

Gimnazija Celje – Center
(program: splošna gimnazija)

BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V PLODOVIH ARONIJE (*ARONIA MELANOCARPA*) IN NJIHOV VPLIV NA RAST KVASOVK (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

RAZISKOVALNA NALOGA

Avtorja:

Klavdija Bastl, 4. e

Rok Gorenšek, 4. b

Mentorici:

Jožica Kovač, prof.

Majda Kamenšek Gajšek, prof.

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2016

ZAHVALA

Za vso pomoč, strokovno znanje in podporo pri nastajanju raziskovalne naloge se najlepše zahvaljujeva najinima mentoricama – profesoricama Jožici Kovač in Majdi Kamenšek Gajšek. Z njuno naklonjenostjo in strokovnostjo nama je uspelo uspešno realizirati zastavljeni raziskovalni projekt.

Zahvala gre tudi celotnemu učiteljskemu zboru Gimnazije Celje - Center, ki nama je v času priprav in raziskovanja nudili oporo in pomoč ter izkazal razumevanje glede odsotnosti od pouka. Še posebej se zahvaljujeva našemu ravnatelju, ki je podprt najin projekt in nama tako omogočil poglabljanje in nadgrajevanje pridobljenega znanja ter usvajanje raziskovalnega dela.

Iskreno se zahvaljujeva tudi doc. dr. Branki Mozetič Vodopivec, dekanji Visoke šole za vinogradništvo in vinarstvo v Novi Gorici, kjer sva v tamkajšnjih laboratorijih izvedla zahtevnejše kemijske poskuse in pridobila dragocene izkušnje.

Posebno bi se rada zahvalila tudi gospodu mag. Andreju Planinšku, vodju Oddelka za kemijske analize živil, vod in drugih vzorcev okolja Celje, ki deluje v okviru Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano, za pomoč pri izvedbi poskusov.

Še enkrat hvala vsem, ki sva jih srečevala pri najinem raziskovanju – za vso izkazano prijaznost, razumevanje in strokovno znanje.

Hvala vsem, ki ste verjeli v najin uspeh!

POVZETEK

V okviru raziskovalne naloge sva želeta ugotoviti vsebnost antioksidantov, natančneje antocianinov v plodovih aronije (*Aronia melanocarpa*). Prav tako sva ugotavljala, kako vplivajo te biološko aktivne snovi na rast kvasnih celic (*Saccharomyces cerevisiae*) v gojišču.

Za analizo smo iz zamrznjenih plodov aronije pripravili sok, kateremu smo v nadalnjih poskusih izmerili količino prisotnih sladkorjev, določili pH in na podlagi rezultatov raziskav izračunali masno koncentracijo antocianinov v aroniji.

Za ugotavljanje vplivov aktivnih snovi iz aronije na žive organizme smo izbrali kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, saj so evkarionti, ki imajo precej podobnosti s človeškimi celicami. Prav tako je znana zgradba njihovega genoma.

Najprej smo ugotovili ustrezno koncentracijo glukoze, ki jo suhe kvasovke potrebujejo za aktivacijo in rast v gojišču. Nato smo izvedli poskus, kjer smo jim dodali sok aronije in hkrati izvedli kontrolne poskuse S spektrofometrijo smo skusali potrditi rezultate o številu kvasnih celic, ki smo jih dobili s štetjem s hemicitometrom.

Aronijin sok, ki smo ga dodali kvasnim celicam v gojišču, je povečal njihovo število v primerjavi s kontrolnimi posksui. Skupek antioksidantov v soku aronije je poveča število kvasnih celic, vendar nismo mogli ugotoviti, kako na rast in delitev kvasnih celic vpliva posamezen antocianin.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	8
1.1. Opis raziskovanja zastavljenega problema.....	8
1.2. Antioksidanti in njihov pomen za organizme	9
1.3. Visoko reaktivne zvrsti s prooksidativnim delovanjem	10
1.3.1. Prosti radikali	10
1.3.2. Reaktivne kisikove zvrsti (ROS).....	11
1.4. Oksidativni stres.....	11
1.5. Antioksidanti.....	12
1.5.1. Delitev antioksidantov.....	12
1.5.2. Delovanje antioksidantov.....	13
1.5.3. Viri antioksidantov.....	14
1.5.4. Flavonoidi in polifenoli.....	14
1.6. Aronija in antioksidanti v njej	17
1.7. Kvasovke in njihov metabolizem.....	18
1.8. Vpliv antioksidantov aronije na metabolizem ter pospešitev rasti in razmnoževanja	21
2. HIPOTEZE	22
3. IZBOR IN PREDSTAVITEV RAZISKOVALNIH METOD	23
3.1. Material	23
3.2. Metode	23
3.2.1. Priprava soka aronije (vzorca)	23
3.2.2. Določanje sladkorjev v vzorcu.....	23
3.2.3. Določanje pH v vzorcu	25
3.2.4. Določanje antocianinov v vzorcu.....	25
3.2.5. Izbor gojišča za kvasovke in njegova standardizacija.....	26
3.2.6. Priprava kulture in štetje kvasnih celic iz gojišča po metodi uporabe hemocitometra (Bürker – Türkove komore).....	26
3.2.7. Štetje kvasovk iz gojišča in določanje gostote gojišča z metodo spektrofotometrije	27
4. PREDSTAVITEV POTEKA RAZISKOVALNEGA DELA	29
4.1. Izvedba	29
4.1.1. Postopek priprave vzorca.....	29
4.1.2. Postopek določanja količine sladkorjev v vzorcu.....	30
4.1.3. Določanje pH vzorca	31
4.1.4. Postopek določanja antocianinov v vzorcu.....	32
4.1.5. Izbor osnovnega gojišča za kvasovke in njegova standardizacija	36
4.1.6. Načrt in izvedba poskusa in kontrol – raziskovalne naloge	38
4.1.7. Načrt in izvedba kontrole s spektrofotometrijo	41
5. REZULTATI.....	42
5.1. Rezultati analize soka aronije.....	42
5.1.1. Količina sladkorja v vzorcu	42
5.1.2. pH vzorca.....	42
5.1.3. Količina antocianinov v vzorcu	42

5.2. Rezultati bioloških raziskav	44
5.2.1. Rezultati štetja kvasovk iz poskusnih gojiščih z Bürker–Türkovo komoro za ugotavljanje optimalne rasti populacije kvasovk	44
5.2.2. Rezultati poskusa z aronijo in kontrol	50
5.2.3. Rezultati merjenja transmisije s spektrofotometrom pri 600 nm v vzorcu populacije, kjer smo kvasnim celicam dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih.....	55
6. RAZPRAVA.....	58
7. ZAKLJUČEK.....	61

KAZALO SLIK

Slika 2: Reaktivne kisikove zvrsti.....	11
Slika 5: Optična izomera glukoze kot primer zrcalno simetričnih podob	23
Slika 7: Prehod linearno polarizirane svetlobe skozi optično aktivno spojino	24
Slika 9: Bürker - Türkova števna ploščica.....	27
Slika 10: Plodovi aronije.....	29
Slika 11: Homogena kaša plodov aronije	30
Slika 12: Sok aronije.....	30
Slika 13: Ročni refraktometer.....	31
Slika 14: Omočenost prizme z vzorcem (C ustrezен).....	31
Slika 15: Merilnik pH in vmesnik LabQuest Vernier	32
Slika 16: Filtri s premerom por 0,45 µm	33
Slika 17: Filtriranje.....	33
Slika 18: Vzorca s 5x (desno) in 10x razredčitvijo (levo).....	34
Slika 19: Vzorci razredčitev od leve proti desni (20x, 30x, 50x, 10x, 5x) in slepi vzorec (desno)	34
Slika 20: razredčina soka v KCl (desno) in v Na-acetatnem pufru (levo)	35
Slika 21: Nastanitev gojišč.....	37
Slika 22: Nastavitev kontrol in poskusa	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Načrt - skica sestave osnovnih gojišč	36
Preglednica 2: Načrt - skica izvedbe poskusa in kontrol.....	38
Preglednica 3: Načrt poskusa vpliva soka aronije na rast populacije kvasovk in kontrolni poskusi	40
Preglednica 4: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini $0,04 \text{ mm}^2$ po 30 minutah.....	44
Preglednica 5: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini $0,04 \text{ mm}^2$ po 90 minutah.....	45
Preglednica 6: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini $0,04 \text{ mm}^2$ po 240 minutah	46
Preglednica 7: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini $0,04 \text{ mm}$ po 420 minutah	47
Preglednica 8: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini $0,04 \text{ mm}$ po 1200 minutah	48
Preglednica 9: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih po 0 minutah.....	50
Preglednica 10: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih po 120 minutah.....	51
Preglednica 11: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih po 240 minutah.....	52
Preglednica 12: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih po 360 minutah.....	53
Preglednica 13: Transmisija in optična gostota v kontroli 5	55
Preglednica 14: Transmisija in optična gostota v kontroli 4	55
Preglednica 15: Transmisija in optična gostota v kontroli 3	55
Preglednica 16: Transmisija in optična gostota v kontroli 3, druga meritev	55
Preglednica 17: Transmisija in optična gostota v kontroli 2	56
Preglednica 18: Transmisija in optična gostota v kontroli 1	56
Preglednica 19: Transmisija in optična gostota v poskusu z aronijo	56

1. UVOD

1.1. Opis raziskovanja zastavljenega problema

Sva dijaka Gimnazije Celje – Center in izdelala sva raziskovalno naložo z naslovom Biološko aktivne snovi v plodovih aronije (*Aronia melanocarpa*) in njihov vpliv na rast kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*).

Namen te raziskovalne naloge je ugotoviti vpliv antioksidantov iz soka aronije na celice kvasovk. Razlog za izbiro soka aronije je ravno v velikih količinah antioksidantov, ki naj bi jih po podatkih iz literature vsebovala. Antioksidanti pospešujejo rast in razmnoževanje celic. Kolikšen pa je njihov vpliv, sva želela ugotoviti z raziskovalno nalogo in to tudi dokazati.

Antioksidanti so molekule, ki lovijo proste radikale in tako preprečujejo oksidacijo drugih molekul, ki sodelujejo pri presnovi. Prosti radikali, ki se pojavljajo v celicah v presnovnih procesih, negativno vplivajo na druge redoks reakcije.

Da bi lahko določila in razumela vpliv aronije na kvasovke, sva sok aronije najprej kemijsko kvantitativno analizirala, določila vsebnost sladkorjev in antioksidantov in le-te razvrstila v osnovne skupine. Nato sva z dodatkom soka aronije kvasovkam pridobila podatke o njegovem vplivu kvasne celice.

Glive kvasovke so evkariontski enocelični organizmi, ki jih pogosto vključujemo v različne raziskave, saj so evkaritonci in po delovanju podobni človeškim celicam.

Aronija je ena izmed zdravilnih rastlin, katere plodovi se zaradi visoke vsebnosti antioksidantov uporabljajo pri okrevanju in regeneraciji bolnikov, ki so jih zdravili s kemoterapijo.

Z eksperimentalnim delom sva preverjala, če aronija vsebuje biološko aktivne snovi med katerimi so tudi antioksidanti in če je rast kvasovk v kontroliranem gojišču res pospešena ob dodatku soka aronije.

1.2. Antioksidanti in njihov pomen za organizme

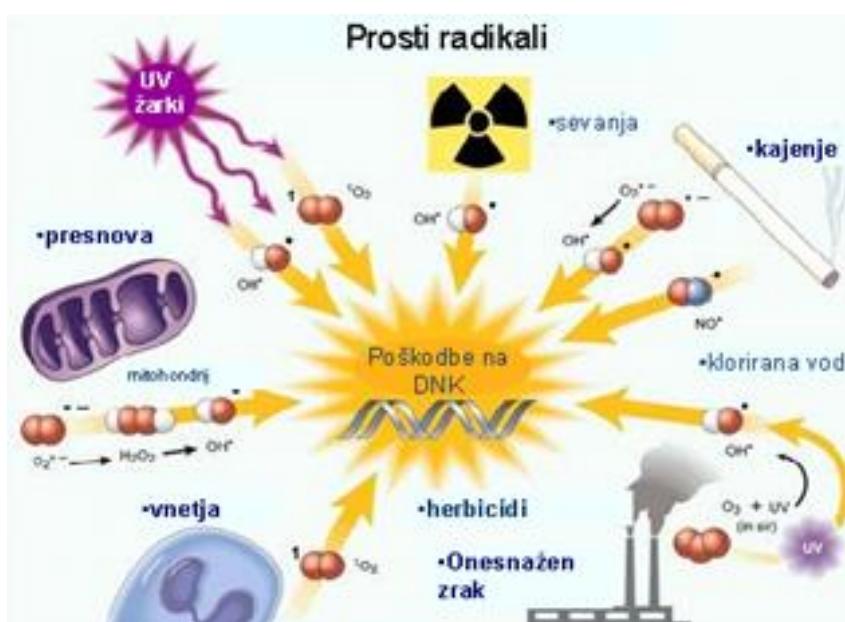
V številnih rezultatih raziskav je omenjeno, da mnoge rastline sintetizirajo spojine z antioksidativno učinkovitostjo. Le-te veljajo za naravni vir obrambe celic pred visoko reaktivnimi zvrstmi s prooksidativnim delovanjem (prostimi radikali in reaktivnimi kisikovimi zvrstmi). Ti delci nastanejo v celicah (endogeno) med številnimi fiziološkimi presnovnimi procesi npr. redukcijo kisika v dihalni verigi, med oksidativnim metabolizmom, različnimi prenašalnimi sistemmi, avtooksidacijo kisika s celičnimi reducenti (npr. NADH), Fentonovo reakcijo ob prisotnosti železovih ionov, lahko pa tudi kot posledica različnih dejavnikov okolja (eksogeno). Povzročijo lahko različne poškodbe celičnih struktur ali organelov. Reagirajo lahko z lipidi, proteini in DNK. Po podatkih je njihovo delovanje povezano s pojavom številnih bolezni, kot so ateroskleroza, Parkinsova bolezen, Alzheimerjeva bolezen, kap, rak, staranje, demenca in druge.

