



Raziskovalna naloga

KARAKTERIZACIJA AKTIVNIH UČINKOVIN V BUČNEM IN LANENEM SEMENU



Področje: KEMIJA

Avtorja: Nik Bombek, Jure Škamlec

Mentorica: Maja Smiljan, prof. kemije in matematike

Somentorici: dr. Maja Leitgeb, dr. Gordana Hojnik Podrepšek

Ptuj, marec 2022

POVZETEK

Dandanes se vse bolj zavedamo pomena hrane. Ne govorimo le o sestavi in hranilih, ampak tudi o kakovosti. Semena so temelj vsake hrane in zelo je pomembno, kako jih izberemo.

V raziskovalni nalogi smo želeli preučiti vsebnost aktivnih učinkovin v lanenem in bučnem semenu. Omejili smo se na polifenole, beljakovine in ancim alfa – amilaza.

Aktivne učinkovine smo ekstrahirali z metodo Soxhletove ekstrakcije in z natrijevim acetatnim pufrom. Vsebnost polifenolov smo določali v vzorcih po Soxhletovi ekstrakciji, aktivnost beljakovin in alfa – amilaze pa tudi v vzorcih po ekstrakciji z natrijevim acetatnim pufrom.

Izračunali smo izkoristek po ekstrakciji ter določili najprimernejše topilo.

Ugotovili smo, da so bučna in lanena semena vir polifenolov, potrdili vsebnost beljakovin in prisotnost encima alfa – amilaza.

SUMMARY

Today, we are fully aware of the importance of food. We are not only talking about composition and nutrients, but also about quality. Seeds are the foundation of every food and it is very important how we choose them.

In the research task we wanted to study the content of active ingredients in flax and pumpkin seeds. We limited ourselves to polyphenols, proteins and the enzyme alpha - amylase.

The active ingredients were extracted by the Soxhlet extraction method and sodium acetate buffer. The polyphenol content was determined in samples after Soxhlet extraction, protein and alpha - amylase activity as well as in samples after extraction with sodium acetate buffer.

The yield after extraction was calculated and the most suitable solvent was determined.

We found that pumpkin and flax seeds are a source of polyphenols, confirmed the protein content and the presence of the enzyme alpha - amylase.

ZAHVALA

Zahvaljujeva se mentorici gospe Maji Smiljan, učiteljici kemije, za pomoč pri načrtovanju raziskovalnega dela, izvedbi eksperimentalnega dela in svetovanju pri pisanju raziskovalne naloge.

Zahvala gre tudi mentoricama na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru prof. dr. Maji Leitgeb in dr. Gordani Hojnik Podrepšek za možnost izvajanja eksperimentalnega dela raziskovalne naloge, za strokovno podporo in spodbudo.

Vsebina

POVZETEK	2
SUMMARY	2
1. UVOD	7
1.1 Hipoteze	7
2. TEORETSKI DEL	8
2.1 Seme	8
2.2 Bučna semena	9
2.3 Lanena semena	9
2.4 Antioksidanti	11
2.5 Polifenoli	11
2.6 Proteini (beljakovine)	12
2.6.1. Encimi	12
2.7 Ekstrakcija po Soxhletu	13
2.8 UV-VIS spektrofotometrija	14
3. METODE IN MATERIALI	15
3.1 EKSTRAKCIJA UČINKOVIN IZ BUČNIH IN LANENIH SEMEN	16
3.1.1. Pripomočki in kemikalije	16
3.1.2. Soxhletova ekstrakcija	16
3.1.3. Ekstrakcija z natrijevim acetatnim pufrom	17
3.2 DOLOČANJE IZKORISTKA EKSTRAKCIJE Z RAZLIČNIMI TOPILI	18
3.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIFENOLOV	18
3.3.1. Pripomočki in kemikalije	18
3.3.2. Umeritvena premica z galno kislino	18
3.3.3. Vsebnost polifenolov v etanolnih in metanolnih ekstraktih	20
3.4 DOLOČANJE CELOKUPNE KONCENTRACIJE PROTEINOV S POMOČJO BRADFORDOVEGA REAGENTA	20
3.4.1. Pripomočki in kemikalije	20
3.4.2. Umeritvena krivulja za albumin	21
3.4.3. Postopek določanja proteinov	21
3.5 DOLOČANJE AKTIVNOSTI ENCIMA ALFA - AMILAZA	22
3.5.1. Pripomočki in kemikalije	22
3.5.2. Umeritvena krivulja za maltozo	22
3.5.3. Določanje encima alfa - amilaza v vzorcih	23
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1 EKSTRAKTI	24
4.2 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE	25

4.3	VSEBNOST POLIFENOLOV	25
4.3.1.	Umeritvena krivulja za galno kislino.....	25
4.3.2.	Vsebnost polifenolov	26
4.4	CELOKUPNA VSEBNOST PROTEINOV	27
4.4.1.	Umeritvena krivulja za albumin.....	27
4.4.2.	Določanje koncentracije beljakovin	27
4.5	AKTIVNOST alfa - amilaze	28
4.5.1.	Umeritvena krivulja za maltozo.....	28
5.	ZAKLJUČEK	30
6.	LITERATURA.....	31

Kazalo slik

<u>Slika 1: Vrste semen</u>	<u>Slika 2: Semena so različnih oblik in barv</u>	8
<u>Slika 3: Bučna semena (Vir: Bodi eko)</u>	<u>Slika 4: Bučno olje - vir linolenske kisline</u>	9
<u>Slika 5: Lan - kulturna rastlina</u>	<u>Slika 6: Laneno polje</u>	10
<u>Slika 7: Rumena in rjava lanena semena</u>		10
<u>Slika 8: laneno olje - bogastvo rastlinskih vlaknin in balastnih snovi</u>		10
<u>Slika 9: Kemijska struktura fenola</u>	<u>10: Kemijska struktura oleuropeina</u>	11
<u>Slika 11: Kroglečni model encima v primerjavi z modeloma ATP in glukoze (zgoraj desno)</u>		13
<u>Slika 12: Alfa - amilaza</u>		13
<u>Slika 13: Soxhletov ekstraktor</u>		14
<u>Slika 14: UV - VIS spektrofotometer (Vir: lasten)*</u>		15
<u>Slika 15: Zmleta bučna semena</u>	<u>Slika 16: Lanena semena v pripravi za mletje</u>	16
<u>Slika 17: Ekstrakcija bučnih semen na Soxhletovem aparatu</u>	<u>Slika 18: Odstranjevanje topila z rotavaporjem</u>	17
<u>Slika 19: Ekstrakta bučnih in lanenih semen v etanolu</u>	<u>Slika 20: Ekstrakta bučnih in lanenih semen po uparitvi topila.</u>	17
<u>Slika 21: Tehtanje na analizni tehtnici</u>		19
<u>Slika 22: Priprava standardnih raztopin galne kisline Ciocaultevega reagenta</u>	<u>Slika 23: Vzorci raztopin galne kisine in Folin -</u>	19
<u>Slika 24: Priprava vzorcev za določanje polifenolov</u>	<u>Slika 25: Priprava vzorcev za določanje polifenolov</u>	20
<u>Slika 26: Vzorci ekstraktov semen za določanje proteinov po Bradfordovi metodi</u>		21
<u>Slika 27: Vzorci ekstraktov za določanje aktivnosti encima alfa - amilaza</u>		23
<u>Slika 28: Ekstrakt lanenih semen v etanolu</u>		24

Kazalo grafov

<u>Graf 1: Izkoristek po Soxhletovi ekstrakciji bučnih in lanenih semen v etanolu in metanolu</u>	25
<u>Graf 2: Umeritvena krivulja za galno kislino</u>	26
<u>Graf 3: Vsebnost polifenolov mg GA/g ekstrakta</u>	26
<u>Graf 4: Umeritvena krivulja za albumin</u>	27
<u>Graf 5: Koncentracija beljakovin v različnih vzorcih v 100 g materiala</u>	28
<u>Graf 6: Umeritvena krivulja za maltozo</u>	28
<u>Graf 7: Aktivnost encima alfa - amilaza v vzorcih</u>	29

Kazalo tabel

<u>Tabela 1: Vzorci raztopin za umeritveno krivuljo za maltozo</u>	23
<u>Tabela 2: Absorbanca vzorcev v različnem topilu</u>	27

1. UVOD

Sodobni čas, v katerem živimo, odpira marsikatero družbeno vprašanje glede kakovosti hrane, ki jo vsakodnevno vnašamo v organizem. Hrano, ki je pred nekaj sto leti veljala za »hrano višjih družbenih slojev,« danes postavljamo na zatožno klop, saj vsebuje veliko nasičenih maščob, prečiščenih ogljikovih hidratov, pa tudi sladkorjev. Z vsem naštetim izgublja svoj osnovni pomen – vsebnost hranilnih snovi in aktivnih učinkovin.

Za normalno delovanje človeškega organizma je potrebno zagotoviti vse osnovne sestavine hrane, brez katerih bi organizem propadel, saj pomanjkanje ali presežek sestavin predstavlja razvoj različnih bolezni (Hrana za energijo in rast, 2020).

