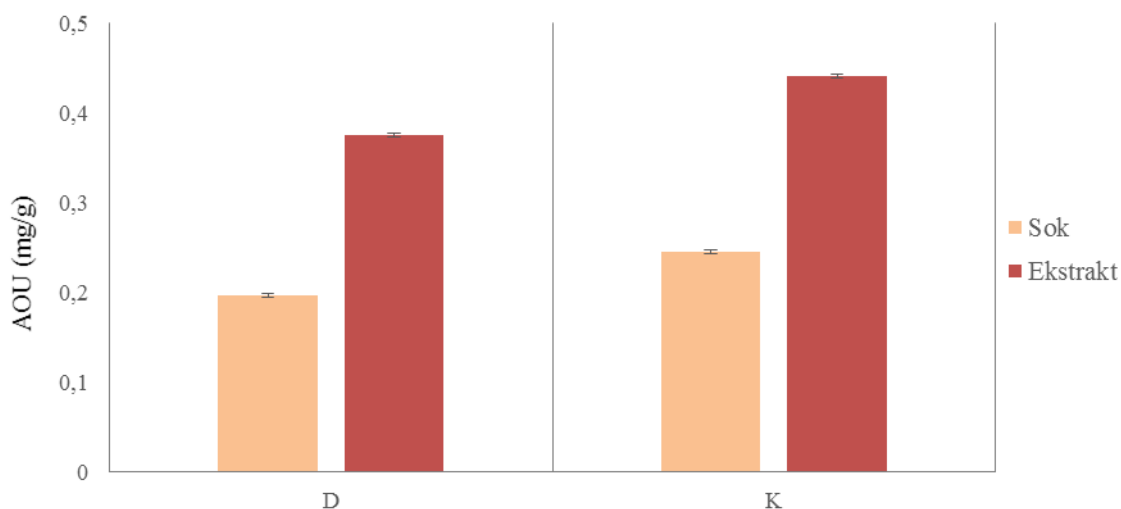
Antioksidativna učinkovitost soka in ekstrakta kimchija smo določili z metodo lovljenja radikala DPPH•. Končne rezultate analize in sposobnost antioksidantov za lovljenje radikala DPPH• smo podali na sliki 7 in 8 kot ekvivalent troloksa.

AOU je bila v vseh vzorcih ekstraktov višja kot v vzorcih soka kimchija. Čas fermentacije domačega kimchija ni imel bistvenega vpliva na AOU, najvišjo AOU smo določili tistemu, ki smo ga pustili fermentirati tri dni (0,22 mg/g v soku in 0,38 mg/g v ekstraktu). AOU v domačem vzorcu kimchija, fermentiranega sedem dni, znaša v soku 0,19 mg/g, in v ekstraktu pa 0,38 mg/g. Najnižjo vrednost AOU je izkazal sveži vzorec kimchija, in sicer v soku 0,17 mg/g, v ekstraktu pa 0,36 mg/g. Med vsemi analiziranimi vzorci smo najvišjo AOU določili v kupljenem kimchiju, in sicer v soku 0,24 mg/g in v ekstraktu 0,44 mg/g.



Slika 7: Antioksidativna učinkovitost (AOU) (mg/g) vzorcev soka in ekstraktov domačega in kupljenega kimchija; domači vzorec kimchija fermentiran 7 dni (D7), domači vzorec kimchija fermentiran 3 dni (D3), domači sveži vzorec kimchija brez fermentacije (D0), kupljeni vzorec kimchija (K)

Količina prisotnih antioksidantov v kimchiju je odvisna predvsem od kombinacije različnih izhodnih surovin (kitajsko zelje, začimbe) in od postopkov predelave. Ekstrakt kimchija vsebuje bolj pestro kombinacijo različnih živil, medtem ko v soku kimchija prevladuje raztopljeni korejski čili v prahu. Bolj pestra kombinacija sestavin ter optimalen potek fermentacije in posledično vrednost pH, ki jo živilo doseže po fermentaciji, so lahko dejavniki, ki vplivajo na večjo vrednost AOU, kot je bilo dokazano v raziskavi, ki so jo opravili Kim in sod. (2014). Najbolj optimalni vrednosti pH se je približal domači vzorec kimchija, ki smo ga pustili fermentirati tri dni pri sobni temperaturi in vzorec kupljenega kimchija. Domači vzorec kimchija fermentiran tri dni pri sobni temperaturi in kupljeni kimchi sta tudi izkazala največjo AOU. Vrednost pH vpliva na AOU in vsebnost skupnih fenolnih spojin kimchija. V raziskavi, ki so jo opravili Kim in sod. (2014), so ob spremljanju antioksidativnega delovanja vzorcev kimchija ugotovili, da optimalno fermentiran vzorec ter prekomerno fermentiran vzorec izkazujeta višjo vrednost AOU kot sveži kimchi, kar je razvidno tudi iz rezultatov opravljenih v naši raziskavi.