Pred njihovim učinkom nas varujejo antioksidanti kot so vitamini (A, C, E), beta karoten, flavonoidi, fenolne spojine, katehini in encimi. Nekatere antioksidante (endogene) telo sintetizira samo, druge (eksogene) pa dobimo s hrano (Korošec, 2000).

1.3. Visoko reaktivne zvrsti s prooksidativnim delovanjem

1.3.1. Prosti radikali

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom. So visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture. Nastajajo kot rezultat normalne celične presnove (celičnega dihanja) in kot posledica dejavnikov okolja: UV in gama žarkov, topote, kajenja, onesnaževanja okolja. Njihov nastanek povzročajo tudi nekatere kemikalije in zdravila (aflatoksi, alkohol, analgetiki, anestetiki, itd.) (Korošec, 2000).



Slika 1: Dejavniki okolja, ki povzročajo nastanek visoko reaktivnih zvrsti

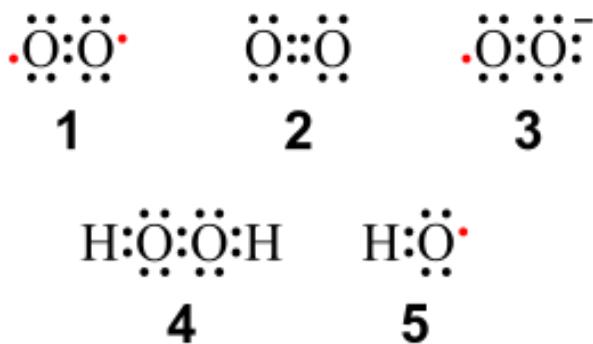
Radikali so zaradi težnje po pritegnitvi še enega elektrona neobstojni in kemijsko reaktivni. V večini primerov reagirajo kar s snovmi, ki jih srečajo v svoji neposredni okolici, in sicer na tri načine:

- tako, da pritegnejo elektron iz neke spojine,
- da se adirajo na dvojno vez ali
- da reagirata dva radikala med seboj.

V prvih dveh primerih nastane nov radikal, ki nadalje reagira po enem od omenjenih načinov. To navadno vodi v nastajanje stabilnejših in manj reaktivnih radikalov. V tretjem primeru pa nastane nova nereaktivna spojina.

1.3.2. Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Med reaktivne kisikove zvrsti prištevamo tripletni kisik (${}^3\text{O}_2$) – oznaka 1, singletni kisik (${}^1\text{O}_2$) – oznaka 2, superoksidni anion ($\text{O}_2\cdot^-$) – oznaka 3, vodikov peroksid (H_2O_2) – oznaka 4, hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) – oznaka 5, radikal dušikovega oksida ($\text{NO}\cdot$), peroksilni radikal ($\text{ROO}\cdot$) (Droge, 2002).



Slika 2: Reaktivne kisikove zvrsti

1.4. Oksidativni stres

Je definiran kot porušeno ravnotežje med nastajanjem visoko reaktivnih zvrst s prooksidativnim delovanjem in/ali zmanjšano učinkovitostjo antioksidantov. Oksidativni stres je neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine visoko reaktivnih kisikovih zvrst na celice in tkiva v organizmu. Prosti radikali in reaktivne kisikove zvrsti pomembno prispevajo k sproženju začetka motenj v delovanju celic in posredno določenih bolezenskih procesov.

1.5. Antioksidanti

Organizmi so razvili encimske in neencimske antioksidacijske obrambne mehanizme za preprečitev nastajanja oz. zmanjšanje visokoreaktivnih kisikovih zvrsti. Antioksidanti preprečujejo oksidativni stres z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov in z odstranjevanjem ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul. Nekatere antioksidante telo sintetizira samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (vitamine, kovinske ione).

1.5.1. Delitev antioksidantov

Poznamo encimske antioksidante, ki delujejo v glavnem intracelularno in neencimske (askorbinska kislina, glutation, vitamin E, β -karoten), ki pa delujejo intra- in ekstracelularno.

1.5.1.1. Delitev glede na izvor

Glede na izvor jih delimo na:

- naravne antioksidante: fenolne komponente, karotenoidi, flavonoidi, flavonoli
- sintetične antioksidante.

Naravni antioksidanti se pogosto nahajajo v rastlinah kot fenolne komponente (flavonoidi, folne kisline, alkoholi, tokoferoli), askorbinska kislina in karotenoidi.

Sintetični antioksidanti so pogosto uporabni kot aditivi v hrani, saj zavirajo oksidacijo. So poceni in tako široko uporabni kot konzervansi živil. V raziskavah je omenjeno, da povzročajo raka, zato je industrija vedno bolj usmerjena k uporabi naravnih antioksidantov, med katerimi je zanimiva tudi aronija.

1.5.1.2. Delitev glede na način delovanja

- Primarni antioksidanti nastajajo v organizmu ali pa jih tvorijo mikroorganizmi. Tvorbo prostih radikalov preprečujejo tako, da jih spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verigo avtooksidacije. Med primarne antioksidante sodijo encimi, SOD, glutation peroksidaza, ceruloplazmin ...
- Sekundarni antioksidanti zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo. To dosežejo tako, da reagirajo s kovinskimi ioni, ki so katalizatorji oksidacije, odvzemajo kisik iz medija, absorbirajo UV svetlobo in deaktivirajo aktivni kisik.
- Tertiarni antioksidanti popravljajo poškodbe, ki jih v strukturi celice povzročajo prosti radikali. (encimi, ki popravljajo poškodbe DNA; metionin sulfooksid reduktaza) (Raspor in sod., 2000).

Povzeto po: Anja Mahne Opatić, Vpliv modificirane atmosfere na skladiščne sposobnosti sliv (*Prunus domestica*); magistrsko delo, Ljubljana 2014

1.5.2. Delovanje antioksidantov

Lipidna peroksidacija je nekontrolirana oksidacija lipidov v biološki membrani, ki vodi do sprememb v njeni strukturi in funkciji. Povzroči jo lahko hidroksilni radikal, oziroma vsak radikal, ki lahko odvzame vodikov atom lipidni molekuli.

Pri reakciji med molekulo lipida (RH) in hidroksilnim radikalom nastane lipidni radikal (1). Ta reagira s $^3\text{O}_2$ v peroksilni radikal (2), ki v naslednji stopnji (3) odvzame vodikov atom novi molekuli lipida. Produkta reakcije sta hidroperoksid in nov lipidni radikal. Verižni reakciji (2) in (3) vodita v nizu nadalnjih reakcij v končne alkane, alkene, aldehyde, ketone, itd. Mnoge od teh spojin (npr. aldehydi) lahko difundirajo skozi membrane v druge dele celice, kjer reagirajo z nukleinskimi kislinami (mutacije, rak) in proteini (avtoimuna obolenja).

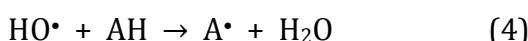


Povzeto po: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji, antioksidanti.

Antioksidanti lahko zavirajo oksidacijo na dva načina:

I. Prenos vodikovega atoma

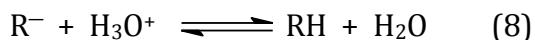
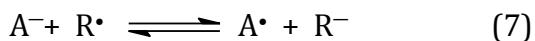
Najpogosteje antioksidant poseže v reakcijo avtooksidacije tako, da odda vodikov atom radikalu (4), ki bi sicer sprožil lipidno peroksidacijo, oziroma hidroperoksilnemu radikalu (5), sam pa preide v bolj stabilen radikal, ki ne more sprožiti lipidne peroksidacije.



II: Prenos elektrona

Reakcija poteka v dveh stopnjah. Antioksidant (AH) protolitsko reagira z vodo v anion in oksonijev ion (6). Sledi prenos elektrona na radikal (7), ki v naslednji stopnji reagira v prvotno spojino (8).

Antioksidanti lahko na podoben način reagirajo tudi z radikali, ki nastanejo v kasnejših fazah lipidne peroksidacije (npr. z R-OO $^\bullet$).



Oba mehanizma, prenos vodikovega atoma in prenos posameznega elektrona, potekata vzporedno, vendar z različno hitrostjo (Wright in sod., 2001).

Čim večji negativni redukcijski potencial ima spojina (močnejši reducent je), tem lažje bo oddala elektrone spojini z manj negativnim ali pozitivnim redukcijskim potencialom in se pri tem sama oksidirala. Čeprav je redukcijski potencial odločilni dejavnik pri tem, kako bo neka spojina delovala kot antioksidant, se je pokazalo, da k celotni učinkovitosti prispevajo tudi druge fiziološko-kemijske lastnosti. Hidrofilnost oz. hidrofobnost sta pomembni lastnosti antioksidantov, saj je od njiju odvisno ali bo ta lahko prišel do mesta delovanja oziroma kako dobro se bo absorbiral v organizmu.

1.5.3. Viri antioksidantov

Naravni viri antioksidantov so sadje, zelenjava, semena, žita, jagodičevje, vino, čaj, olivno olje in aromatične rastline. V rastlinah se antioksidanti lahko nahajajo v katerem koli delu rastline, npr. v steblu, listih, cvetu, plodu, semenih.

1.5.4. Flavonoidi in polifenoli

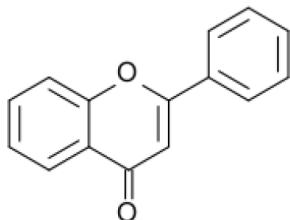
Polifenoli so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki so prisotni v vseh rastlinah. Spoznamo jih po aromatskem obroču z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Nastajajo iz fenilalanina ali njegovega prokurzorja, šikiminske kisline. V rastlinah skoraj povsod najdemo fenolne kisline (vanilinska, siringinska, galna, fenilocetne kisline, hidroksicimetne kisline). Enostavni fenoli (C_6) niso razširjeni. (Gordon, 2003)

Splošno velja, da nas polifenoli ščitijo pred boleznimi in ugodno vplivajo na zdravje, ker varujejo naše telo pred oksidacijskim stresom. Trije najbolj znani polifenoli so flavonoidi, antocianidi in resveratrol. (Boyer R., 2008)

Flavonoidi so spojine s 15 C-atomi in osnovno strukturo ($C_6-C_3-C_6$), ki se imenuje flavan. So topni v vodi in jih najdemo v naravi kot 3-O-glikozide, kar pomeni, da so na C-3 atomu vezani različni sladkorji. Poznamo jih več kot 5000, od tega je največ antocianov, katehinov, procianidinov, flavonov in flavonolov. Flavonoidi se tako kot vsi drugi polifenoli nahajajo v živilih rastlinskega izvora. (Gordon, 2003)

Z uživanjem hrane in pijač, ki vsebujejo visoke vrednosti flavonoidov, pripomoremo k zmanjšanju nastanka bolezni modernega življenja kot sta rak in ateroskleroza (Gordon, 2003). 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. (Boyer R., 2008) V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. (Gordon, 2003)



Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov

Flavonoide lahko razdelimo v naslednje podskupine (Verhovšek, 1996):

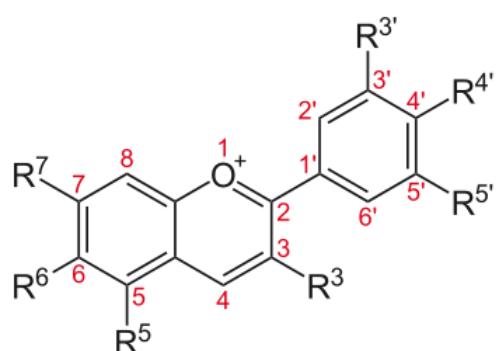
- flavan-3-ole (catechins, epicatechins),
- proantocyanidines (dimers and trimers of catechins and epicatechins),
- anthocyanidins (cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin),
- flavonols (quercetin, kaempferol, apigenin, luteolin).

1.5.4.1. Antocyanidini in antocianini

Antocyanidini so zelo pomembni pigmenti v rastlinah. Topni so v vodi in jih uporabljamo kot naravna barvila. Ti pigmenti dajejo svetlo oranžno, roza, rdečo, vijolično in modro barvo cvetom, plodovom in drugim rastlinskim organom. Nekatere od njih najdemo v cvetovih in plodovih bezga. Njihova barva je odvisna od pH, tako so antocyanidini pri nižjem pH obarvani rdeče, z naraščanjem pH pa barva prehaja v modro. Njihova stabilnost je odvisna od pH, temperature, kemijske strukture, svetlobe, vsebnosti kisika, encimov, flavonoidov, proteinov in kovinskih ionov. V rastlinah se nahajajo v obliki mono- in diglukozidov.

pelargonidina ($R_1, R_2 = H$)

delfinidina ($R_1, R_2 = OH$)



Slika 4: Skeletna formula pelargonidina in delphinidina

Antocianini so antocianididi, ki imajo na benzenov obroč vezan sladkor. Sladkorji so na molekule antocianidinov navadno vezani na tretjem C-atomu benzenovega obroča, izjemoma lahko tudi na drugih. (Lancaster, 1992)

Z vezavo sladkorja se antocianidini stabilizirajo, a le ta vezava ne vpliva na absorbanco same molekule.