Beljakovine so pomemben sestavni del vseh živalskih in rastlinskih celic, v telesu pa imajo mnoge za življenje pomembne funkcije: delujejo kot encimi, so nujno potrebne za rast in razvoj, so ključni gradnik celičnih struktur, sodelujejo pri imunskejem odzivu, izgradnji in delovanju mišičevja, vključene so v popravljalne mehanizme in v prenos številnih snovi po organizmu (E.F.S.A., 2012).

Človeško telo se vsakodnevno srečuje s precejšnjo količino prostih radikalov, ki predstavljajo potencialno grožnjo za razvoj bolezni in drugih težav. Nastajajo v oksidacijskih procesih, ki so del presnove, lahko pa jih zaužijemo tudi s hrano (Manzin, 2010).

Neželene učinke telo prepreči s številnimi obrambnimi mehanizmi, poleg tega pa koristijo tudi nekateri vitamini in antioksidanti, ki jih pridobimo s hrano. Težko je dokazati, da antioksidanti bistveno pripomorejo pri teh procesih, saj jih je od delovanja drugih snovi težko ločiti. Kljub temu pa nekatere študije kažejo, da uživanje rastlinskih antioksidantov zmanjšuje možnost oksidativnih poškodb celic in nastanek nekaterih bolezni (Prehrana.si, 2016).

V bučnem olju, ki ga vsebujejo bučna semena, se nahaja zelo veliko linolenske kisline, ene izmed esencialnih nenasičenih kislin, ki je za naš organizem zelo pomembna, vendar je telo ne more ustvariti samo.

Koristni učinki bučnega semena so povezani z njegovimi antioksidativnimi lastnostmi, te pa so posledica prisotnosti različnih tokoferolov in polifenolov.

Sodobna nutricionistika laneno seme uvršča med »super živila,« saj je razmerje omega 6 in omega 3 maščobnih kislin idealno za telo: 4 : 1. Poleg tega je odličen vir vitaminov, mineralov in beljakovin. Poznano je tudi kot dragocen »pomočnik« pri uravnavanju prebave zaradi vsebnosti vlaknin in prebavnih encimov.

Prav na vsebnost polifenolov, beljakovin in encima alfa - amilaza v bučnem in lanenem semenu se bomo osredotočili v raziskovalni nalogi.

1.1 Hipoteze

Pred pričetkom raziskovalne naloge smo si zastaviti naslednje hipoteze:

1. Bučna in lanena semena so vir polifenolov.
2. Najprimernejše topilo za ekstrakcijo polifenolov bo etanol.
3. Vsebnost encima alfa - amilaza bo najvišja v ekstraktih lanenih in bučnih semen z natrijevim acetatnim pufrom.

2. TEORETSKI DEL

2.1 Seme

Seme je embrionalna rastlina, zaprta v zaščitni zunanji ovoj. Tvorba semena je del procesa razmnoževanja v semenskih rastlinah, spermatofitih, vključno z golosemenkami in kritosemenkami. Večina rastlin začne življenje kot semena. Rastline tvorijo svoja semena znotraj cvetov ali storžkov. V cvetočih rastlinah plod pogosto obdaja semena.

Semena potrebujejo ustrezne pogoje za kalitev ali rast v novo rastlino. Potrebujejo zrak, vodo, pravo temperaturo, dobre razmere tal in pravo količino svetlobe. Seme vsebuje miniaturno rastlino, imenovano zarodek, ki se lahko razvije v popolnoma zraslo rastlino. Zunanja lupina semena, imenovana semenska ovojnica, ščiti zarodek.

Znotraj semena hranični material zagotavlja hrano zarodku. V cvetočih rastlinah se ta material imenuje endosperma. Ko se seme oblikuje, zapusti svojo matično rastlino. Semena lahko pogosto ostanejo v mirovanju ali neaktivna več let, preden vzkljijejo. Zaradi tega jih lahko ljudje shranimo in jih kasneje posadimo ali seveda pojemo.



(Vir: <http://os-sostanj.splet.arnes.si/files/2020/03/NotranjostSemen.pdf>)

Za človeštvo semena predstavljajo zelo velik biološki in ekonomski pomen. Naša telesa jih sprejmejo zelo dobro, seveda pa jih lahko tudi posadimo. Za prehod ljudi iz nabiralce in lovce v poljedelce in živinorejce so bile ključnega pomena, kar je človek ugotovil že pred približno 23.000 leti, ko naj bi posadil prvo seme. Semena so torej pomemben vir hrane za ljudi in živali. Semena, ki se uporabljajo za hrano, se pogosto imenujejo zrna. Ljudje uporabljajo semena tudi za izdelavo olj, začimb, barvil za tkanine in nakita itd. Rastline ki tvorijo semena se imenujejo semenke, te pa delimo na 2 glavni skupini - golosemenke in kritosemenke.

Kritosemenke pa se razdelijo na dve glavni skupini:

- Dvokaličnice, s tujko tudi dikote in dikotiledone, katerih ime se nanaša na eno izmed tipičnih značilnosti skupine - na to da ima rastlina dva klična lista.
- Enokaličnice, katerih ime se nanaša na eno izmed tipičnih značilnosti skupine - na to da ima rastlina dva klična lista.

2.2 Bučna semena

Buče sodijo med najstarejše gojene rastline. Spadajo v veliko družino bučevk, poznamo pa jih več vrst: bodeča buča, lufa, kačasta buča itd. Iz teh mogočnih rastlin pridobivamo bučna semena.

Tako kot plodovi so sicer ploščata in ovalna semena zelo različna. V plodu jih je lahko do 400. Na osnovi njihove barve, velikosti in oblike je mogoče določiti vrsto buče. Pri vseh bučah se pod semensko lupino skriva jedrce. Če ga podrobneje pogledamo, opazimo odebelenja, ploščata klična lista in rastlinski zarodek, ki izgleda kot majhna stožčasta izboklina. Dobro očiščeno in posušeno seme, shranjeno na hladnem, suhem in temnem mestu lahko obdrži kalivost najmanj šest let.



Slika 3: Bučna semena (Vir: Bodi eko)



Slika 4: Bučno olje - vir linolenske kisline

(Vir: <https://www.zps.si/mediji>)

Hranilna vrednost bučnih semen je zelo visoka. Vsebujejo veliko vitaminov (B, C, E, D in K), kot tudi protivitamin A. Vsebujejo tiamin, riboflavin, ogljikove hidrate, beljakovine in zdravju dosti pomembnih mineralov (magnezij, mangan, cink, kalij in baker). So odličen vir cinka, ki podpira zdrave imunske funkcije, dobavljajo pa tudi niancin oz. vitamin B3, ki je nujen za notranjo ravnotesje. Magnezij, cink in zdrave mašcobe naredijo bučna semena dobro prehransko izbiro za tiste, ki imajo težave z visokim krvnim tlakom in zdravjem srca. Prav tako so odličen vir antioksidantov.

V bučnem olju, ki ga vsebujejo bučna semena, se nahaja zelo veliko linolenske kisline, ene izmed esencialnih nenasičenih kislin, ki je za naš organizem zelo pomembna, vendar je telo ne more ustvariti samo.

2.3 Lanena semena

Lanena semena pridobivamo iz rastline lan. Zdravilno vrednost, ki jo imata lanena semena in laneno olje so poznali že v antični Grčiji. Priporočali so ga za različne zdravstvene težave. Na območju današnje Slovenije so pokrajino svoj čas krasila polja z modrimi cvetovi. Lan, eno najstarejših kulturnih rastlin na svetu (*Linum usitatissimum*), so v naših krajih gojili predvsem za izdelavo platna, žaklevine, vrvi itd. O pridelovanju lanu in njegovi uporabi pišejo že najstarejši urbarji na slovenskih tleh od 12. stoletja dalje. Konec 19. stoletja je ta kulturna rastlina pri nas postopoma začela izginjati iz jo danes le redko zasledimo.



Slika 5: Lan - kulturna rastlina



Slika 6: Laneno polje

(Vir: <https://sl.public-welfare.com/4163985-what-is-flax-white-useful-properties-description-and-use>)

Medtem ko so izdelki iz lanu postali vse redkejši, pa je pri nas in po svetu v zadnjem času »zaslovelo« laneno seme in iz njega pridelano jedilno laneno olje, ki jima pripisujejo številne zdravilne in blagodejne učinke za telo in zdravje.

Poznamo rumena oz. zlato ter rjava lanena semena. Imajo rahel okus po oreščkih in vsebuje približno 40 % maščob (laneno olje), od tega okoli 50 % nenasičene maščobne kisline omega 3 in približno 17 % omega 6. To je najvišja koncentracija nenasičene alfa-linolenske kisline (Omega 3) med vsemi znanimi rastlinskimi olji. Druge pomembne sestavine so sluzi, linamarin, beljakovine, lecitin, kot tudi steroli, vitamini B1, B2, B6, F in E, nikotinska, folna in pantotenska kislina.