Slika 8: Antioksidativna učinkovitost (AOU) (mg/g) vzorcev soka in ekstraktov domačega in kupljenega kimchija; domači vzorci kimchija (D), kupljeni vzorec kimchija (K)

AOU je v zelenjavi tesno povezana z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, kot je bilo ugotovljeno v raziskavi, ki sta jo opravila Charanjit in Haris (2002), kjer sta spremljala AOU in vsebnost skupnih fenolnih spojin v azijski zelenjavi. Višja kot je vsebnost skupnih fenolov, večja je antioksidativna učinkovitost, kar v veliki meri kažejo tudi naši rezultati. Predvidevamo, da je višja vsebnost skupnih fenolnih spojin in višja AOU kupljenega kimchija v primerjavi z vzorci domačega kimchija najverjetneje posledica bolj pestre kombinacije zelja in začimb ter optimalne fermentacije.

5 SKLEPI

Na podlagi opravljenih analiz v okviru diplomskega dela lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- kimchi vsebuje fenolne spojine,
- vsebnosti skupnih fenolnih spojin v soku in ekstraktih kupljenega in domačega kimchija se med seboj razlikujejo,
- vsebnost fenolnih spojin je v kupljenem kimchiju večja od vsebnosti doma pripravljenega kimchija,
- vsi vzorci soka in ekstrakta kimchija so izkazali antioksidativno učinkovitost (AOU),
- AOU ekstraktov kimchija je višja kot v soku kimchija,
- na vsebnost skupnih fenolnih spojin in AOU kimchija vpliva vrednost pH živila,
- vzorci kimchija, ki se najbolj približajo optimalni vrednosti pH 4,2, izkazujejo večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin in večji AOU.

6 POVZETEK

Kimchi izvira iz Koreje in je eno najbolj prepoznavnih ter priljubljenih fermentiranih živil, razširjenih po vsej Aziji. Priprava kimchija temelji na predpripravi zelenjave, vlaganju kitajskega zelja v slanico, združitvi vseh sestavin ter fermentaciji. V Koreji je za skoraj vsako regijo značilen svojevrsten postopek priprave in kombinacije sestavin. V splošnem velja, da je kimchi najbolj okusen in izkazuje najvišjo antioksidativno učinkovitost (AOU) ne glede na sestavine, če ga pustimo fermentirati dva do tri tedne pri temperaturi med 3 °C in 7 °C, doseže vrednost pH 4,2 in je vsebnost titrabilnih kislin med 0,6 % do 0,8 %.

Namen diplomskega dela je bil pripraviti domači kimchi in primerjati njegovo vsebnost skupnih fenolov ter antioksidativne lastnosti s kupljenim. Tako iz kupljenega kot domačega kimchija smo pripravili vzorce soka in ekstrakta ter v njih določili skupne fenolne spojine in AOU. Pred opravljenimi analizami smo vzorcem določili tudi okvirno vrednost pH.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določali z uporabo Folin–Ciocalteujeve metode ter jo v kimchiju izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline. Med pripravljenimi domačimi vzorci kimchija prihaja do razlik v vsebnosti, prav tako se razlikuje vsebnost skupnih fenolnih spojin v soku in ekstraktu kimchija, le-ta je višja pri kupljenem kimchiju v primerjavi z vzorci doma pripravljenega kimchija.

AOU smo določili spektrofotometrično z metodo lovljenja radikala DPPH•, ki temelji na reakciji stabilnega radikala DPPH• (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) z antioksidanti vzorca (donorji vodika). AOU vzorca smo izrazili kot ekvivalent antioksidanta troloksa. Vsi vzorci soka in ekstrakta kimchija so izkazali AOU. Vzorci kupljenega kimchija so v primerjavi z domačimi vzorci kimchija izkazali višjo AOU, ekstrakti imajo večjo AOU kot sok. Izmed analiziranih vzorcev sta izkazala najvišjo AOU vzorec kimchija, fermentiranega tri dni, ter vzorec kupljenega kimchija.

Na podlagi opravljenih analiz lahko potrdimo hipotezo, ki smo jo postavili v uvodu, da se vsebnost skupnih fenolov in AOU vzorcev soka in ekstraktov, pripravljenih iz domačega in kupljenega kimchija, med seboj razlikujejo.

7 VIRI

- Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti: učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študiju bioznanosti. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berest C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/ Food Science and Technology*, 28: 25-30
- Charanjit K., Haris C. K. 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 2: 153-161
- Fan L., Hansen T. L. 2012. Fermentation and biopreservation of plant-based foods with lactic acid bacteria. V: *Handbook of plant-based fermented food and baverage technology*. Hui Y. H. (ed.), Boca Raton, CRC Press: 37-39
- Kim B. J., Choi J. M., Kang S. A., Park K. Y., Cho E. J. 2014. Antioxidative effects of kimchi under different fermentation stage on radical-included oxidative stress. *Nutrition Research and Practice*, 8, 6: 638-643
- Kočevar Glavač N. 2013. Antioksidanti. V: *Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*. 2. izd. Kreft S., Kočevar Glavač N. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 511-537
- Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Analitika antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-36
- Lee J. 2014. 10 things you didn't know about kimchi, New York, Kimchi Tiger: 1 str. <http://kimchitiger.com/blogs/all/17878195-10-things-you-didnt-know-about-kimchi> (januar 2017)
- Molyneux P. 2003. The use of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Tehnology*, 26: 211-219
- Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114

Pečar S., Mravljak J. 2015. Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 319 str.