1.6. Aronija in antioksidanti v njej

Aronijo v Evropi šele pričenjamo spoznavati, saj je avtohtona na področju Severne Amerike, kjer so jo gojili in uporabljali kot zdravilo že staroselci - Indijanci. Ta rastlinska vrsta spada v družino rožnic (*Rosaceae*), poddržina *Maloidae*. Poleg črne (*melanocarpa*), sta poznani še rdeča (*arbutifolia*) in škrlatna (*prunifolia*). Bujno rastoči grm zraste od 1 do 3 m v višino, lahko pa se ga oblikuje tudi v manjše drevo (K. R. Robertson & Phipps). V naravi raste aronija največkrat v vlažnih gozdovih in močvirjih severnih arealov. (A. A. Reznicek, E. G. Voss, and B. S. Walters; 2011).

Aronia melanocarpa je posebno zanimiva zaradi svoje temno vijolične, skoraj črne barve. Ta barva je posledica velike vsebnosti polifenolov, zlasti antocianov. Vsebnost vseh polifenolov v 100 g svežih sadežev je 1752 mg (Phenol-Explorer; 2014). Od tega je delež antocianinov 1480 mg na 100 g svežih sadežev (Wu X; 2006). Te vrednosti so med najvišjimi izmerjenimi med rastlinami.

Prevladujoči antioksidanti v aroniji so:

- cianidin- 3-galaktozid,
- cianidin-3-arabinozid,
- cianidin-3-glukozid,
- cianidin-3-ksilozid

(B. Kapci, E. Neradová, H. Čížková, M. Voldřich, A. Rajchl, E. Capanoglu, 2013)

Večina naravnih virov antioksidantov (rastline) vsebuje več sto spojin z različno antioksidativno učinkovitostjo. Ker lahko obstajajo sinergijske interakcije med različnimi antioksidanti (Jia in sod., 1998 in Wu in sod., 1998), merjenje antioksidativnega delovanja posameznih sestavin ne pomeni nujno dejanskega skupnega antioksidativnega potenciala vira in lahko privede do zavajajočih sklepov. Zaradi tega je ocena celotnega antioksidativnega potenciala (ki upošteva antioksiativne lastnosti posameznih spojin v živilih, kot tudi njihove potencialne sinergijske interakcije), deležna velike pozornosti v zadnjih letih (Kristl in sod., 2011).

1.7. Kvasovke in njihov metabolizem

Saccharomyces cerevisiae spada med kvasovke. Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti. Glive so filogenetsko različna skupina organizmov in jo delimo na dva glavna taksona, in sicer deblu Ascomycota in Basidiomycota. (Raspor, 1996)

Kvasovke so enocelična oblika gliv, ki se v naravi pogosto pojavljajo v prosti vodi, prsti, živalskem gnoju, ter na površini zrelih sadežev, cvetov in listov rastlin. (Stušek, Škornik in Vodnik, 2011)

Kvasovke imajo pomembno vlogo v biotehnoloških procesih, kot so proizvodnja hrane in alkoholnih pijač, ter v farmacevtski industriji. Uporabne so tudi zaradi njihove doveztnosti za genetske manipulacije, kar je bilo še olajšano z odkritjem in razpoložljivostjo popolnega genomskega zapisa kvasovk. (Ostergaard, Nielsen in Olsson, 2000).

Kvasne celice so postale modelni organizem za raziskovanje moderne celične biologije in je eden najbolj raziskanih evkariontskih mikroorganizmov. Znanstveniki z njihovo pomočjo odkrivajo delovanje celične signalizacije in mehanizme delovanja evkariontskih celic, kar posledično vpliva na poznavanje delovanja človeške biologije. Ker so kvasovke evkariontske celice, imajo podobno notranjo strukturo kot rastline in živali, vendar z manjšo količino dednega materiala. Veliko proteinov pomembnih v človeški biologiji so odkrili z raziskovanjem njihovih homologov v kvasnih celicah. Takšni so proteini celičnega cikla, signalni proteini in proteinsko procesirajoči encimi. Ocenjeno je, da je v celicah kvasovk vsaj 31% genov, ki imajo homologe v človeškem genomu.

Kvasne celice so po navadi sferične do rahlo sferične (velike 5 – 12 x 5 – 12 µm), občasno tudi elipsoidne do cilindrične (velike 5 – 20 (-30) x 3 – 9 µm). Rastejo na trdnih in v tekočih gojiščih. Na trdni površini tvorijo okrogle kolonije z gladkimi robovi in izboklimi do visoko izboklimi profili.

V tekočem gojišču je rast motna, opazimo sedimentacijo in lebdenje celične mase. Sedimentacija je granulirana. Optimalno rast *Saccharomyces cerevisiae* omogoča temperatura med 33°C in 35°C v mediju z 10 do 30% glukoze. Minimalna temperatura uspevanje je pri 4°C v 10 % koncentraciji glukoze. Pri koncentraciji 50% glukoze je minimalna temperatura rasti 13°C.

Pri optimalni rasti se populacija kvasovk podvoji vsakih 100 minut. (Pitt in Hocking, 1997)

Kvasne celice se pojavljajo v dveh oblikah, haploidni in diploidni. Haploidne celice (to je nespolna oblika) imajo preprost življenjski cikel celične rasti in mitotske delitve, ki je značilna za optimalne pogoje. Diploidna oblika kvasnih celic ima podoben življenjski cikel rasti in mitotskih delitev. Pod stresom pa lahko diploidne celice začnejo proces sporulacije ter se začnejo deliti mejotsko. Pri tem proizvedejo štiri haploidne spore, ki se nato lahko med sabo združujejo. To je spolna oblika razmnoževanja glive. Pri spolnem razmnoževanju kvasnih celic so potrebni G proteinski receptorji, G proteini, TGS proteini in tri stopenska MAPK

signalizacijska kaskada. Ti proteini in procesi so homologni tistim, ki jih najdemo v človeku. To lastnost kvasnih celic je omogočila odkrivanje prenosa DNA s transdukcijo in procesa razvijanja odpornosti na določene antibiotike (desenzibilizacija). (5.)

V presnovi kvasovke uporabljajo sladkorje, ki so na razpolago v njihovem okolju. Če pa je sladkorjev malo ali jih sploh ni, uporabijo druge vire ogljika, kot so polioli, alkoholi, organske kisline in aminokisline. (Rodrigues, Ludovico in Leão, 2005).

Kvasovke so v večini fakultativni anaerobi in pri alkoholnem vrenju proizvajajo etanol, ogljikov dioksid in energijo. Rast različnih sevov kvasovk je pri aerobnih pogojih mogoča ob prisotnosti glukoze, maltoze ali trehaloze (nekateri sevi pri anaerobnih pogojih in trehalizi ne uspevajo). Prav tako ne uspevajo ob prisotnosti laktoze ali celobioze, čeprav je rast mogoča ob prisotnostih mešanih sladkorjev. Galaktoza in fruktoza sta najboljša fermentacijska sladkorja. Pri posameznih sevih je uporaba sladkorjev odvisna od aerobnih ali anaerobnih pogojih okolja. Kot vir vodika lahko uporabijo amonijak ali sečnino, ne morejo pa v amonijeve ione pretvarjati nitratov. (5.)

Kvasovke lahko presnavljajo tudi večino aminokislin, krajših peptidov in dušikovih baz. Aminokisline histidin, glicin in lizin so zanje samo založna oblika dušikovih snovi, ki jih v presnovi običajno ne uporabljajo. Kvasovke ne izločajo encimov proteaz, zato zunajceličnih proteinov ne morejo razgraditi. Za uspevanje potrebujejo tudi fosfor, ki ga vgrajujejo vgradijo v dihidrogenfosfatni ion in žveplo, ki ga asimilirajo v žveplove ione ali organske žveplove spojine, kot so nekatere aminokisline. Za njihovo popolno rast so potrebne še nekatere kovine (magnezij, železo, kalcij in cink) ter vitamini (npr. biotin). (5)

Energijo v aerobnih pogojih pridobivajo s celičnim dihanjem, ki je zaporedje metaboličnih reakcij in procesov, ki potekajo v citoplazmi in mitohondrijih celice. Pri njih pretvorijo biokemično energijo hranil (sladkor, amino kisline in maščobne kisline) v adenozin trifosfat (ATP), pri čemer se sprostita ogljikov dioksid in voda). Celično dihanje je eksotermična redoks reakcija, pri kateri se sprošča toplota. Za njen potek je potreben kisik. (6.) V anaerobnih razmerah poteče v kvasovkah glikoliza, katere produkti se encimsko razgradijo v etanol in ogljikov dioksid.

Celično dihanje je eden ključnih načinov s katerim kvasne celice pridobijo energijo potrebno za potek celičnih procesov.

Za organizme je stres kakršna koli spremembra kemičnih ali fizikalnih dejavnikov, ki negativno vpliva na rast celic. Kisik je za aerobne organizme nujno potreben, hkrati pa predstavlja tudi nevarnost (Santoro in Thiele. 1997), saj so ti organizmi stalno izpostavljeni toksičnim stranskim učinkom molekularnega kisika in sicer preko tvorbe ROS (reaktivne kisikove spojine/zvrsti). ROS se tvorijo med normalnim celičnim metabolizmom. Pri normalnih pogojih rasti so celični endogeni antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da obdržijo

ROS na osnovni, neškodljivi ravni in popravijo celične poškodbe. Sem sodijo primarno obrambni sistem, ki odstranjujejo ROS in sekundarni, ki popravijo poškodbe ali odstranijo oksidirane molekule. (Moradas - Ferraeira in sod., 1996) Različni stresni dejavniki povečajo njihovo količino in posledica je indukcija antioksidativnih obrambnih sistemov. (Costa in Moradas - Ferreira, 2001) Oksidativni stres pa nastopi, ko nivo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) preseže antioksidativno sposobnost celice. (Moradas-Ferraeira in sod., 1996)

1.8. Vpliv antioksidantov aronije na metabolizem ter pospešitev rasti in razmnoževanja

V celicah kot stranski produkt celičnega delovanja nastajajo ROS (reaktivne kisikove zvrsti) oz. prosti radikali, ki nastajajo pri presnovi in negativno vplivajo na druge redoks reakcije, s tem pa upočasnijo celični metabolizem in posledično zmanjšajo količino nastalega ATP v časovnem intervalu. Povečanje števila prostih radikalov v celicah kvasovk poškoduje vse dele celice vključno z proteini, lipidi in DNA, kar posledično povzroča hitrejše staranje celice. Zato so celice evolucijsko razvile antioksidativne obrambne sisteme. Te obrambne sisteme delimo na primarne in sekundarne. Primarni imajo vlogo odstranjevanja prostih radikalov, sekundarni pa popravljajo ali odstranjujejo poškodovane molekule. Kvasne celice se lahko delijo dokler poškodbe celice ne dosežejo točke kjer so poškodbe nepopravljive (poškodbe DNA in drugih pomembnih organelov). Ko je ta točka dosežena, celica sama sproži programirano celično smrt (apoptozo), ali pa se poškoduje do te mere, da celica ne more ohranjati homeostaze in potem posledično nastopi nekroza. Akumulacija prostih radikalov upočasni presnovo celic, zato nastane v določenem času manj ATP kot v optimalnem delovanju, kar se odraža v manjšem številu gradbenih enot, ki so celici na razpolago za opravljanje nadalnjih procesov, med katere spadata rast in tudi celična delitev. Poleg obrambnega sistema imajo antioksidanti pomembno vlogo pri zmanjševanju oksidativnega stresa. Tako se posledično optimizira rast in poveča s številom celičnih delitev.

Prisotnost antioksidantov aronije povzroči, da se lahko kvasne celice delijo večkrat na časovno enoto, zato je rast populacije kvasovk hitrejša kot bi bila, če ne bi bili prisotni antioksidanti. Posledica se odraža tudi v večji opaženi končni populaciji.

2. HIPOTEZE

Z raziskovalno nalogo smo želeli, preko serije poskusov potrditi ali ovreči naslednji hipotezi:

- aronija vsebuje velike količine biološko aktivnih snovi med katerimi so tudi antioksidanti,
- rast kvasovk v kontroliranem gojišču je pospešena ob dodatku soka aronije.

3. IZBOR IN PREDSTAVITEV RAZISKOVALNIH METOD

3.1. Material

Plodovi aronije (*Aronia melanocarpa*) obrani 12. avgusta 2015 z rastline na družinskem vrtu v Šentjurju pri Celju v polni zrelosti in skladiščeni v zmrzovalniku pri temperaturi -20°C. Pred analizami so bili plodovi prepeljani v šolo v zmrznjenem stanju in nato skladiščeni pri -20°C.

3.2. Metode

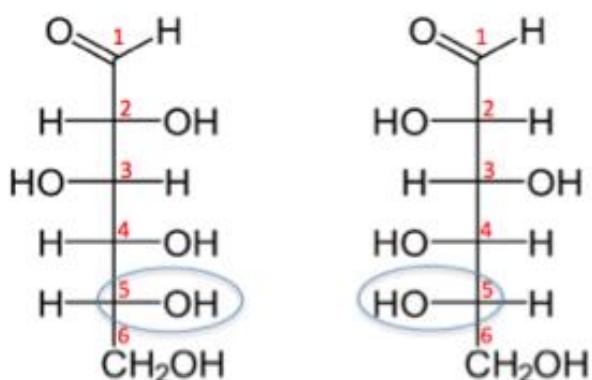
3.2.1. Priprava soka aronije (vzorca)

S paličnim mešalnikom smo odtaljene jagode zmleli v homogeno kašo in skozi bombažno tkanino iz njih iztisnili sok. Prelili smo ga v temno reagenčno stekleničko in takoj uporabili.