Slika 7: Rumena in rjava lanena semena

(Vir: <https://slv.drinkpinkonline.com/>)



Slika 8: Laneno olje - bogastvo rastlinskih vlaknin in balastnih snovi

(Vir: http://osmjc.splet.arnes.si/files/2017/09/Z_lanom_v_zeleni_turizem.pdf)

Poleg omenjenih koristi maščob omega 3, lanenim semenom in olju pripisujejo številne druge koristi za dobro počutje in zdravje. Najbolj odmevno je odkritje dr. Johhane Budwig, diplomirane farmacevtke, kemičarke ter doktorice znanosti na področju kemije in fizike, da so

lanena semena odlično sredstvo za zdravljenje rakavih celic. Njena dieta je danes sestavni del celostnega zdravljenja na številnih klinikah, ki so zelo uspešne pri zdravljenju raka. Znanstveno poročilo Nemškega centra za raziskave raka iz Helderberga iz leta 2004, priporoča uživanje lanenega olja in lanenih semen kot preventivo proti raku na prsih in črevesju.

Laneno seme vsebuje polifenole, ki so antioksidanti. Nenazadnje pa ima laneno seme veliko vlogo pri prebavi, saj zaradi velike vsebnosti vlaknin in prebavnih encimov blagodejno vpliva na peristaltiko črevesja.

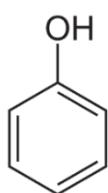
2.4 Antioksidanti

Antioksidanti so snovi, ki s svojo prisotnostjo zavirajo oksidacijske procese, torej procese, v katerih kot stranski produkt nastajajo prosti radikali. Le-ti so molekule, ki vsebujejo kisik in imajo neparno število elektronov. Čeprav je kisik za nas življenjskega pomena, se lahko hkrati v telesu obnaša kot zelo reaktivna molekula, zato ima naše telo precej mehanizmov, ki preprečujejo, da bi v telesu nastalo preveč prostih radikalov. Ti namreč zaradi svoje reaktivnosti sprožajo številne neželene kemijske reakcije in s tem poškodujejo celice - to pa je lahko eden izmed vzrokov za nastanek številnih bolezni, kot so rakaste tvorbe, infarkt, diabetes in vnetne bolezni (npr. arthritis), hkrati pa pospešujejo samo staranje organizma.

Antioksidanti pa prostim radikalom podarijo elektrone, da jih stabilizirajo, kar preprečuje, da bi prosti radikali napadali druge celice in povzročali bolezni. Prosti radikali najhitreje nastajajo ko smo pod stresom, ko kadimo, ko se nezdravo prehranjujemo, pijemo alkohol itd. Antioksidante najdemo predvsem v rastlinah, mesu, oreščkih in ribah. V rastlinah imajo zelo pomembno vlogo. Življenje rastlin je namreč zelo nevarno. Izpostavljene so sončnim žarkom kateri so po eni strani za njihovo preživetje ključni, po drugi pa so lahko tudi nevarni, saj se lahko rastline tudi "opečejo". Sončni žarki stalno sprožajo nastanek prostih radikalov, ki pa jih prisotni antioksidanti sproti nevtralizirajo.

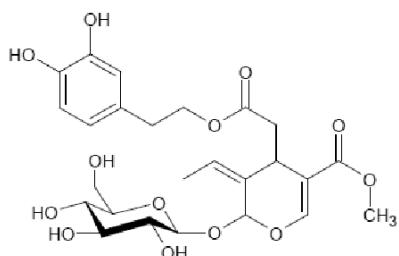
2.5 Polifenoli

Fenol je aromatska organska spojina s formulo C_6H_5OH , ki ima en aromatski obroč in eno hidroksilno skupino (glej sliko 9). Polifenoli spadajo med fenolne spojine z vsaj enim aromatskim obročem in eno ali več hidroksilnih skupin, ki so direktno vezane na obroče. Njihovo število pomembno vpliva na antioksidacijsko učinkovitost spojine.



Slika 9: Kemijska struktura fenola

(Vir: Wikipedija 2022)



10: Kemijska struktura oleuropeina

(Vir: Internetchemie, 2021)

Polifenoli so zelo močni antioksidanti, ki jih najdemo v nekaterih delih posameznih rastlin. So podrazred fitokemikalij. Polifenoli ščitijo pred boleznimi in ugodno vplivajo na zdravje. So zelo

koristni za zdravo prehrano, ker varujejo naše telo pred oksidacijskim stresom in pred prostimi radikali.

Med polifenole spada tudi flavonoid, katerega so včasih poimenovali vitamin P, da bi s tem poudarili njihovo prehransko pomembnost. Flavonoidi lahko direktno lovijo proste radikale, delujejo pa tudi posredno, tako da varujejo vitamin C pred oksidacijo. Najdemo jih v številnih zdravilnih rastlinah: listih breze, cvetovih bezga, cvetovih lipe, njivski preslici, cvetovih gloga, listih ginka in cvetovih ajde.

Polifenoli nedvomno preprečujejo nastanek okvar zaradi prostih radikalov in s tem zelo verjetno zavirajo pojav bolezni kot je rak in ateroskleroza. Antioxidanti delujejo tako, da se ob stiku z reaktivno oksidacijsko snovjo v našem telesu, same "žrtvujejo", zreagirajo s to snovjo in jo tako naredijo varno. Precej polifenolov se nahaja tudi v rdečem vinu, zelenem čaju, sadju, zelenjavi. Dokazano je, da polifenoli zmanjšujejo radikalско oksidacijo lipoproteinov v krvi. S tem naj bi upočasnili nastajanje ateroskleroze in prepričevali srčni infarkt.

Trije najbolj znani polifenoli so flavonoidi, antociani in resveratrol.

2.6 Proteini (beljakovine)

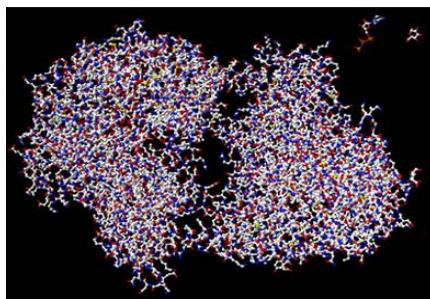
Beljakovine (proteini) spadajo med makrohranila, saj jih je s hrano treba zaužiti v večjih količinah, telesu pa predstavljajo vir energije. Iz 1 grama beljakovin se sprostijo 4 kilokalorije (17 kJ), poleg energije pa so beljakovine tudi vir dušika in aminokislin, iz katerih telo gradi sebi lastne beljakovine. Beljakovine so pomemben sestavni del vseh živalskih in rastlinskih celic, v telesu pa imajo mnoge za življenje pomembne funkcije: delujejo kot encimi, so nujno potrebne za rast in razvoj, so ključni gradnik celičnih struktur, sodelujejo pri imunskejem odzivu, izgradnji in delovanju mišičevja, vključene so v popravljalne mehanizme in v prenos številnih snovi po organizmu.

Beljakovine najdemo v velikem številu živil živalskega in rastlinskega izvora. Dobri viri živalskih beljakovin so jajca, mleko in mlečni izdelki, ribe in morski sadeži ter seveda meso. Slednje je za večino prebivalstva pri nas najpomembnejši vir beljakovin. Ker lahko z mesom zaužijemo tudi večje količine (nasičenih) maščob, priporočamo predvsem poseganje po pustem mesu. Med najboljše rastlinske vire beljakovin uvrščamo stročnice, žita in oreške, prisotne pa so tudi v mnogih drugih rastlinskih živilih. Toplotna obdelava na splošno izboljša biorazpoložljivost beljakovin in tudi njihov okus.

2.6.1. Encimi

Eno najpomembnejših vlog med beljakovinami imajo encimi. Njihova naloga je, da uravnavajo (katalizirajo) kemijske reakcije v organizmih, zato jih uvrščamo med biokatalizatorje. Biokatalizatorji so katalizatorji, ki delujejo v telesu.

Encimi imajo precej zapleteno zgradbo. Skoraj vsi so globularne beljakovine. Molekule nekaterih encimov lahko vsebujejo poleg beljakovinskega dela tudi atome kovin (npr. železa, magnezija, bakra ...) ali spojine, ki jih imenujemo koencimi. Koencimi so lahko tudi nekateri vitamini ali snovi, ki nastanejo iz vitaminov.

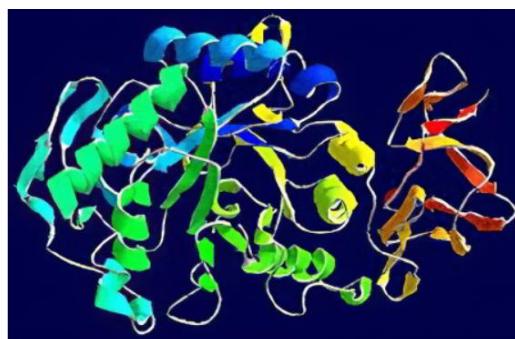


Slika 11: Kroglečni model encima v primerjavi z modeloma ATP in glukoze (zgoraj desno)

(Vir:<https://eucbeniki.sio.si/kemija9/1108/index6.html>)

2.6.1.1 Alfa - amilaza

Alfa - amilaza je eden od encimov prebavnega sistema, ki ga sintetizirajo predvsem celice trebušne slinavke eksokrinskega tipa in je odgovorna za razgradnjo kompleksnih ogljikohidratnih sestavin hrane, škroba in glikogena na enostavne ogljikove hidrate (glukozo). Ta encim v majhnih količinah proizvajajo žleze slinavke, ki so del slin. Običajno minimalna količina alfa-amilaze vstopi v splošni krvni obtok, saj ima trebušna slinavka zelo dobro oskrbo s krvjo. Prehod skozi ledvice se encim izloča z urinom.



Slika 12: Alfa - amilaza

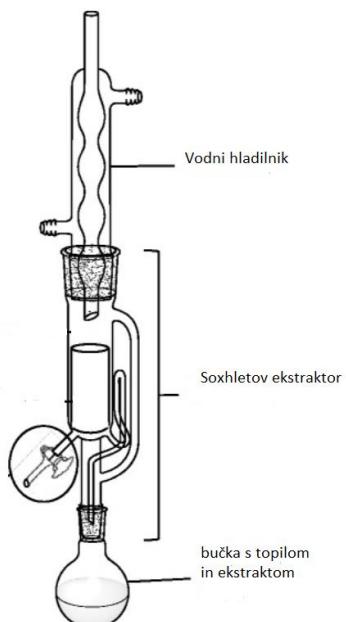
(Vir: <https://sl.medicineherbalist.com>)

2.7 Ekstrakcija po Soxhletu

Ekstrakcija po Soxhletu je ena najstarejših metod ekstrakcije trdnih vzorcev in jo poznamo tudi kot ponavljajočo trdno-tekočo ekstrakcijo. Vzorec damo v filtrirni papir, ki bo zadržal trdne delce in prepustil topilo z ekstrahirano snovjo. Filtrirni papir z vzorcem vstavimo v Soxhletov ekstraktor in pod njim postavimo topilo v bučki, ki jo začnemo segrevati.

Ko topilo zavre, se začnejo dvigovati hlapi, ki se kondenzirajo v kondenzatorju in nato stečejo v filtrirni papir s trdno snovjo. Učinkovina se začne raztopljaliti v topljem topilu in ko topilo doseže sifonsko cevko, steče nazaj v bučko in s seboj prinese tudi raztopljeno učinkovino. Ta proces

se ponavlja dokler ne presodimo, da je večina učinkovine ekstrahirana (Luque de Castro & Garcia Ayuso, 2000). Soxhletova ekstrakcija lahko poteka brez neprestanega nadzora, a navadno traja več ur in porabi veliko količino topila, prav tako pa jo moramo spremljati, če želimo določiti točno število ciklov.



Slika 13: Soxhletov ekstraktor

(Vir: <https://discoverfoodtech.com/soxhlet-extraction-method/>)

2.8 UV-VIS spektrofotometrija

UV-VIS spektrofotometrija, oziroma ultravijolična-vidna spektrofotometrija, je metoda, pri kateri detektorji merijo prehod fotonov skozi vzorec. Večinoma se jo uporablja za kvantitativno analizo atomov in molekul.

Naprava za merjenje se imenuje spektrofotometer, ki pošlje snop svetlobe skozi vzorec v kiveti in izmeri absorbanco (količino in valovno dolžino svetlobe, ki jo raztopina zadrži) in trasmitanco (količino svetlobe in njeno valovno dolžino, ki preide skozi raztopino).

Njune vrednosti izračuna po spodnjih enačbah, kjer A pomeni absorbanco, T trasmitanco, P količino svetlobe, ki jo raztopina prepusti, in P_0 količino svetlobe, ki jo prepusti raztopina, s katero smo umerili spektrofotometer:

$$T = P / P_0$$

$$A = - \log (T)$$

Valovna dolžina oz. barva, ki jo raztopina absorbira je ravno nasprotna tisti, ki jo ljudje zaznamo s prostim očesom, saj vidimo le svetlobo, ki je uspela prepotovati skozi snov ali se z nje odbila.

Svetlobo sestavljači fotoni, ki imajo določeno količino energije, ki jo lahko oddajo molekulam raztopine. Te jo absorbirajo, pri čemer se valenčni elektroni snovi v vzorcu premaknejo na višjo nezasedeno orbitalo. Valovna dolžina in količina absorbirane svetlobe sta odvisni od molekularne strukture snovi in njene koncentracije. To opisuje Beer-Lambertov zakon, ki pravi, da je absorbanca odvisna od valovne dolžine, vrste raztopine, debeline kivete z raztopino in koncentracije iskane snovi. Posledično je absorbanca premo sorazmerna s koncentracijo. V enačbi A predstavlja absorbanco, ϵ absorpcijski koeficient, l debelino in c koncentracijo:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

Na podlagi tega bi koncentracijo lahko izračunali, a vrednosti absorpcijskega koeficiente ne poznamo. Druga možnost izračunov je s pomočjo umeritvene premice.



Slika 14: UV - VIS spektrofotometer (Vir: lasten)*

3. METODE IN MATERIALI

Eksperimentalni del seminarske naloge smo izvedli v laboratorijih Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Mariboru.

Pri delu smo uporabili naslednje eksperimentalne metode:

1. Ekstrakcija učinkovin iz bučnih in lanenih semen.
2. Določanje izkoristka ekstrakcije z različnimi topili.
3. Določanje vsebnosti polifenolov.
4. Določanje celokupne koncentracije proteinov s pomočjo Bradfordovega reagenta.
5. Določanje aktivnosti encima alfa - amilaza.

*V nadaljevanju so vsi neoznačeni viri slik lastni

3.1 EKSTRAKCIJA UČINKOVIN IZ BUČNIH IN LANENIH SEMEN

3.1.1. Pripomočki in kemikalije

Pri ekstrakciji smo uporabili naslednje pripomočke in aparature:

- bučna semena (Happy harvest),
- lanena semena (Natura),
- etanol (Honeywell),
- metanol (Honeywell),
- filtrirni papir,
- kavni mlinček (Bosch),
- parafinsko olje,
- acetatni pufer,
- Milli-Q voda,
- merilni valj (100 mL),
- erlenmajerice (100 mL),
- Soxhletov aparat,
- grelnik,
- vrelna stekla,
- termometer,
- merilne bučke (100 mL),
- rotavapor (Büchi R – 114),
- analizna tehnicka (natančnost 0,001 g),
- Vortex,
- stresalnik.

3.1.2. Soxhletova ekstrakcija

Bučna semena smo zmleli s kavnim mlinčkom, jih namestili v filtrirni papir in položili v Soxhletov aparat. V bučko smo nalili 180 mL etanola, dodali vrelno steklo ter jo namestili v posodo s parafinskim oljem in opremili s Soxhletovim aparatom. Segrevali smo do temperature 105 °C. Po treh urah in pol urah so bili izvedeni štirje cikli Soxhletove ekstrakcije.

Postopek smo ponovili z lanenimi semenami v topilu etanol. Obe ekstrakciji smo nato izvedli tudi v metanolu.



Slika 15: Zmleta bučna semena



Slika 16: Lanena semena v pripravi za mletje

Topilo smo iz vseh vzorcev odparili s pomočjo rotavaporja pri temperaturi 40 °C.



Slika 17: Ekstrakcija bučnih semen na Soxhletovem aparatu po njem



Slika 18: Odstranjevanje topila z rotavaporjem



Slika 19: Ekstrakta bučnih in lanenih semen v etanolu



Slika 20: Ekstrakta bučnih in lanenih semen po uparitvi topila

3.1.3. Ekstrakcija z natrijevim acetatnim puferom

Pri ekstrakciji smo uporabljali acetatni pufer, ki smo ga predhodno pripravili tako, da smo v bučko zatehtali 6,62 g natrijevega acetata in 1,16 g CH_3COOH . Dodali smo Milli Q vodo in nato z natrijevim hidroksidom umerjali pH, dokler ta ni dosegel vrednosti 5,3. Nato smo z Milli Q vodo raztopino razredčili do oznake 1 L.

5 g drobno zmletih bučnih in lanenih semen smo zatehtali v erlenmajerico, v katero smo dodali 5 vrelnih kroglic. V merilni valj smo odmerili 30 mL pripravljenega acetatnega pufra in ga dodali zmletim semenom. Na vortexu smo vsebino erlenmajerice dobro premešali, da se suspenzija dobro premešala.

Tako pripravljene vzorce smo pri sobni temperaturi za 90 minut postavili na stresalnik in stresali suspenzijo na 300 rpm (obratov na minuto).

3.2 DOLOČANJE IZKORISTKA EKSTRAKCIJE Z RAZLIČNIMI TOPILI

Pred pričetkom ekstrakcije smo zatehtali maso bučke in vrelnega stekla, nato pa še maso vzorca (semen). Po ekstrakciji in odstranjevanju topila z rotavaporjem, smo ponovno stehtali bučko z vrelnim steklom in ekstraktom.