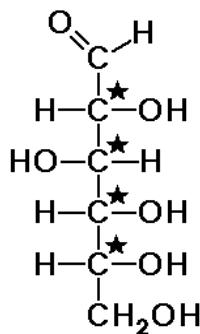
3.2.2. Določanje sladkorjev v vzorcu

Sladkorji (mono in disaharidi) vsebujejo več asimetrično substituiranih ogljikovih atomov, zaradi česar nastopajo v različnih stereoizomernih oblikah (optičnih izomerih).

Optična izomera (zrcalno simetrični spojini) sučeta ravnino linearne polarizirane svetlobe za enak kot, le v nasprotno smer. Imenujemo ju enantiomera in označimo z deskriptorjem D in L glede na položaj hidroksilne skupine na zadnjem asimetričnem ogljikovem atomu v Fischerjevi projekcijski formuli. V naravi prevladujejo D oblike sladkorjev.



Slika 5: Optična izomera glukoze kot primer zrcalno simetričnih podob



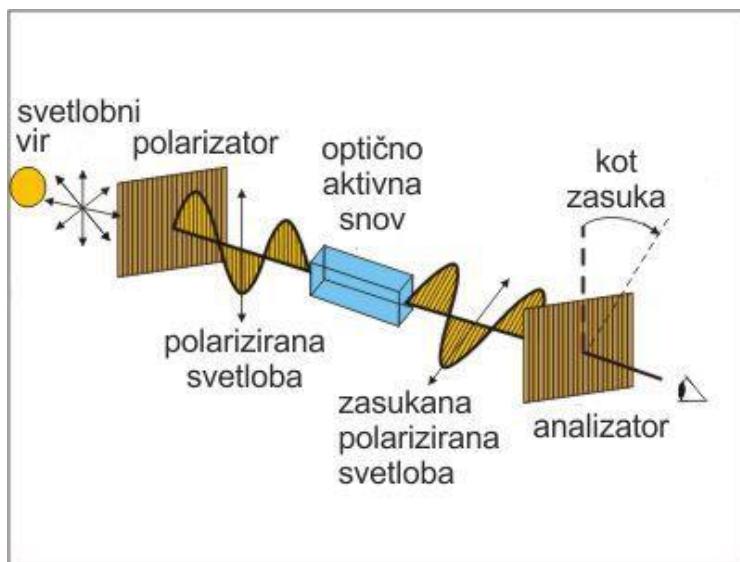
Slika 6: Fischerjeva projekcijska formula glukoze s štirimi kiralnimi centri

Vsebnost sladkorjev v soku smo določili z ročnim refraktometrom MASTER-OE, proizvajalca ATAGO, ki temelji na optični aktivnosti sladkorjev.

Refraktometér je fizikalna merilna priprava za merjenje lomnega količnika. Z refraktometrom lahko določimo vsebnost sladkorjev v vzorcu. Ta instrument meri refraktivni indeks vzorca, ki je odvisen od masnega deleža optično aktivnih snovi v raztopini. Rezultati/meritve so prikazani v brixih (brix = delež sladkorja v tekočini, izražen v %).

Prisotnost optično aktivnih snovi v vzorcu torej dokazujemo s prehodom monokromatske svetlobe skozi tanko plast vzorca. Monokromatska svetloba je vidna svetloba ene valovne dolžine.

Ko linearно polarizirana svetloba potuje skozi optično aktivno snov, spremeni smer za določen kot v levo (levosučne spojine) ali v desno (desnosučne spojine).



Slika 7: Prehod linearno polarizirane svetlobe skozi optično aktivno spojino

3.2.3. Določanje pH v vzorcu

V bioloških sistemih koncentracija oksonijevih ionov (H_3O^+), ki jo izražamo kot pH raztopine, med drugim pomembno vpliva na oksidacijsko-redukcijske lastnosti raztopljenih snovi.

pH je definiran kot negativni desetiški logaritem ravnotežne množinske koncentracije oksonijevih ionov.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$$

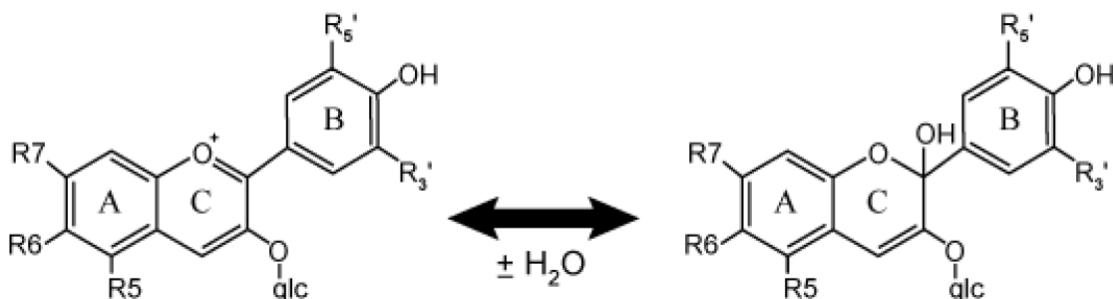
pH je merilo za kislost ozziroma bazičnost raztopine in ga ponazorimo s pH lestvico. Ta obsega vrednosti od 0 do 14, pri tem je 7 nevtralni pH. Vrednosti, ki so manjše od 7 označujejo kislost, večje od 7 pa bazičnost raztopin.

Oksonijevi ioni nastanejo pri protolitskih reakcijah v soku vsebovanih kislin z molekulami vode in so nosilci kislih lastnosti.

pH iztisnjenega soka smo merili z vmesnikom LabQuest Vernier in merilnikom pH.

3.2.4. Določanje antocianinov v vzorcu

Vsebnost antocianinov smo določili s pH-diferencialno metodo, z UV/VIS spektrofotometrom Lambda 35. Antocianinom se pri spremembi pH spremeni absorpcijski spekter, saj pride do spremembe v strukturi antocianinov. Pri pH = 1 prevladuje obarvana oksonijeva oblika, pri 4,5 pa hemiketalna, ki je brez barve.



Slika 8 : Obarvana oksonijeva oblika antocianinov (levo) in brezbarvna hemiketalna struktura (desno)

(0,2 mL) vzorca zmešamo z 2 mL pufra. Pufer s pH 1,0 pripravimo tako, da zmešamo 1,4 g KCl in 700 mL vode. Za pripravo pufra s pH 4,5 zmešamo 54,4 g kalijevega acetata in 700 mL vode ter uravnamo pH z dodatkom ocetne kisline. (Lee in sod., 2005).

Absorbanco (A) pomerimo pri 510 in 700 nm proti destilirani vodi v plastičnih kivetah. Enačba za izračun absorbance vzorca:

$$A = (A^{510} - A^{700})_{\text{pH } 1,0} - (A^{510} - A^{700})_{\text{pH } 4,5}$$

$$Vsebnost monomernih antocianinov = \frac{A \cdot M \cdot R \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}$$

Molekulska masa (M) cianidin-3-glikozida je 449,2 g/mol, razredčitveni faktor (R) je 50, specifična molska absorbanca (ε) je 26900 L mol⁻¹ cm⁻¹.

3.2.5. Izbor gojišča za kvasovke in njegova standardizacija

Pri načrtovanju poskusa smo izbirali med tekočim in trdnim gojiščem.

Zaradi lažjega poteka same raziskave in primerjave rezultatov med poskusom in kontrolami, smo izbrali tekoče gojišče, saj je v njem lažje izmeriti velikost populacije kvasnih celic, obenem pa lahko konzervirano gojišče analiziramo tudi spektrofotometrično.

Pri pripravi gojišča smo se odločali med 5% raztopino glukoze v destilirani vodi ali enako koncentracijo glukoze v fiziološki raztopini.

Zaradi boljšega vzdrževanja homeostaze smo se odločili za fiziološko raztopino.

Osnovno gojišče je sestavljala 5% raztopina D-glukoze v 9% raztopini natrijevega klorida (fiziološka raztopina), poskus pa je potekal pri temperaturi 25°C. V osnovnem gojišču smo v 200 ml raztopine raztopili 0,5 grama suhega pekovskega kvasa, kar se je izkazalo za optimalno populacijo primerno za štetje v Bürker – Türkovi komori.

Optimalno količino kisika smo zagotovili z magnetnim mešalom s 350 obrati na minuto (rpm).

3.2.6. Priprava kulture in štetje kvasnih celic iz gojišča po metodi uporabe hemocitometra (Bürker – Türkove komore)

Hemocitometer je laboratorijski pripomoček, ki se uporablja za štetje celic v preparatu, največkrat za štetje eritrocitov. Inokulum nam predstavlja suspenzija kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) v fiziološki raztopini in 5% koncentraciji glukoze.

S postopkom neposrednega štetja pod mikroskopom in pomočjo Bürker – Türkove komore (hemocitometra) lahko določimo število celic v izhodiščni raztopini. Pred štetjem moramo v primeru prevelike gostote celic uporabiti metodo redčenja po Kochu (predstavljena v nadaljevanju).

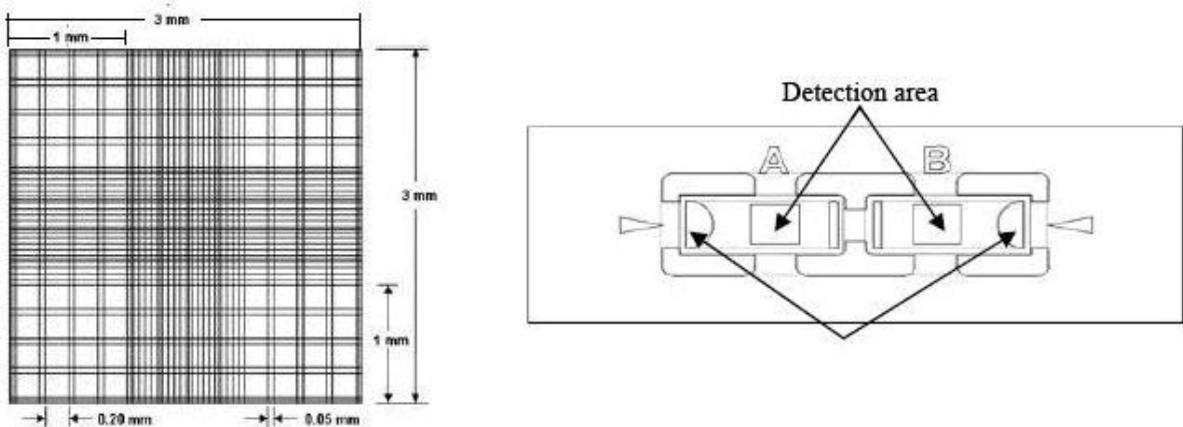
Bürker – Türkova števna komora ima vgravirano mrežico za štetje, sestavljeno iz devetih osnovnih kvadratov, katerih vsakega površina znaša 1 mm². Vsak kvadrat je razdeljen na 16 manjših, katerih stranice merijo 0,2 mm. Sredina

komore je dodatno razdeljena še na manjših 16 kvadratkov, katerih stranice merijo 0,05mm. Razdalje med objektnim stekelcem Bürker – Türkove komore in krovnim stekelcem je 0,1 mm.

(http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Praktikum_osnove_biotecnologij.pdf, Mozilla Firefox 20:00; 2.3.2016)

Za štetje smo pri poskusu in vseh kontrolah uporabljali površino 0.04 mm^2 .

V primeru velike gostote celic v vzorcu, le-tega razredčimo in faktor redčenja upoštevamo pri rezultatih.



Slika 9: Bürker - Türkova števna ploščica

3.2.6.1. Metoda redčenja

V primeru, da bi bilo kvasovk preveč za natančno štetje uporabimo redčenje. Na primer: če imamo 10 ml kulture kvasovk, potem 1 ml le-te prenesemo v drugo epruveto z 9 ml destilirane vode. Epruveto primerno označimo R1 (prvo redčenje). Po dobrem pretresu epruvete štetje ponovimo, s tem da upoštevamo, da je koncentracija kvasovk po R1 enaka 1:10. Po morebitnih nadaljnjih redčenjih (n-redčenj), enakih zgornjemu opisanemu, se razmerje vedno poveča za 10^n krat.

3.2.7. Štetje kvasovk iz gojišča in določanje gostote gojišča z metodo spektrofotometrije

Spektrofotometer primerja delež svetlobe, ki preide skozi referenčno raztopino in skozi merjeni vzorec. Ko svetloba potuje skozi vzorec, se del svetlobe pri tem absorbira, prepuščena svetloba pa pride do detektorja. Absorpcijo svetlobe podaja Beerov zakon, ki velja le za razredčene raztopine.

Spektrofotometer je sestavljen iz izvora svetlobe, monokromatorja, kivete in detektorja. Za izvor svetlobe uporabljam devterijevo ali volframovo žarnico. S prvo merimo v območju med 195 nm in 375 nm, z drugo pa v območju med 350 nm in 1000 nm. Monokromator je po navadi sestavljen iz optične rešetke, optične prizme, lahko pa tudi iz optičnega filtra. Z izbiro kota padanja svetlobe na optično

rešetko ali optično prizmo, lahko izberemo valovno dolžino svetlobe, ki jo bo monokromator prepustil. Kivete v katere dajemo vzorec so dolge okoli 1 cm in so iz kvarčnega ali navadnega stekla. Detektor pa meri intenziteto svetlobe prepuščene skozi vzorec. Na koncu pa imamo še zaslon, ki nam prikaže izmerjeno absorbanco.

Spektrofotometrijska merjenja absorbcijske se izvajajo pri valovni dolžini, ki odgovarja nekemu absorbcijskemu maksimumu. V tej točki je spremembra absorbance na enoto koncentracije največja. Za merjenje bioloških vzorcev (število celic) je najprimernejša svetloba z valovno dolžino 600 nm.