Izkoristek ekstrakcije smo za posamezen vzorec izračunali po enačbi (2.1):

$$\eta = \frac{m(\text{ekstrakta})}{m(\text{materiala})} \cdot 100 \quad (2.1)$$

3.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIFENOLOV

Za umeritveno premico z galno kislino in določanje celokupne vsebnosti polifenolov smo uporabili naslednje pripomočke in aparature:

3.3.1. Pripomočki in kemikalije

- etanolni ekstrakt bučnih semen,
- metanolni ekstrakt bučnih semen,
- etanolni ekstrakt lanenih semen,
- metanolni ekstrakt lanenih semen,
- galna kislina ($C_7H_6O_5$, p.a., Merck)
- natrijev karbonat (Na_2CO_3 , Merck – Alkaloid),
- Folin - Ciocalteujev reagent (p.a., Merck KGaA)
- etanol (Honeywell, UN1170),
- destilirana voda,
- merilni valj (100 mL),
- merilna bučka (100 mL, 50 mL),
- merilne bučke (10 mL),
- centrifugirke,
- avtomsatska pipeta (100 μL),
- avtomsatska pipeta (10 μL),
- konica (Finnip 5 mL, 10 mL),
- čaša (150 mL),
- epruvete (5 mL),
- UV-VIS Spektrofotometer (Varian),
- računalnik in program Varian Cary WINUV,
- analizna tehnicka (natančnost 0,001 g),
- vodna kopel z grelnikom.

3.3.2. Umeritvena premica z galno kislino

Za pripravo 7,5% raztopine natrijevega karbonata smo v čašo zatehtali 7,50 g trdnega natrijevega karbonata in dopolnili 100 mL bučko do oznake z destilirano vodo.

5,0 mL Folin-Ciocalteujevega reagenta smo odpipetirali v 50 mL bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

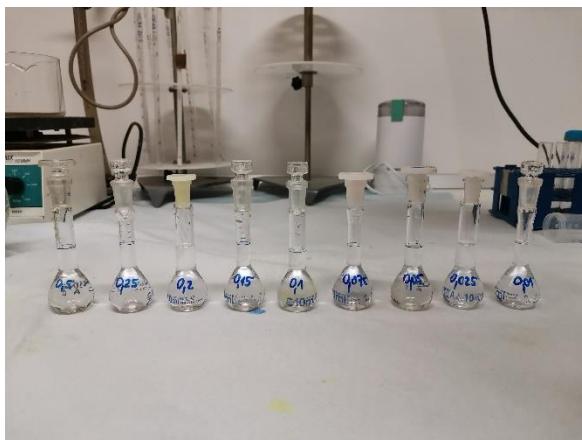
V 100 mL bučko smo dali 100,3 mg trdne galne kisline in dolili etanol do oznake.



Slika 21: Tehtanje na analizni tehnci

Pripravili smo raztopine, ki so vsebovale naslednje koncentracije galne kisline: 0,50 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,20 mg/mL, 0,15 mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,010 mg/mL.

0,5 mL vsake koncentracije smo z avtomatsko pipeto prenesli v centrifugirke. Dodali smo 2,5 mL razredčenega Folin - Ciocalteujevega reagenta in 2,0 mL 7,5% raztopine natrijevega karbonata, v navedenem zaporedju, ki je pomembno za pravilen potek reakcije. Vzorce smo 5 minut inkubirali v vodi s temperaturo 50 °C. Vzorce smo ohladili, na računalniku zagnali program Varian Cary WINUV, priključili spektrofotometer in ga kalibrirali s slepim vzorcem. Absorbanco raztopin smo izmerili pri valovni dolžini 760 nm.



Slika 22: Priprava standardnih raztopin galne kisline



Slika 23: Vzorci raztopin galne kisine in Folin - Ciocaultejevega reagenta

3.3.3. Vsebnost polifenolov v etanolnih in metanolnih ekstraktih

V 10 mL bučke smo zatehtali:

- 103,73 mg ekstrakta lanenih semen v etanolu;
- 111,16 mg ekstrakta bučnih semen v etanolu;
- 103,87 mg lanenih semen v metanolu;
- 105,24 mg bučnih semen v metanolu.

Vzorce smo razredčili z destilirano vodo v bučki do oznake (10 mL). Vsebino vsake bučke smo prelili v epruvete, da smo lahko odpipetirali 0,5 mL vzorca in ga prenesli v centrifugirko. Dodali smo 2,5 mL razredčenega Folin - Ciocalteujevega reagenta in 2,0 mL 7,5 % raztopine natrijevega karbonata. Vzorce smo 5 minut inkubirali v vodi s temperaturo 50 °C. Vzorce smo ohladili, na računalniku zagnali program Varian Cary WINUV, priključili spektrofotometer in ga kalibrirali s slepim vzorcem. Absorbance raztopin smo izmerili pri valovni dolžini 760 nm.



Slika 24: Priprava vzorcev za določanje polifenolov



Slika 25: Priprava vzorcev za določanje polifenolov

3.4 DOLOČANJE CELOKUPNE KONCENTRACIJE PROTEINOV S POMOČJO BRADFORDOVEGA REAGENTA

3.4.1. Pripomočki in kemikalije

- etanolni ekstrakt bučnih semen,
- metanolni ekstrakt bučnih semen,
- etanolni ekstrakt lanenih semen,
- metanolni ekstrakt lanenih semen,
- ekstrakt bučnih semen v acetatnem pufru,
- ekstrakt lanenih semen v acetatnem pufru,
- fosforjeva kislina,
- etanol,
- Vortex,
- UV-VIS Spektrofotometer (Varian),
- čaša,
- analizna tehnicka (natančnost 0,001 g),
- računalnik in program Varian Cary WINUV,
- magnetno mešalo,

- Milli-Q voda,
- Coomassie Blue,
- mikrocentrifugirke.

3.4.2. Umeritvena krivulja za albumin

Za umeritveno krivuljo smo si pripravili raztopine naslednjih masnih koncentracij albumina: 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL in 1,0 mg/mL.

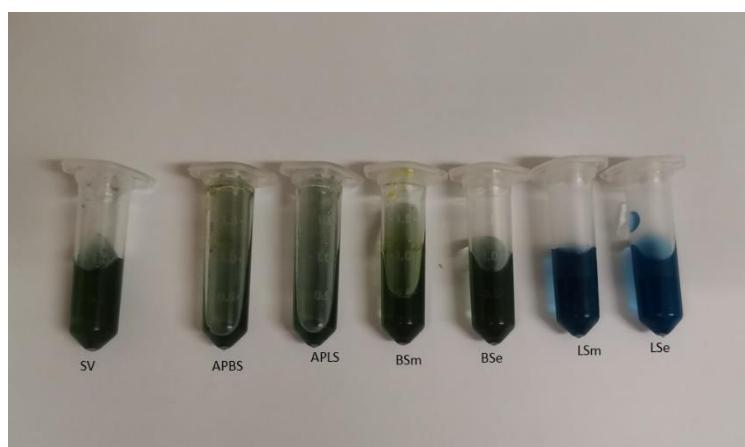
Na spektrofotometru smo izmerili absorbanco in naredili graf masne koncentracije albumina v odvisnosti od izmerjene absorbance.

3.4.3. Postopek določanja proteinov

Z Bradfordovo metodo smo določali celokupno koncentracijo proteinov v ekstraktih iz bučnih in lanenih semen.

Bradfordov reagent smo pripravili tako, da smo v 50 mL 95% etanola raztopili 100 mg Coomassie blue in dodali 100 mL 85% fosforjeve kisline. Raztopino smo do oznake 1 L razredčili z Milli Q vodo. Nazadnje smo raztopino mešali v čaši z magnetnim mešalom, da so se vse komponente dobro raztopile.

V mikrocentrifugirke (1,5 mL) smo odpipetirali 1 mL pripravljenega Bradfordovega reagenta. V slepi vzorec smo dodali 20 µL Milli Q vode, v vzorce pa po 20 µL pripravljenega ekstrakta.



Slika 26: Vzorci ekstraktov semen za določanje proteinov po Bradfordovi metodi

Raztopine smo dobro premešali z uporabo vorteksa in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm.

Koncentracijo proteinov smo nato izračunali po naslednji enačbi (3.1) :

$$c = \frac{A_{595}}{k} \quad (3.1)$$

Kjer so:

- A_{595} ... izmerjena absorbanca vzorca
C ... koncentracija proteinov v vzorcu
 K ... naklon umeritvene krivulje za albumin (0,7489)

3.5 DOLOČANJE AKTIVNOSTI ENCIMA ALFA - AMILAZA

3.5.1. Pripomočki in kemikalije

- etanolni ekstrakt bučnih semen,
- metanolni ekstrakt bučnih semen,
- etanolni ekstrakt lanenih semen,
- metanolni ekstrakt lanenih semen,
- ekstrakt bučnih semen v acetatnem pufru,
- ekstrakt lanenih semen v acetatnem pufru,
- natrijev fosfatni pufer,
- 2M natrijev hidroksid,
- maltoza,
- destilirana voda,
- DNS reagent,
- 1 % raztopina škroba,
- epruvete,
- UV-VIS Spektrofotometer (Varian),
- čaša,
- analizna tehnicka (natančnost 0,001 g),
- računalnik in program Varian Cary WINUV,
- avtomatska pipeta (10 μL),
- konica (Finntip 5 mL, 10 mL),
- Vortex
- vodna kopel z grelnikom.