Na absorbanco raztopine vplivajo narava topila, pH, temperatura, koncentracija elektrolita, čas trajanja reakcije ter prisotnost snovi, ki interferirajo.

Spektrofotometri morajo biti umerjeni. Temu pravimo »ničelna nastavitev«. Absorbanca referenčnega vzorca mora biti nastavljena na nič, tako da so absorbance vseh ostalih merjenih vzorcev prikazane glede na referenčni vzorec. Spektrofotometer tako poda delež absorbance (količino absorbirane svetlobe glede na referenčni vzorec). Če spojina sama ne absorbira svetlobe, ji lahko dodamo reagente, s katerimi bo tvorila obarvan produkt. Le-temu pa lahko spektrofotometrično določimo koncentracijo. Ko vstavljam vzorec v aparaturo moramo biti previdni, da ne umažemo kivete z vzorcem. Ker po navadi merimo absorbanco pri relativno nizkih koncentracijah, moramo biti zelo previdni pri čiščenju kivete. Ob zamenjavi vzorca moramo kiveto vsaj trikrat sprati z destilirano vodo. Ko vsem raztopinam izmerimo absorbanco, narišemo umeritveno krivuljo. Na abscisno os nanašamo koncentracije, na ordinatno os pa izmerjeno absorbanco pri izbrani valovni dolžini. Ko točke med seboj povežemo dobimo linearno premico. Ko imamo enkrat izračunano enačbo premice, lahko spektrofotometrično določimo koncentracijo kateremu koli vzorcu z enako spojino.

(<https://sl.wikipedia.org/wiki/Spektrografija>, 20:00; 2.3.2016)

Z rezultati transmisije izračunamo optično gostoto vzorca in z njo rast kvasovk.

4. PREDSTAVITEV POTEKA RAZISKOVALNEGA DELA

4.1. Izvedba

4.1.1. Postopek priprave vzorca

Pred vsakim poskusom smo iztisnili svež sok, saj se količina antocianinov v njem zmanjšuje z izpostavljenostjo soka svetlobi, kisiku in višjim temperaturam.

4.1.1.1. Potrebščine

- odtaljene jagode aronije,
- plastična posoda (500 ml),
- palični mešalnik,
- stekleni lij,
- staničevina (celulozno vlakno),
- plastična žlica,
- čaša (50 ml).

4.1.1.2. Postopek

232,7 g plodov smo ločili od pecljev in jih odmrznili pri sobni temperaturi. S paličnim mešalnikom smo jih zmleli v homogeno kašo v 500 ml plastični posodi. Pripravili smo aparaturo za filtriranje. Kos staničevine smo vstavili v stekleni lij in nanjo prenesli nekaj žlic homogene kaše. Z rahlim stiskanjem kaše ob steno lija smo iztiskali sok, ki se je izcejal v čašo pod njim. Pazili smo, da se staničevina ni pretrgala. Pridobljenih 80 ml soka smo prelili v temne reagenčne stekleničke in ga takoj uporabili.



Slika 10: Plodovi aronije



Slika 11: Homogena kaša plodov aronije



Slika 12: Sok aronije

4.1.2. Postopek določanja količine sladkorjev v vzorcu

4.1.2.1. Potrebščine

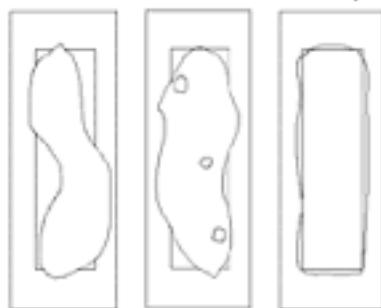
- ročni refraktometer,
- destilirana voda,
- sok aronije,
- kapalka,
- papirnate brisače.



Slika 13: Ročni refraktometer

4.1.2.2. Postopek

Refraktometer smo usmerili proti svetlobi in s pomočjo okularja izostrili pogled na skalo. Na prizmo smo kanili 1-2 kapljici destilirane vode, zaprli pokrovček in ga rahlo pritisnili ob prizmo. Preverili smo, da je voda v celoti prekrila njen površino. S privijanjem nastavitevnega vijaka smo nastavili ločnico med modro in belo površino na nič. Tako smo napravo umerili. Površino prizme smo obrisali s suho krpo in nanjo kanili 2 kapljici soka. Pokrovček smo zaprli in refraktometer obrnili proti svetlobi. Skozi okular smo odčitali vrednost, kjer je potekala meja med modro in belo površino. Odčitana vrednost je bila enaka odstotni koncentraciji sladkorja v soku.



Slika 14: Omočenost prizme z vzorcem (C ustrezen)

4.1.3. Določanje pH vzorca

4.1.3.1. Pripravki

- merilnik pH,
- vmesnik LabQuest Vernier,
- 2 čaši (50 ml),
- destilirana voda.



Slika 15: Merilnik pH in vmesnik LabQuest Vernier

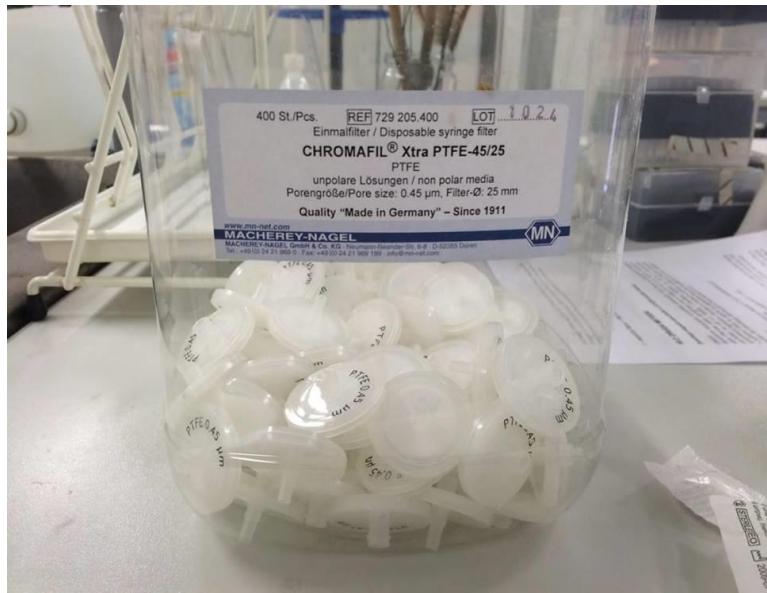
4.1.3.2. Postopek

Merilnik pH smo priključili na računalniški vmesnik in ga vklopili. Iz temne reagenčne stekleničke smo v čašo odmerili 30 ml soka. Elektrodo smo sprali z destilirano vodo in jo osušili. V čašo s sokom smo nato potopili elektrodo pH merilca tako, da je bil senzor v celoti potopljen in se ni dotikal dna oziroma sten čaše. Ko se je vrednost pH stabilizirala, smo z zaslona odčitali izmerjeni pH.

4.1.4 Postopek določanja antocianinov v vzorcu

4.1.4.1. Pripravočki

- pH meter - kalibriran na območju 4-7 pH s standardnimi pufri,
- UV-Vis spektrofotometer,
- Steklene ali plastične kvete (optična pot $b = 1 \text{ cm}$),
- Merilne bučke (50 ml),
- volurimetrične pipete,
- pH 1.0 pufer (KCl, 0.025),
- 4.5 pufer (Na-acetat pufer, 0.4M).



Slika 16: Filtri s premerom por 0,45 µm

4.1.4.3. Priprava merilnih raztopin

Za določanje antocianinov v soku aronije smo uporabili sok iz temnih reagenčnih stekleničk. Da bi povsem odstranili motnost smo pred analizo sok prefiltrirali s filtrom, ki ne veže antocianinov. Uporabili smo filter s premerom por 0.45µm.



Slika 17: Filtriranje

Vse razredčine smo pripravili v 50 ml merilnih bučkah. Za dodatek soka aronije pa smo uporabili volumetrične pipete. Pred samo raziskavo je bilo potrebno poiskati primerno razredčitev soka aronije. Redčiti ga je bilo potrebno, dokler ni bila izmerjena absorbanca v območju med 0,2 in 1,4, kar predstavlja linearno območje spektrofotometra.

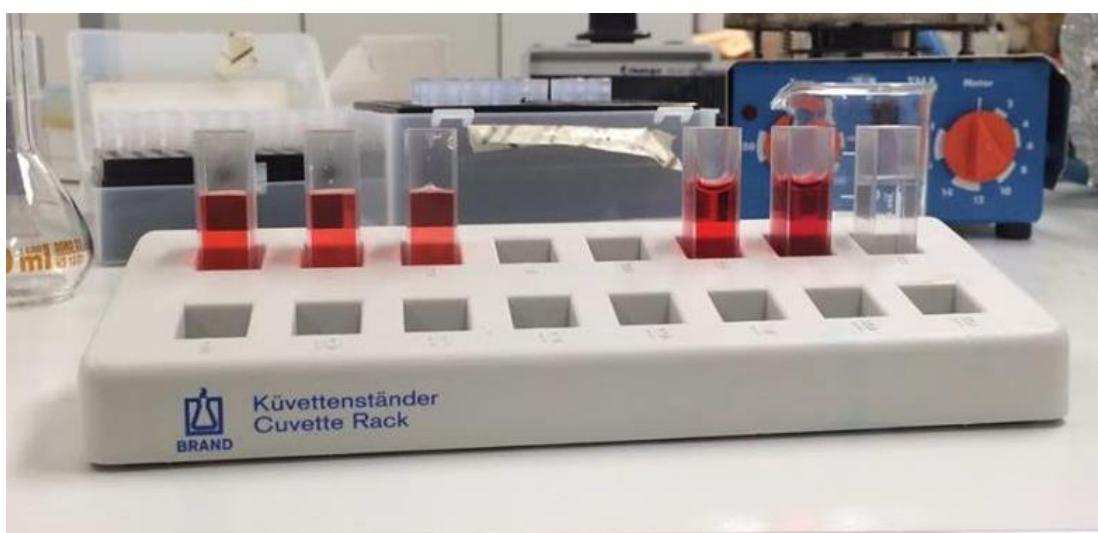
Pripravili smo slepi vzorec z deionizirano vodo, s katerim smo umerili napravo.

Zgolj informativno smo sprva pripravili 5x in 10x razredčitvi s KCl pufrom v kiveti. Za 5x razredčitev smo potrebovali 0,6 ml soka aronije in 2,3 ml pufra; za 10x razredčitev pa 0,3 ml soka in 2,7 ml pufra. Obe razredčini smo premešali. Absorbanco smo izmerili na spektrofotometru pri valovni dolžini 520 nm. Absorbanca je bila pri obeh razredčitvah še vedno očitno prevelika. Pri 5x razredčitvi je bila absorbanca 3,197, pri 10x razredčitvi pa 3,189.



Slika 18: Vzorca s 5x (desno) in 10x razredčitvijo (levo)

Pripravili smo še 20x, 30x in 50x razredčitev s KCl pufrom. Za 20x razredčitev smo uporabili 0,15 ml soka in 2,85 ml pufra, 30x razredčitev smo uporabili 0,1 ml soka in 2,9 ml pufra, za 50x razredčitev pa 0,06 ml soka in 2,94 ml pufra. Pred meritvijo absorbkcije smo raztopino v kiveti premešali. Spektrofotometer je pokazal, da je bila od vseh razredčitev preiskovanih pri 520 nm, za nadaljnjo uporabo primerna le 50x razredčitev z absorbancijo 1,258, kajti 20x razredčitev je imela absorbancijo 2,858; 30x razredčitev pa 1,959.



Slika 19: Vzorci razredčitev od leve proti desni (20x, 30x, 50x, 10x, 5x) in slepi vzorec (desno)

Ko smo določili primeren faktor razredčitve, smo razredčili sok aronije v pufru 1.0 in v pufru 4.5 ločeno.

Za pripravo raztopin smo uporabili merilni bučki (50ml) in ločeno pripravili razredčini s pufroma. V prvo merilno bučo smo z merilno pipeto odmerili 1ml soka, nato pa še 49 ml 0,025 M pufra KCl do spodnjega meniska. Raztopino smo dobro premešali in pustili stati 15 do 20 minut. Nato smo pripravili še raztopino z Na-acetatnim pufrom. V drugo merilno bučo smo z merilno pipeto ponovno odmerili 1ml soka, nato pa še 49 ml 0,4 M pufra Na-acetata do spodnjega meniska. Raztopino smo dobro premešali in jo pustili stati 15 do 20 minut. Absorbcijo obeh vzorcev smo morali izmeriti v času 20 do 50 min od priprave.



Slika 20: razredčina soka v KCl (desno) in v Na-acetatnem pufru (levo)

4.1.4.4. Določanje

Po 20 minutah smo v čisto kiveto odpepitirali 3 ml raztopine s pufrom KCl, prav tako smo odpipetirali 3 ml raztopine s pufrom Na-acetata v drugo kiveto. Pripravili smo slepi vzorec z deionizirano vodo.

Absorbenco smo merili z spektrofotometrom pri valovnih dolžinah 520 nm in pri 700 nm zato, da smo izločili vpliv ostalih obarvanih komponent na rezultat meritve.

4.1.5. Izbor osnovnega gojišča za kvasovke in njegova standardizacija

Najprej smo določili optimalno rast kvasovk glede na pogoje gojišča (5% raztopina glukoze v raztopinah fiziološke raztopine ali destilirane vode in magnetnem mešanju – 350 rpm).

Preglednica 1: Načrt - skica sestave osnovnih gojišč

OSNOVNA GOJIŠČA			
PRVA ERLENMAJERICA	DRUGA ERLENMAJERICA	TRETJA ERLENMAJERICA	ČETRTA ERLENMAJERICA
0,5 g kvasa	0,5g kvasa	0,5 g kvasa	0,5 g kvasa
200 ml 5% raztopine glukoze v destilirani vodi	200 ml 5% raztopine glukoze v destilirani vodi	200 ml 5% raztopine glukoze v fiziološki raztopini	200 ml 5% raztopine glukoze v fiziološki raztopini
stoječe	Magnetni mešalec (350 rpm)	stoječe	Magnetni mešalec (350 rpm)
Temperatura 25°C			

4.1.5.1. Postopek priprave populacije kvasovk in določitev optimuma rasti v gojišču

4.1.5.1.1. Pripromočki

- Pekovski kvas (*Saccharomyces cerevisiae*), uporabljen Suhi kvas Dr. Oetker (datum uporabe do 2017), uporabljen pri 25°C,
- gojišče - 5% raztopina glukoze v destilirani vodi in 5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini,
- laboratorijski material za poskus in kontrole (epruvete, stojalo za epruvete, kapalke, erlenmajerice, električna tehnika, termometer, hemocitometer Bürker – Türkova komora, objektna stekla, krovna stekla, čaše),
- magnetni mešalci,
- mikroskop,
- 4% formaldehid oziroma njegova raztopina formalin.

Pripravili smo štiri erlenmajerice. V dveh je bila 5% koncentracija glukoze v fiziološki raztopini, v dveh pa smo namesto fiziološke raztopine uporabili destilirano vodo. V vsako erlenmajerico z 200 mililitri raztopine smo dodali po 0,5 grama suhega kvasa. Eno od erlenmajeric vsakega gojišča smo postavili na magnetno mešalo.

Temperatura prostora in gojišč je bila 25°C.

Sterilne epruvete smo označili s številkami od 1 do 4 in oznako gojišča, časovnega intervala in prisotnost ali odsotnost magnetnega mešanja. Po odvzemu vsakega vzorca

smo mu dodali 0,2 ml formalina, ki je konzerviral kvasovke in preprečil nadaljnjo rast in delitev celic.

Vzorčili smo v časovnem intervalu 30 minut, 90 minut, 240 minut, 420 minut in 1200 minut po nastavitevi kulture.



Slika 21: Nastanitev gojišč

4.1.5.2. Štetje populacije kvasovk

Iz posameznega konzerviranega vzorca smo kapljico nanesli v komoro hemocitometra (Bürker – Türkovo komoro) in pod 600-kratno povečavo mikroskopa prešteli število kvasnih celic v njih.

Rezultate o štetju kvasnih celic v posameznih erlenmajericah prikazujejo:

- preglednice št. 3, 4, 5, 6, 7
- graf št. 1.

4.1.6. Načrt in izvedba poskusa in kontrol - raziskovalne naloge

Na osnovi izbire optimalnega gojišča smo načrtovali nadaljnji poskus. Kot optimalno gojišče smo izbrali 5% raztopino glukoze v destilirani vodi.

Preglednica 2: Načrt - skica izvedbe poskusa in kontrol

Osnovna kultura						
Pripravili smo 1000 ml gojišča za 5 erlenmajeric	Material	Količine	Pogoji	Opombe		
	Fiziološka raztopina	950 ml	Sobna temperatura, 25°C	Kulturo inkubiramo na mešalu (350 rpm)		
	Glukoza	50 gramov				
	Kvasovke	2,50 gramov				
Pred uporabo vzeti vzorce, jih fiksirati s formaldehidom - epruvete označimo						
SOK ARONIJE						
KOLIČINA ZMRZNJENIH PLODOV (100g)	Odtalimo pri sobni temperaturi	Stremo s paličnim mešalnikom	Filtriramo brez redčenja s filtrom št. 386	Uporabimo 10 ml soka aronije		
Količine sladkorja v aroniji (3,5% saharoze & 31% glukoze)						
Nastavitev poskusa vpliv aronije na rast populacije kvasovk in kontrolni poskusi						
POSKUS erlenmajerica (0)	1. kontrola K1	2. kontrola K2	3. kontrola K3	4. kontrola K4	5. kontrola K5	
150 ml osnovne kulture + 10 ml soka aronije	150 ml osnovne kulture +10 ml 3,5% raztopine saharoze	150 ml osnovne kulture +10 ml 31% raztopine glukoze	150 ml osnovne kulture + 10 ml osnovnega gojišča brez kvasovk	150 ml osnovne kulture + 10 ml fiziološke raztopine	160 ml osnovne kulture	
Iz vsake erlenmajerice smo v časovnih intervalih jemali po 6 ml vzorca in ga konzervirali s formaldehidom						

4.1.6.1. Priprava gojišča za kvasovke in aktivacija suhih kvasovk

Pripravili smo 1 liter gojišča. Gojišče je bila 5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, v kateri smo raztopili 2,5 grama suhega pekovskega kvasa. Erlenmajerici smo postavili na magnetna mešalnika s hitrostjo 350 rpm. Temperatura v prostoru je bila 25°C.

Po 200 minutah, ko so se suhe kvasovke aktivirale, smo prelili po 150 ml kulture kvasovk iz osnovnega gojišča v testne erlenmajerice. V prvo smo dodali 10 ml soka aronije. Ostale so bile kontrolni poskusi, ki smo jim dodali snovi napisane v preglednici (preglednica 2: načrt - skica izvedbe poskusa in kontrol). Postavili smo jo na magnetno mešalo, kjer smo jo mešali s 350 obrati na sekundo in pri temperaturi 25°C.

4.1.6.1.1. Pripromočki

- Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* iz kvasa (Suhi kvas, Dr. Oetker, datum uporabe 2017), uporabljene pri 25°C,
- gojišče (5% raztopina glukoze v destilirani vodi/5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini),
- sok aronije (iz kemijskega dela raziskave),
- laboratorijski material za poskus in kontrole (epruvete, stojalo za epruvete, kapalke, erlenmajerice, električna tehtnica, termometer, hemocitometri Bürker – Türkove komore, objektna stekla, krovna stekla, čaše, palični mešalnik, filtrirni papir in lij),
- magnetni mešalci,
- mikroskop,
- formaldehid oziroma njegova raztopina formalin.

4.1.6.1.2. Nastavitev poskusa z aronijo in kontrolnih poskusov

Po aktivaciji kvasnih celic v gojišču smo nastavili poskus, kjer smo kulturi kvasnih celic dodali aronijo in ustrezne kontrolne poskuse. Količine gojišča s kvasnimi celicami in druge sestavine so predstavljene v preglednici, ki prikazuje načrt poskusa vpliva soka aronije na rast kvasnih celic v gojišču in kontrolne poskuse.

Preglednica 3: Načrt poskusa vpliva soka aronije na rast populacije kvasovk in kontrolni poskusi

Načrt poskusa vpliv soka aronije na rast populacije kvasovk in kontrolni poskusi					
Dodana aronije (0)	Prva kontrola (K1)	Druga kontrola (K2)	Tretja kontrola (K3)	Četrta kontrola (K4)	Peta kontrola (K5)
150 ml osnovne kulture in 10 ml soka aronije	150 ml osnovne kulture in 10 ml raztopina saharoze, kar ustreza deležu saharoze v soku aronije	150 ml osnovne kulture in 10 ml raztopine glukoze, kar ustreza deležu glukoze v soku aronije	150 ml osnovne kulture in 10 ml osnovnega gojišča brez kvasovk	150 ml osnovne kulture in 10 ml fiziološke raztopine	160 ml osnovne kulture

Vse erlenmajerice so bile na magnetnih mešalih. Kulture kvasovk smo mešali s hitrostjo 350 obratov na sekundo. Temperatura v prostoru je bila 25°C.

Iz vsake erlenmajerice smo v časovnih intervalih jemali po 6 ml vzorca in ga takoj konzervirali z dodatkom 0,2 ml formaldehida. Konzerviranje je bilo potrebno zato, ker smo v vzorcih s tem ustavili rast in razmnoževanja kvasovk. Število kvasnih celic v vzorcih smo prešteli kasneje pod mikroskopom s hemocitometrom (Bürker – Türkovo komoro).

Iz posameznih gojišč smo vzorčili v časovnih intervalih: 0 minut, 120 minut, 240 minut in 360 minut po nastaviti gojišč s kvasnimi celicami.

Vzorce smo dali v označene sterilne epruvete, ki smo jih potem konzervirane shranili do štetja populacije kvasovk in do merjenja transmisije s spektrofotometrom.

Iz posameznega konzerviranega vzorca smo kapljico vzorca nanesli na hemocitometer in pod mikroskopom s 600-kratno povečavo prešteli število kvasnih celic v njih.



Slika 22: Nastavitev kontrol in poskusa

Rezultate o poskusu in kontrolah prikazujejo:

- preglednice št. 10, 11, 12, 13,
- graf št. 2.

4.1.7. Načrt in izvedba kontrole s spektrofotometrijo

Število kvasnih celic smo v konzerviranih vzorcih vseh kontrol in poskusa v različnih časovnih intervalih merili tudi spektrofotometrično. Meritev smo izvedli na Oddelku za kemijske analize živil, voda in drugih vzorcev okolja Celje, ki deluje v okviru Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (kratica NLZOH) v Celju, Ipačeva ulica 18. Pri tem nam je pomagal gospod mag. Andrej Planinšek, univ. dipl. kem., vodja Oddelka za kemijske analize živil, vod in drugih vzorcev okolja Celje. Meritev smo izvedli na Spektrometer Agilent, model Cary 60 UV-Vis. Pred izvedbo procesa smo epruvete z vzorcem pustili za minuto še v ultrazvočni komori (aparat Iskra pio d.o.o., Sonis 4), da so se kvasne celice v vzorcu enakomerno porazdelile in so se morebitni skupki celic razbili.

Iz presevnosti spektrofotometra smo po formuli $\log \frac{1}{T} = \text{konstanta} + \text{konstanta} \cdot \text{koncentracija}$ izračunali vrednost optične gostote vzorca/ml.

Rezultate o poskusu in kontrolah prikazujejo:

- preglednice št. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
- graf št. 3

4.1.7.1. **Pripomočki**

- Vzorci poskusa in kontrol,
- spektrofotometer (Spektrometer Agilent, model Cary 60 UV-Vis),
- vodni ultrazvok (aparat Iskra Pio d.o.o., Sonis 4).

5. REZULTATI

5.1. Rezultati analize soka aronije

5.1.1. Količina sladkorja v vzorcu

Z refraktometrom smo izmerili 14,8 brix, torej je raztopina sladkorjev v soku aronije 14,8%.

5.1.2. pH vzorca

S pH meritcem smo izmerili vrednost pH = 3,6.

5.1.3. Količina antocianinov v vzorcu

Absorbanco vzorcev smo izmerili pri obeh valovnih dolžinah: pri 520 nm in pri 700 nm. Absorbanca 50x razredčitve soka aronije s pufrom KCl (pH = 1,0) je pri valovni dolžini 520 nm enaka 1,266; pri valovni dolžini 700 nm pa je 0,008.

Absorbanca 50x razredčitve soka aronije s pufrom Na-acetata (pH = 4,5) je pri valovni dolžini 520 nm enaka 0,141; pri valovni dolžini 700 nm pa je 0,008.

Molekulska masa (M) cianidin-3-glikozida je $449,2 \frac{g}{mol}$, razredčitveni faktor (R) je 50, specifična molska absorbanca (ϵ) cianidin-3-glikozida je $26900 \frac{L}{mol \cdot cm}$, 10^3 je faktor za pretvorbo g v mg. Enota za vsebnost monomernih antocianinov je $\frac{mg}{L}$.

IZRAČUN

$$A^{520}_{pH\ 1,0} = 1,266 \quad A^{520}_{pH\ 4,5} = 0,141$$

$$A^{700}_{pH\ 1,0} = 0,008 \quad A^{700}_{pH\ 4,5} = 0,008$$

$$\epsilon = 26900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$M = 449,2 \text{ g/mol}$$

$$R = 50$$

$$A = (A^{510} - A^{700})_{pH\ 1,0} - (A^{510} - A^{700})_{pH\ 4,5}$$

$$A = (1,266 - 0,008) - (0,141 - 0,008)$$

$$A = 1,258 - 0,133$$

$$A = 1,125$$

$$Vsebnost\ monomernih\ antocianinov = \frac{A \cdot M \cdot R \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}$$

$$Vsebnost\ monomernih\ antocianinov = \frac{1,125 \cdot 449,2 \frac{g}{mol} \cdot 50 \cdot 1000}{2690 \frac{L}{mol \cdot cm} \cdot 1\ cm}$$

$$Vsebnost\ monomernih\ antocianinov = 940 \frac{mg}{L}.$$

5.2. Rezultati bioloških raziskav

5.2.1. Rezultati štetja kvasovk iz poskusnih gojiščih z Bürker-Türkovo komoro za ugotavljanje optimalne rasti populacije kvasovk

Preglednica 4: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini 0,04 mm² po 30 minutah

	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, stoječe	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, stoječe	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, mešano (350 rpm)	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, mešano (350 rpm)
Število kvasovk v gojišču na površini 0,04 mm ²	322	411	480	520
	363	402	410	480
	392	442	500	410
	418	432	460	430
	330	420	440	440
	369	397	410	450
	401	429	470	470
	433	411	480	420
	370	432	500	470
	342	422	450	510
	443		530	400
	421		410	390
	417		480	410
	411		490	420
	378		500	470
	390			450
	386			420
	387			470
	396			390
				480
POVPREČJE	388	420	467	445

Preglednica 5: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini 0,04 mm² po 90 minutah