3.5.2. Umeritvena krivulja za maltozo

Umeritveno krivuljo za maltozo smo pripravili tako, da smo v pripravljenе epruvete odpipetirali naslednje količine maltoze in destilirane vode:

Št. vzorca	Maltoza [mL]	Destilirana voda [mL]
Slepi vzorec	/	1
1	0,1	0,9
2	0,3	0,7
3	0,5	0,5
4	0,7	0,3
5	1	0

Tabela 1: Vzorci raztopin za umeritveno krivuljo za maltozo

Pripravljenim vzorcem različnih raztopin maltoze smo izmerili absorbance ter iz podatkov načrtali umeritveno krivuljo in izračunali naklon.

3.5.3. Določanje encima alfa - amilaza v vzorcih

V vsako od epruvet smo odpipetirali po 0,5 mL encimskega vzorca in 0,5 mL škroba. Za slepi vzorec smo namesto encimskega vzorca uporabili 0,5 mL destilirane vode. Nato smo vsebino epruvet z uporabo vorteksa dobro premešali in jih 3 minute in kubirali pri sobni temperaturi.

Nato smo v vse epruvete dodali 1 mL reagenta DNS in jih v vodni kopeli 5 minut kuhalili pri blagem vretju. Da smo preprečili izparevanje smo vse epruvete pokrili s kovinskimi pokrovčki za epruvete.

Po 5 minutah smo epruvete odstranili iz vodne kopeli in počakali, da se je vsebina ohladila na sobno temperaturo.

Nato smo dodali 10 mL destilirane vode in vsebino dobro premešali.

Vzorcem smo z uporabo UV VIS spektrofotometra izmerili absorbanco pri valovni dolžini 540 nm.

Koncentracijo sproščene maltoze smo izračunali po enačbi (3.2):

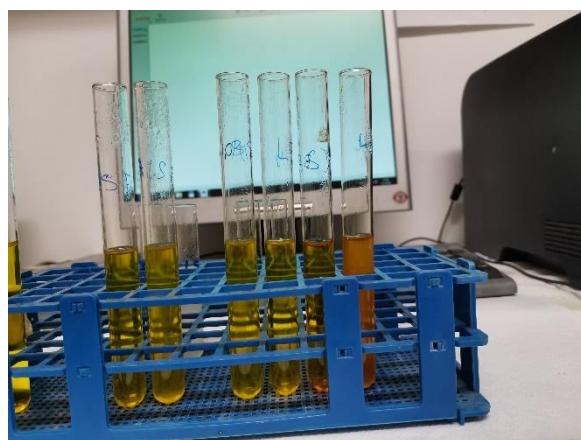
$$mmol\ sproščene\ maltoze = \frac{absorbanca\ vzorca}{naklon} \quad (3.2)$$

Aktivnost encima α -amilaza smo izračunali po enačbi (3.3):

$$\frac{U}{mL}\ encima = \frac{mmol\ sproščene\ maltoze}{volumen\ encimskega\ vzorca * 3\ min} \quad (3.3)$$

Kjer je:

$U/mL\ encima$... specifična aktivnost encima



Slika 27: Vzorci ekstraktov za določanje aktivnosti encima alfa - amilaza

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 EKSTRAKTI

Po ekstrakciji v Soxhletovem aparatu smo v bučki dobili zmes ekstrakta in topila. Ekstrakt bučnih semen je bil zelene barve, lanena semena pa so obarvala topilo svetlo rjavo (slika 19).

Vzorce smo priključili na rotavapor, nastavili temperaturo na 40 °C, pogledali v tabelo podatek za tlak, ki je potreben, da topilo izpari. Tlak smo zniževali počasi, saj bi lahko ob prehitrem znižanju izpareli tudi ekstrakt. Po 1 uri smo prekinili postopek, saj smo predvidevali, da smo odstranili vso topilo. Bolj natančna možnost bi bila, da bi vzorec tehtali do konstantne mase.

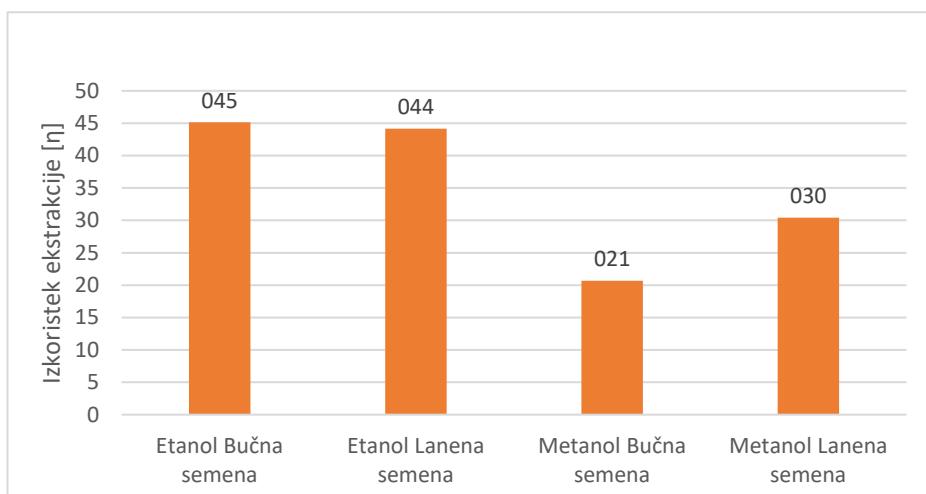


Slika 28: Ekstrakt lanenih semen v etanolu

Postopek Soxhletove ekstrakcije temelji na ekstrakciji pri temperaturi vrelišč topil. Izbrani topili – etanol in metanol – imata temperaturi vrelišč 78,37 °C (etanol) in 64,7 °C (metanol). Veliko bioloških molekul kot so encimi ima temperaturni maksimum, kar pomeni, da beljakovina zaradi toplote denaturira oz. se njena aktivnost zmanjša. Prav zato smo za primerjavo pripravili ekstrakcijo z natrijevim acetatnim pufrom. Ekstrakcija je potekala pri sobni temperaturi, hkrati pa ni bilo uporabljeno topilo, ki bi tudi samo vplivalo na aktivnost encimov.

4.2 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Graf 1 prikazuje izkoristek Soxhletove ekstrakcije bučnih in lanenih semen v obeh izbranih topilih.



Graf 1: Izkoristek po Soxhletovi ekstrakciji bučnih in lanenih semen v etanolu in metanolu

Izkoristek ekstrakcije smo računali po enačbi (2.1). Iz Grafa 1 je razvidno, da je izkoristek po ekstrakciji najboljši pri bučnih semenih, ekstrahiranih v etanolu in znaša 45,15%. Sledi ekstrakt lanenih semen v etanolu z 44,16%. Izkoristek po ekstrakciji bučnih semen v metanolu znaša 20,69%, izkoristek po ekstrakciji lanenih semen v metanolu pa 30,41%.

Glede na izračunan izkoristek, lahko trdimo, da je etanol primernejše topilo za ekstrakcijo učinkovin iz bučnih in lanenih semen.

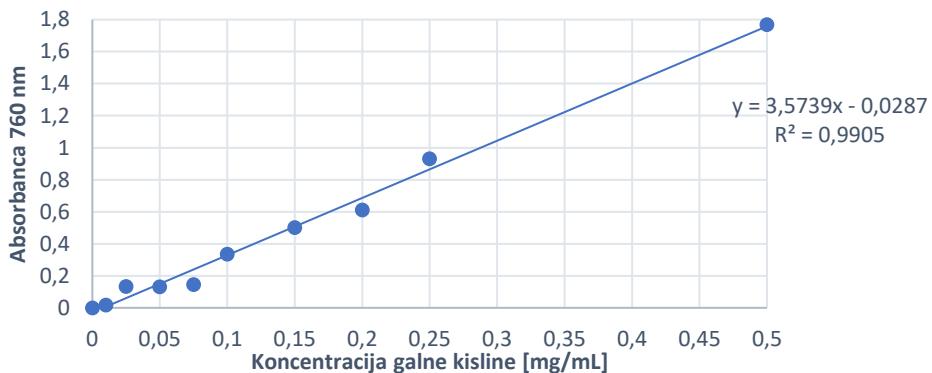
4.3 VSEBNOST POLIFENOLOV

4.3.1. Umeritvena krivulja za galno kislino

V analizni kemiji je kalibracijska krivulja, znana tudi kot standardna krivulja, splošna metoda za določanje koncentracije snovi v neznanem vzorcu s primerjavo neznanega z nizom standardnih vzorcev znane koncentracije.

Za določanje polifenolov v vzorcih neznane koncentracije smo naredili umeritveno krivuljo z galno kislino, ki jo uvrščamo med fenolne kisline.

Umeritvena krivulja za galno kislino



Graf 2: Umeritvena krivulja za galno kislino

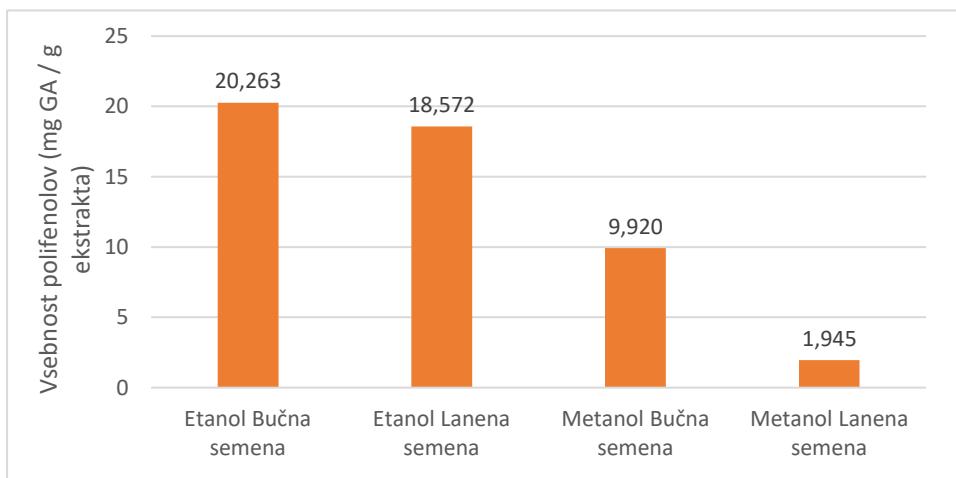
4.3.2. Vsebnost polifenolov

S spektrofotometrom smo določili absorbance, iz katerih smo izračunali vsebnost polifenolov v mg GA/g ekstrakta.

Podatke o izmerjeni absorbanci prikazuje Tabela 2:

VZOREC	Absorbanca pri 760 nm
Bučna semena v etanolu	0,8405
Lanena semena v etanolu	0,6950
Bučna semena v metanolu	0,4018
Lanena semena v metanolu	0,1009

Tabela 2: Absorbanca vzorcev v različnem topilu



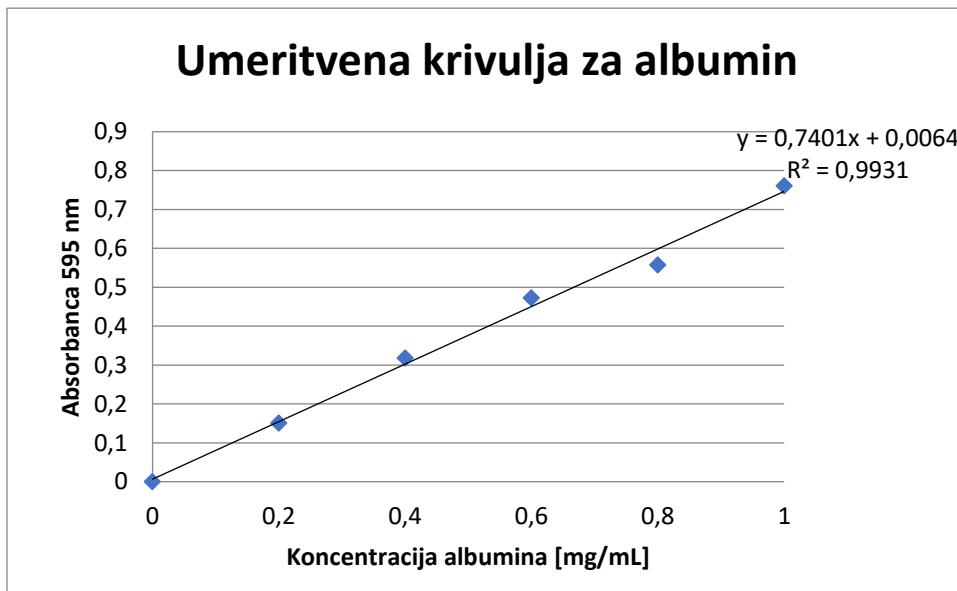
Graf 3: Vsebnost polifenolov mg GA/g ekstrakta

Na Grafu 3 je prikazana vsebnost polifenolov v ekstraktih pridobljenih po ekstrakciji po Soxhletu z uporabo etanola in metanola. Vsebnost polifenolov v naših vzorcih smo določili s pomočjo umeritvene krivulje za galno kislino. Tekom raziskave smo ugotovili, da je etanol primernejše topilo, saj smo po ekstrakciji z etanolom dosegli najvišjo vsebnost polifenolov izraženo v miligramih galne kisline na gram ekstrakta (20,26 mg GA/g ekstrakta). Najnižjo vsebnost totalnih fenolov smo dosegli pri ekstrakciji lanenih semen z metanolom, kar potrjuje našo drugo hipotezo.

4.4 CELOKUPNA VSEBNOST PROTEINOV

4.4.1. Umeritvena krivulja za albumin

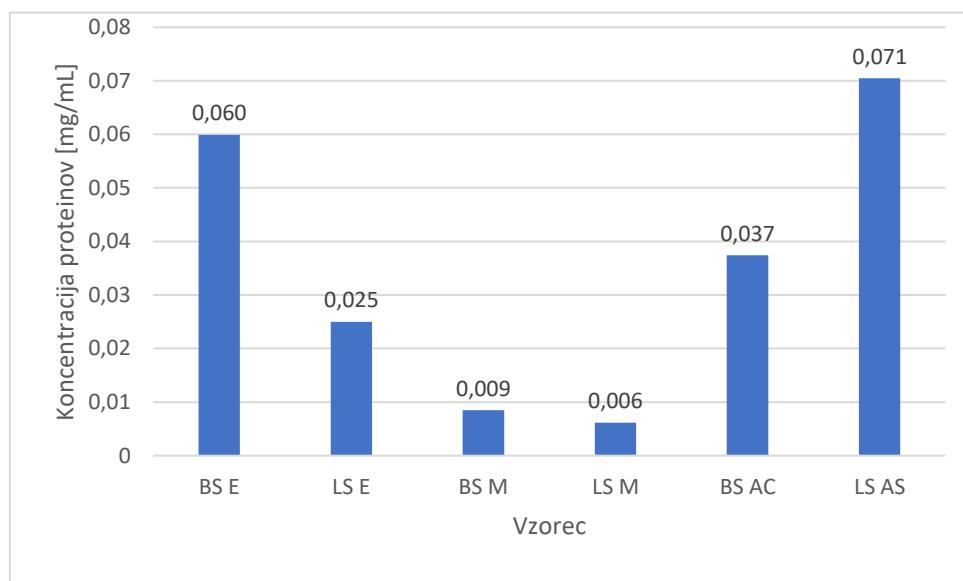
Koncentracijo beljakovin v vzorcih smo določali z Bradfordovo metodo. Za določanje koncentracije beljakovin v vzorcih neznane koncentracije smo naredili umeritveno krivuljo za albumin (Graf 4).



Graf 4: Umeritvena krivulja za albumin

4.4.2. Določanje koncentracije beljakovin

Koncentracijo beljakovin v vzorcih ekstraktov smo določili tako, da smo izmerili absorbanco pri 595 nm z UV-VIS spektrofotometrom in s pomočjo umeritvene krivulje preračunali koncentracijo proteinov v naših vzorcih. Graf 5 prikazuje rezultate koncentracije beljakovin v naših vzorcih. Ugotovili smo, da je bila najvišja koncentracija beljakovin (0,07 mg/mL) določena v vzoru lanenih semen, ki smo ga pridobili z acetatnim pufrom. Prav tako je visoka vsebnost beljakovin potrjena v vzoru bučnih semen, ki smo ga pridobili z ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo topila etanola (0,06 mg/mL).