	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, stopeče	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, stopeče	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, mešano (350 rpm)	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, mešano (350 rpm)
Število kvasovk v gojišču na površini 0,04 mm ²	510	400	450	320
	420	430	510	410
	410	350	570	350
	350	360	470	420
	420	530	460	500
	490	420	490	390
	480	440	530	410
	410	430	500	350
	470	520	580	380
	550	540	530	480
			580	500
			540	
POVPREČJE	451	442	518	410

Preglednica 6: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini 0,04 mm² po 240 minutah

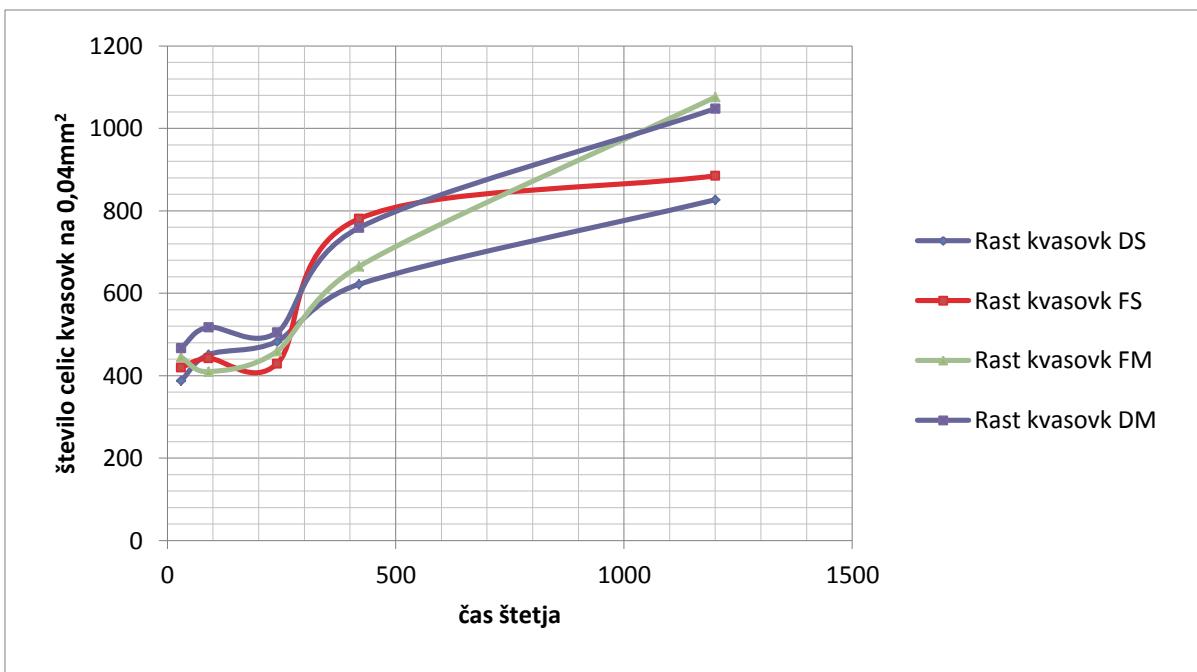
	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, stopeče	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, stopeče	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, mešano (350 rpm)	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, mešano (350 rpm)
Število kvasovk v gojišču na površini 0,04 mm ²	450	380	510	440
	460	440	410	330
	520	390	530	440
	430	440	440	510
	510	390	530	420
	490	450	360	450
	590	470	700	530
	330	510	520	550
	420	350	460	430
	630	470	590	310
POVPREČJE	483	429	505	459

Preglednica 7: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini 0,04 mm po 420 minutah

	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, stoječe	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, stoječe	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, mešano (350 rpm)	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, mešano (350 rpm)
Število kvasovk v gojišču na površini 0,04 mm ²	500	740	780	620
	620	760	660	720
	670	780	780	610
	770	720	610	690
	710	810	720	640
	530	790	790	600
	560	800	580	700
	590	930	810	650
	640	760	910	600
	630	720	950	800
POVPREČJE	662	781	759	665

Preglednica 8: Število kvasovk iz poskusnih gojišč na površini 0,04 mm po 1200 minutah

	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, stoječe	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, stoječe	5% raztopina glukoze v destilirani vodi, mešano (350 rpm)	5% raztopina glukoze v fiziološki raztopini, mešano (350 rpm)
Število kvasovk v gojišču na površini 0,04 mm ²	740	850	1050	1230
	600	810	960	1110
	820	1040	1000	1120
	1060	1140	1050	1030
	800	900	1070	970
	740	820	1110	1030
	820	690	980	1080
	930	850	1020	1040
	900	840	1140	1020
	860	910	1100	1130
POVPREČJE	827	885	1048	1076



Graf 1: Rezultati števila kvasovk iz gojišč

Legenda krivulj:

DS = kvasovke v 5% koncentraciji glukoze (destilirana voda, ni mešanja, 0,5g/200ml tekočine)

FS = kvasovke v 5% koncentraciji glukoze (fiziološka raztopina, ni mešanja, 0,5g/200ml tekočine)

FM = kvasovke v 5% koncentraciji glukoze (fiziološka raztopina, mešanje 350 obratov na minuto, 0,5g/200ml tekočine)

DM = kvasovke v 5% koncentraciji glukoze (destilirana voda, mešanje 350 obratov na minuto, 0,5g/200ml tekočine)

5.2.2. Rezultati poskusa z aronijo in kontrol

Preglednica 9: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih po 0 minutah

	Kvasovke z dodanim sokom aronije	KONTROLA 1	KONTROLA 2	KONTROLA 3	KONTROLA 4	KONTROLA 5
Število kvasovk iz poskusa in posameznih kontrol na površini 0,04 mm ²	410	410	440	410	300	310
	360	400	420	300	450	410
	460	420	410	270	240	460
	470	370	400	330	390	410
	260	460	370	310	280	300
	510	300	320	360	420	240
	350	400	410	440	410	400
	400	350	300	480	430	330
	370	300	470	460	490	380
	320	290	310	430	430	370
	350	310	250	500	430	500
	300	450	310	310	280	380
	240	320	380	300	270	340
	320	400	300	370	400	330
	350	300	350	240	270	380
	420	290	380	310	300	270
	380	380	380	400	310	320
	320	470	400	420	400	470
	450	490	390	410	350	420
	340	240	350	400	420	490
Poprečno število kvasnih celic na površini 0,04 mm ²	369	368	367	373	364	376

Preglednica 10: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih po 120. minutah

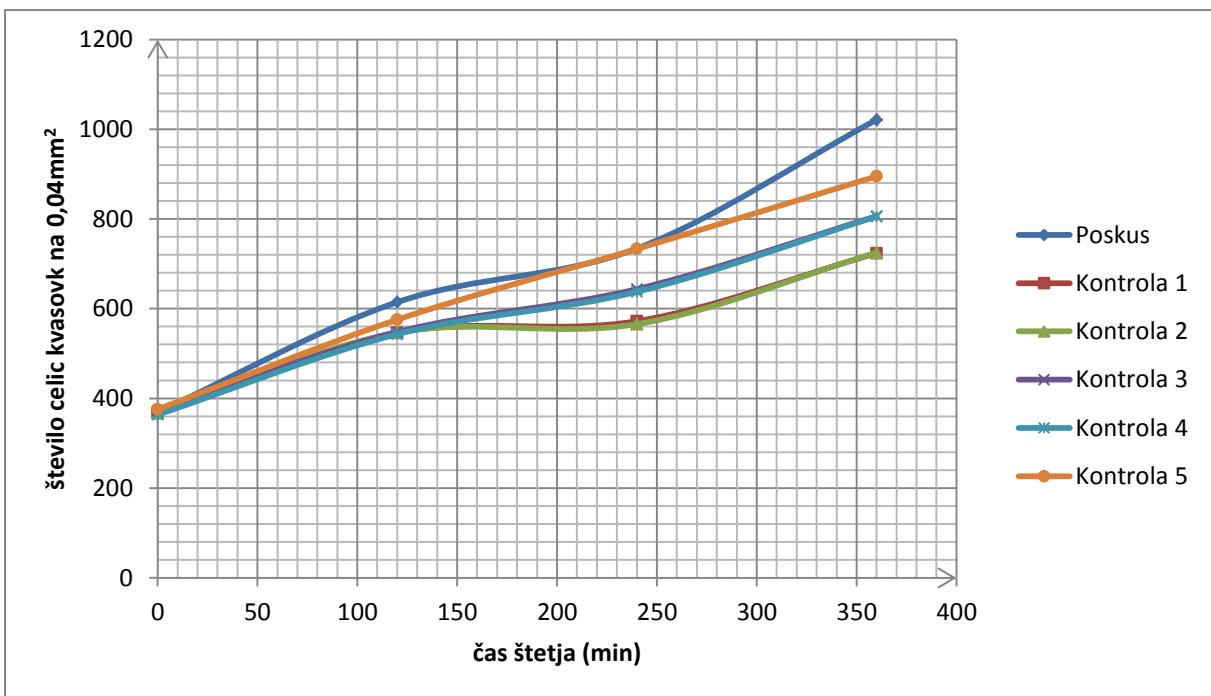
	Kvasovke z dodanim sokom aronije	KONTROLA 1	KONTROLA 2	KONTROLA 3	KONTROLA 4	KONTROLA 5
Število kvasovk iz poskusa in posameznih kontrol na površini 0,04 mm ²	640	610	550	570	600	480
	620	530	500	600	480	660
	510	520	620	610	500	580
	630	500	580	590	460	630
	720	600	520	530	520	540
	610	580	550	610	500	590
	620	600	590	520	540	670
	570	570	620	440	550	710
	660	580	450	410	600	650
	550	590	520	620	680	620
	600	670	530	580	670	660
	600	500	620	500	500	540
	640	490	630	680	520	490
	520	460	510	540	530	540
	720	520	500	580	550	350
	640	530	470	540	470	480
	450	480	570	510	590	610
	690	570	520	480	480	620
	700	530	540	450	500	530
	600	500	540	600	620	560
Poprečno število kvasnih celic na površini 0,04 mm ²	615	547	547	548	543	576

Preglednica 11: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih po 240. minutah

	Kvasovke z dodanim sokom aronije	KONTROLA 1	KONTROLA 2	KONTROLA 3	KONTROLA 4	KONTROLA 5
Število kvasovk iz poskusa in posameznih kontrol na površini 0,04 mm ²	900	550	600	570	650	620
	660	480	620	750	690	1010
	700	480	490	600	760	630
	800	470	530	710	500	780
	910	520	550	700	740	790
	830	670	680	690	590	660
	620	600	420	720	630	770
	500	560	500	590	650	830
	970	620	510	620	690	690
	420	600	490	630	590	700
	800	580	670	640	650	720
	620	700	660	530	640	690
	780	670	610	910	700	820
	820	590	590	540	710	670
	830	500	540	430	590	700
	560	450	520	580	540	710
	900	480	500	530	610	650
	810	640	490	660	650	790
	630	580	690	700	660	630
	620	700	650	720	510	800
Poprečno število kvasnih celic na površini 0,04 mm ²	734	572	566	644	638	733

Preglednica 12: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih po 360. minutah

	Kvasovke z dodanim sokom aronije	KONTROLA 1	KONTROLA 2	KONTROLA 3	KONTROLA 4	KONTROLA 5
Število kvasovk iz poskusa in posameznih kontrol na površini 0,04 mm ²	1000	720	720	860	780	780
	1030	700	690	890	690	890
	990	690	650	870	860	1000
	920	680	760	880	780	870
	1240	650	710	890	690	920
	820	750	700	870	700	930
	760	760	690	610	920	1010
	1040	790	820	640	980	890
	1070	720	910	750	910	750
	800	850	800	790	890	1060
	1100	720	700	790	650	1090
	950	730	750	820	820	1100
	990	760	720	850	830	850
	730	700	710	820	760	990
	1250	690	810	890	770	710
	1300	750	650	820	690	690
	1060	810	710	720	700	840
	1130	620	700	730	890	820
	1070	710	690	860	920	840
	1170	670	610	770	880	870
Poprečno število kvasnih celic na površini 0,04 mm ²	1021	724	725	806	806	895



Graf 2: Število kvasnih celic v populaciji, kjer smo dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih v različnih časovnih intervalih

5.2.3. Rezultati merjenja transmisije s spektrofotometrom pri 600 nm v vzorcu populacije, kjer smo kvasnim celicam dodali sok aronije in število kvasnih celic v kontrolnih poskusih

Preglednica 13: Transmisija in optična gostota v kontroli 5

VZOREC	% TRANSMISIJE	OPTIČNA GOSTOTA
KONTROLA 5 OB ZAČETKU	0,956	0,019542108
KONTROLA 5 PO 120 MINUTAH	0,847	0,07211659
KONTROLA 5 PO 240 MINUTAH	0,788	0,103473783
KONTROLA 5 PO 360 MINUTAH	0,71	0,148741651

Preglednica 14: Transmisija in optična gostota v kontroli 4

VZOREC	% TRANSMISIJE	OPTIČNA GOSTOTA
KONTROLA 4 OB ZAČETKU	1,076	-0,031812271
KONTROLA 4 PO 120 MINUTAH	1,011	-0,004751156
KONTROLA 4 PO 240 MINUTAH	0,814	0,089375595
KONTROLA 4 PO 360 MINUTAH	0,707	0,150580586

Preglednica 15: Transmisija in optična gostota v kontroli 3

VZOREC	% TRANSMISIJE	OPTIČNA GOSTOTA
KONTROLA 3 OB ZAČETKU	1,033	-0,014100322
KONTROLA 3 PO 120 MINUTAH	0,803	0,095284455
KONTROLA 3 PO 240 MINUTAH	0,703	0,153044675
KONTROLA 3 PO 360 MINUTAH	0,703	0,153044675

Preglednica 16: Transmisija in optična gostota v kontroli 3, druga meritev

VZOREC	% TRANSMISIJE	OPTIČNA GOSTOTA
KONTROLA 3 OB ZAČETKU	1,044	-0,0187
KONTROLA 3 PO 120 MINUTAH	0,954	0,020452
KONTROLA 3 PO 240 MINUTAH	0,92	0,036212
KONTROLA 3 PO 360 MINUTAH	0,752	0,123782

Preglednica 17: Transmisija in optična gostota v kontroli 2

VZOREC	% TRANSMISIJE	OPTIČNA GOSTOTA
KONTROLA 2 OB ZAČETKU	1,04	-0,017033339
KONTROLA 2 PO 120 MINUTAH	1,005	-0,002166062
KONTROLA 2 PO 240 MINUTAH	1,038	-0,016197354
KONTROLA 2 PO 360 MINUTAH	0,811	0,090979146

Preglednica 18: Transmisija in optična gostota v kontroli 1

VZOREC	% TRANSMISIJE	OPTIČNA GOSTOTA
KONTROLA 1 OB ZAČETKU	1,082	-0,034227261
KONTROLA 1 PO 120 MINUTAH	0,972	0,012333735
KONTROLA 1 PO 240 MINUTAH	0,896	0,04769199
KONTROLA 1 PO 360 MINUTAH	0,785	0,105130343

Preglednica 19: Transmisija in optična gostota v poskusu z aronijo

VZOREC	% TRANSMISIJE	OPTIČNA GOSTOTA
POSKUSNI VZOREC OB ZAČETKU	0,142	0,847711656
POSKUSNI VZOREC PO 120 MINUTAH	0,15	0,823908741
POSKUSNI VZOREC PO 240 MINUTAH	0,086	1,065501549
POSKUSNI VZOREC	0,12	0,920818754



Graf 3: Optična gostota posameznih kontrol in poskusa

6. RAZPRAVA

Sladkor predstavlja pomembno hranilo za kvasovke, zato vpliva na njihovo rast. Določitev količine sladkorja v aronijinem soku je bila potrebna za pripravo gojišča (medija) za kvasne celice. Aronjin sok je vseboval 14,8 % sladkorja.

Določanje pH soka smo izvedli za pridobitev podatkov o njegovi kislosti. Antocianini delujejo kot antioksidanti le v kislih raztopinah. V bazičnem raztopinah antocianini ne delujejo več kot reducenti in s tem izgubijo svojo prvotno funkcijo. Izmerjena vrednost pH soka ($\text{pH} = 3,6$) je potrdila ustrezne pogoje za njihovo uspešno delovanje.

Masna koncentracija antocianinov v soku aronije je bila zelo visoka, kar 940 mg/L. V literaturi je navedeno, da vsebuje 100 g svežih plodov aronije 1480 mg antocianinov (povzeto po Wu X, 2006), naše izmerjene vrednosti pa so bile nižje. Vzrok je v antocianinih, ki se nahajajo v lupini plodov, ki pa jih z uporabljenim metodo priprave soka nismo izločili. Sama lupina je izjemno bogat vir antocianinov, o čemer lahko sklepamo tudi po njeni temno vijolični, skoraj že črni obarvanosti.

Za ugotavljanje vplivov aktivnih snovi iz aronije na žive organizme smo izbrali kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, saj za rast potrebujejo enostavno, poceni in definirano gojišče, vzdrževanje ni zahtevno, celični cikel in čas delitve kvasnih celic je kratek. Poleg tega so kvasne celice po kompleksnosti podobne človeškim celicam, saj ima 40% njihovih proteinov aminokislinska zaporedja, ki so enaka vsaj enemu proteinu človeka, poleg tega pa imajo 30% proteinov v človeku, ki so vpleteni v bolezni, homologne gene v kvasnih celicah.

S pomočjo raziskave in kontrol smo želeli potrditi ali ovreči zastavljene hipoteze. Iz rezultatov je razvidno, da sok aronije pospešuje rast kvasovk. Kvasovke so v vzorcu tvorile tudi posebne skupke, kar se zgodi takrat, ko je rast in delitev izredno hitra in so razmere za uspevanje optimalne.

Rezultati poskusa z dodano aronijo potrjujejo hipotezo. Število kvasnih celic v gojišču z dodano aronijo je bilo v primerjavi s kontrolnimi poskusi največje. Isto potrjuje merjenje transmisije s spektrofotometrom in naraščajoča optična gostota vzorcev zvetih iz kulture kvasovk, ki smo ji dodali aronijo.

Iz rezultatov kontrolnih poskusov je razvidno, da vrsta sladkorja (saharoza/glukoza) nista ključna faktorja rasti kvasovk. Fiziološka raztopina pa se je v testih za pripravo gojišča izkazala kot optimalno okolje za kvasovke. Tako lahko sklepamo, da so aktivne snovi v aroniji tiste, ki vplivajo na pospeševanje rasti.

V kemijskem delu raziskave se je izkazalo, da so glavna in najbolj razširjena skupina aktivnih snovi v aroniji antocianini. Kot drugi antioksidanti, prav tako prisotni v aroniji, lahko nevtralizirajo reaktivne kisikove in dušikove zvrsti, ki

lahko v nasprotnem primeru v celicah povzročijo naraščanje oksidativnega stresa in s tem zmanjšajo njeno metabolno delovanje, s tem pa tudi upočasnijo presnovne procese in celično delitev, tudi do štirikrat bolj učinkovito kot askorbat ali α -tokoferol (vitamin E).

Eksogeni antioksidanti v celicah ne delujejo neodvisno, temveč je njihovo delovanje odvisno tudi od aktivnosti primarnih obrambnih sistemov, ki preprečujejo začetne in propagacijske reakcije radikalov in oksidantov s celičnimi komponentami in sekundarnih antioksidativnih obrambnih sistemov, ki prevzemajo vlogo, ko primarni obrambni sistemi niso več zadostni ter nastajajo poškodbe. Delovanje antioksidantov je tako specifično za posamezen antioksidant.

Nekatere snovi, ki imajo antioksidativne lastnosti, so uspešno prešle iz okolja (soka aronije) skozi celično membrano kvasnih celic in so domnevno vezale proste radikale, prisotne v mitohondrijih v procesu celičnega dihanja, s tem pa zavirale oksidativni stres. Takšen primer so lahko kinoni, ki se zaradi zgradbe lahko vežejo v notranje membrane mitohondrijev in reducirajo proste radikale na notranih membranah, drugi primer pa so antocianini, ki pa so dokazano uspešni oksidanti, vendar verjetno zaradi oblike in velikosti molekule težko prehajajo skozi celične membrane kvasovk.

Zmanjšanje oksidativnega stresa omogoča v časovnem intervalu nastanek večje količine ATP, kar se odraža v hitrejši sintezi proteinov ter gradbenih enot celice, zato je delitev le-te hitrejša. Posledično je tudi rast populacije kvasnih celic hitrejša.

Kljud realnim rezultatom moramo upoštevati odstopanja v številu celic, do katerega bi lahko prišlo zaradi napak, ki jih dopušča uporaba hemocitometra (Bürker-Türkova komora) ob večjem številu celic ($60+/0,04\text{mm}^2$) in metode redčenja kulture kvasnih celic.

Spektrofotometrična metoda štetja delcev v kontrolah iz prejšnje faze poskusa nam je delno potrdila naše prejšnje rezultate. Potrdila je celično rast in naraščanje populacije kvasnih celic z daljšanjem časovnega intervala, prišlo pa je do večjih odstopanj in merskih napak, saj metoda ni primerna za štetje delcev v gostejših raztopinah. Moteča je bila tudi obarvanost vzorca zaradi soka aronije in delcev v njem, saj smo sok pred vnosom v gojišče filtrirali z navadnim filtrom. Z uporabo ultrazvočne kopeli epruvet z vzorci pred merjenjem s spektrofotometrom smo dosegli, da so bile celice enakomerno porazdeljene po vzorcih, obenem pa v smo z ultrazvokom razbili skupke celic in s tem vsaj delno zmanjšali merske napake.

Celice kvasovk so zaradi prisotnosti celične stene ostale nepoškodovane, kar smo preverili s pregledom vzorcev pod mikroskopom..

Menimo, da so dobljeni rezultati nakazali pospeševalno delovanje antioksidantov aronije na rast populacije kvasnih celic ter potrdili njihovo vlogo v zaščiti pred povečano produkcijo ROS kot posledico izpostavitve induktorju oksidativnega stresa. Hkrati lahko rezultati in pridobljene informacije o aroniji služijo tudi kot

osnova za nadaljnje raziskave uporabe antioksidantov pri izboljšanju delovanja in zmanjševanju oksidativnega stresa pri celicah človeka.

7. ZAKLJUČEK

Kljub težavam s katerimi sva se soočala pri izvajanju raziskav za pričujočo nalogo in njeni kompleksnosti, meniva da nama je raziskovalno delo razkrilo nekatere odgovore na vprašanja o delovanju presnovnih procesov v celicah, obenem pa nama je postavilo nova vprašanja, ki pozivajo k nadaljnemu raziskovanju problemov s katerimi sva se soočila.

Raziskovalna naloga in delo z njo nama je ponudilo nova znanja, literatura, ki sva jo predelala pa razkrila številne nove in pomembne informacije v biologiji in kemiji, ki jih bova s pridom uporabila v nadalnjem šolanju in vsakdanjem življenju.

Meniva, da so dobljeni rezultati pomembni tudi za kompleksnejše raziskave s človeškimi celicami, saj razumevanje kvasnih celic predstavlja osnovo za razumevanje kompleksnejših sistemov in intraceličnih procesov.

Pridobljene informacije in rezultate potrjujejo tudi raziskave na različnih biotehnoloških področjih, ki se ukvarjajo z raziskovanjem in uporabo antioksidantov v farmacevtske in druge namene.

LITERATURA

Vir 1: <https://en.wikipedia.org/wiki/Aronia> (16. 1. 2016)

Vir 2: <http://www.aronija-slovenija.si/zakaj-aronija> (16. 1. 2016)

Vir 3: <http://slomanut.freevar.com/literatura/Prosti%20radikali.pdf> (30. 1. 2016)

Vir 4:

<https://www.researchgate.net/publication/249314007> Investigating the antioxidant potential of chokeberry Aronia melanocarpa products (20. 2. 2016)

Vir 5: http://www.agr.unizg.hr/smotra/pdf_72/acs72_49.pdf (25. 2. 2016)

Vir 6: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_pregelj_tadeja.pdf (25. 2. 2016)

Vir 7: http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Seminarji/Antioksidanti.pdf (25. 2. 2016)

Vir 8: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/biotehnologija/dd_zakrajsek_teja.pdf (25. 2. 2016)

Vir 9: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_pegan_katarina.pdf (21. 2. 2016)

Vir 10: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380282/?report=reader> (20. 2. 2016)

Vir 11: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730916/?report=reader> (21. 2. 2016)

Vir 12: https://en.wikipedia.org/wiki/Oxidative_stress (21. 2. 2016)

Vir 13: Peter Stušek, Sonja Škornik in Dominik Vodnik, Zgradba in delovanje organizmov. Ljubljana: DZS, 2011.

Vir 14: Saccharomyces cerevisiae,
https://sl.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae (02. 3. 2016)

Raspor P. 1996. Kvasovke. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 70 – 90.

Pitt J.I., Hocking A. D. 1997. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London, Blackie Academic & Professional: 593 str.

Vir 15: Simon Ostergaard, Lisbeth Olsson in Jens Nielsen. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000 Mar; 64(1):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98985/> (2. 3. 2016)

Vir 16: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6231/1/Ch06.pdf> (2. 3. 2016)

Fernando rodrigues, Paula Ludovico in Cecília Leão. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism, 2005

Vir 17: *Saccharomyces cerevisiae*,
https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae#Life_cycle (2. 3. 2016)

Vir 18: Cellular Respiration, https://en.wikipedia.org/wiki/Cellular_respiration (3. 3. 2016)

Vir 19: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_morcic_tea.pdf (2. 3. 2016)

Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive Oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*.

Santoro N., Thiele D:J. 1997. Oxidative stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

VIRI SLIK

slika 1:http://www.srecno-zivljenje.com/imunski_sistem.html (20. 1. 2016)

slika 2:

https://sl.wikipedia.org/wiki/Reaktivna_kisikova_spojina#/media/File:Active_oxygen_species.svg (26. 2. 2016)

slika 3:<https://sl.wikipedia.org/wiki/Flavonoidi#/media/File:Flavon.svg> (26. 2. 2016)

slika 4:<https://sl.wikipedia.org/wiki/Antocian#/media/File:Anthocyanidine.svg> (26. 2. 2016)

slika 5:<http://study.com/academy/lesson/monosaccharides-definition-structure-examples.html> (20. 1. 2016)

slika 6:<http://web.pdx.edu/~wamserc/C336S02/25notes.htm> (20. 1. 2016)

slika 7:<http://www.iucbeniki.si/kemija3/index.html> (20. 2. 2016)

slika 8: (Brouillard in Delaporte, 1977)

slika 9:Http://www.incyto.com/product/product04_detail.php (20. 2. 2016)

slike10: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)

slika 11: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)

slika 12: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)

slika 13: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)

slika 14:http://www.produktinfo.conrad.com/datenblaetter/100000-124999/122381-an-01-sl-Refraktometer_RF10.pdf (20. 2. 2016)

slika 15: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)

slika 16: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)

slika 17: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)

slika 18: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)

slika 19: avtorica: Klavdija Bastl (10. 2. 2016)