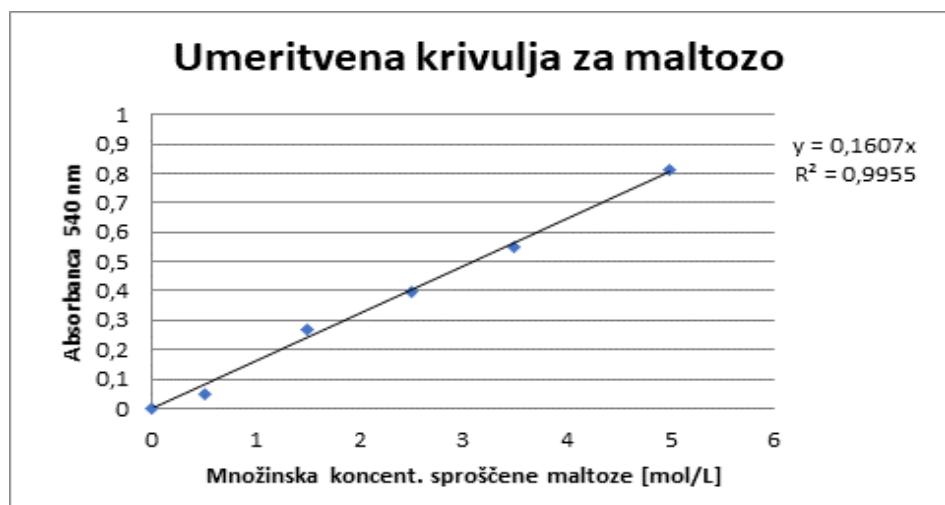


Graf 5: Koncentracija beljakovin v različnih vzorcih v 100 g materiala

4.5 AKTIVNOST alfa - amilaze

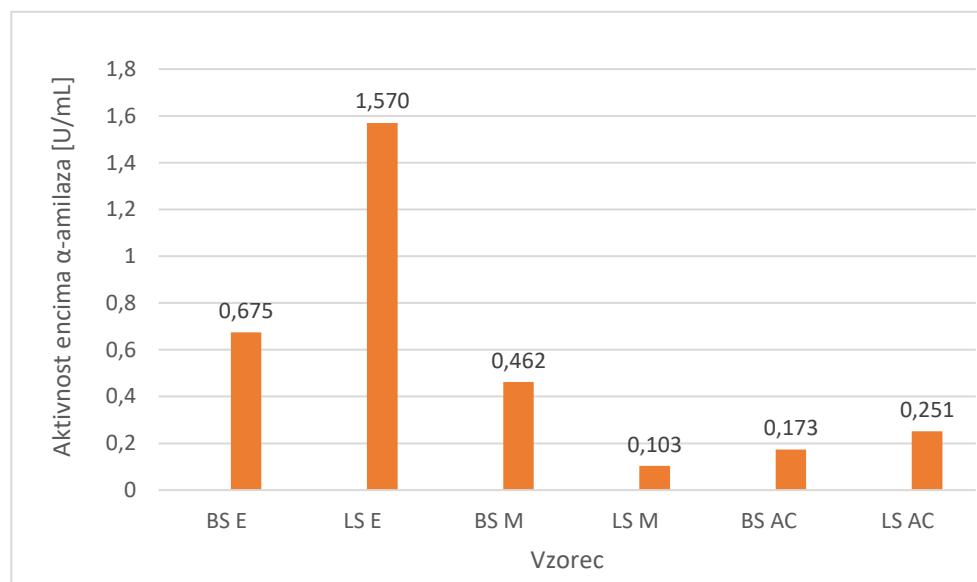
4.5.1. Umeritvena krivulja za maltozo

Z namenom, da bi izračunali aktivnost encima alfa - amilaza v vzorcih iz bučnih in lanenih semen smo najprej pripravili umeritveno krivuljo za maltozo (Graf 6) in izračunali naklon premice. S pomočjo naklona smo nato izračunali koncentracijo spročene maltoze in v nadaljevanju preko izmerjene absorbance izračunali aktivnost encima alfa - amilaza v naših vzorcih.



Graf 6: Umeritvena krivulja za maltozo

Graf 7 prikazuje rezultate aktivnosti encima alfa - amilaza v ekstraktih iz bučnih in lanenih semen po ekstrakciji po Soxhletu z etanolom in metanolom ter z ekstrakcijo na stresalniku z acetatnim pufrom. Iz rezultatov je razvidno, da je najvišja aktivnost encima alfa - amilaza dosežena v ekstraktu iz lanenih semen, ki smo ga pridobili z ekstrakcijo po Soxhletu z etanolom in dosegla 1,57 U/mL aktivnosti encima. Če primerjamo rezultate aktivnosti encima v ekstraktih pridobljenih z metanolom lahko ugotovimo, da so aktivnosti nižje. Tudi aktivnosti encima iz ekstraktov, ki smo jih pridobili z acetatnim pufrom so nižje, kar pomeni, da je najbolj učinkovita ekstrakcija po Soxhletu z etanolom, kar ovrže našo tretjo hipotezo.



Graf 7: Aktivnost encima alfa - amilaza v vzorcih

5. ZAKLJUČEK

Cilj raziskovalne naloge je bil pridobiti rezultate o vsebnosti aktivnih učinkovin iz bučnih in lanenih semen. Tako smo uspešno pripravili ekstrakte iz bučnih in lanenih semen s Soxhletovo ekstrakcijo in ekstrakcijo z acetatnim pufrom. V nadaljevanju smo določili koncentracijo beljakovin, vsebnost polifenolov in aktivnost encima alfa - amilaza v posameznih vzorcih.

Iz rezultatov smo ugotovili, da so lanena in bučna semena vir polifenolov, kar potrjuje prvo hipotezo.

Vpliv topila je pomemben dejavnik pri pridobivanju aktivnih učinkovin, kar smo dokazali in utemeljili v rezultatih. Etanol je v primerjavi z metanolom primernejše topilo za ekstrakcijo polifenolov, s čimer smo potrdili tudi drugo hipotezo. Etanol pa je tudi najprimernejše topilo za določanje alfa – amilaze v vzorcih, s čimer ovržemo tretjo hipotezo.

Vsebnost beljakovin je bila najvišja v natrijevem acetatnem pufru obeh vrst semen.

Polifenoli v semenih zagotovo uvrščajo preiskovani vrsti semen med »superživila,« saj delujejo antioksidativno, prispevajo k preprečevanju razvoja nekaterih kroničnih bolezni, kot so kardiovaskularne bolezni, rakava obolenja, diabetes, osteoporiza.

Eden pomembnejših podatkov je aktivnost encima alfa - amilaza v bučnih in lanenih semenih, saj bi lahko s dodatkom moke iz bučnih in lanenih semen pomembno vplivali na učinkovitost priprave pekovskih izdelkov. Tekom eksperimentalnega dela raziskovalne naloge smo dokazali, da je aktivnost encima alfa - amilaza visoka, kar pa bi vsekakor vplivalo na pripravo pekovskih izdelkov, saj encim alfa - amilaza uspešno pripomore k hitrejšemu in učinkovitejšemu procesu vzhajanja testa.

V bodoči bi bilo smiselno uporabiti moko iz bučnih in lanenih semen pri procesu peke kruha in tako ugotoviti, kako dodatek te pomembne surovine vpliva na kvaliteto končnega pekovskega izdelka.

6. LITERATURA

- [Allott, A. & Mindorff, D., 2014. Biology. Oxford: Oxford University Press.](#)
- [ANTIOKSIDANTI v živilstvu. \(2000\). Ljubljana: Biotehniška fakulteta](#)
- [Barber, S., 2015. Spektrofotometrične metode za določanje antioksidativnosti spojin, namenjenih obdelavi tekstilnih materialov. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo](#)
- [Podgornik Reš R., \(2003\). Čarobni svet buč. Ljubljana: ČZD Kmečki glas, d.o.o..](#)
- [<https://www.webmd.com/diet/health-benefits-pumpkin-seeds#1>](#)
- [<https://kids.britannica.com/kids/article/seed/399591#:~:text=A%20seed%20contains%20a%20miniature,this%20material%20is%20called%20endosperm.>](#)
- [<https://www.webmd.com/diet/health-benefits-pumpkin-seeds#>](#)
- [<https://www.tasteofhome.com/collection/10-ways-to-cook-with-flaxseed/>](#)
- [<https://www.medicalnewstoday.com/articles/301506>](#)
- [<https://www.mayoclinichealthsystem.org/hometown-health/speaking-of-health/flaxseed-is-nutritionally-powerful>](#)
- [<https://www.medicalnewstoday.com/articles/301506>](#)
- [\[https://www.healthline.com/nutrition/foods-high-in-antioxidants#TOC_TITLE_HDR_6\]\(https://www.healthline.com/nutrition/foods-high-in-antioxidants#TOC_TITLE_HDR_6\)](#)
- [<https://www.webmd.com/diet/foods-high-in-polyphenols>](#)
- [<https://en.wikipedia.org/wiki/Seed>](#)
- [<https://kids.britannica.com/kids/article/seed/399591>](#)
- [<https://www.sciencedaily.com/releases/2015/07/150722144709.htm>](#)
- [<https://sl.wikipedia.org/wiki/Dvokali%C4%8Dnice>](#)
- [<https://eucbeniki.sio.si/nar6/2007/index3.html>](#)
- [<https://sl.wikipedia.org/wiki/Enokali%C4%8Dnice>](#)
- [<https://88acres.com/pages/flax-seeds>](#)
- [<https://www.medicalnewstoday.com/articles/263405#risks>](#)
- [<https://www.atlasbig.com/en-us/countries-pumpkin-production>](#)
- [\[https://www.healthline.com/nutrition/11-benefits-of-pumpkin-seeds#TOC_TITLE_HDR_5\]\(https://www.healthline.com/nutrition/11-benefits-of-pumpkin-seeds#TOC_TITLE_HDR_5\)](#)
- [<https://www.prehrana.si/clanek/181-antioksidanti>](#)
- [<https://www.prehrana.si/clanek/181-antioksidanti>](#)
- [<http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Polifenoli>](#)
- [<https://spot.gov.si/sl/dejavnosti-in-poklici/dejavnosti/proizvodnja-zdravilnih-ucinkovin/>](#)
- [<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/soxhlet-extraction>](#)
- [<https://sl.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrija>](#)
- [<https://www.youtube.com/watch?v=WbEspx4Ydos>](#)
- [<https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/healthyliving/antioxidants>](#)

- https://zpm-mb.si/wp-content/uploads/2021/09/S%C5%A0_Ke-mija_Olj%C4%8Dni_listi_vir_aktivnih.pdf
- https://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor