

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matej ŽVOKELJ

**OBSTOJNOST VITAMINOV IN SKUPNI ANTIOKSIDATIVNI  
POTENCIAL V SADNO-ŽITNI REZINI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**VITAMIN STABILITY AND TOTAL ANTI-OXIDANTIVE POTENTIAL  
IN FRUIT-CEREAL BAR**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Rajka Vidriha, za somentorja prof. dr. Marjana Simčiča in za recenzenta prof. dr. Janeza Hribarja.

Mentor: doc. dr. Rajko Vidrih

Somentor: prof. dr. Marjan Simčič

Recenzent: prof. dr. Janez Hribar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Matej Žvokelj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 664.68.016.022.3: 577.16: 542.943.78(043) = 163.6  
KG sadno-žitne rezine / konditorski izdelki / antioksidanti / aditivi / vitamin C / vitamin E / lutein / obstojnost vitaminov / antioksidativni potencial / Maillardova reakcija
- AV ŽVOKELJ, Matej
- SA VIDRIH, Rajko (mentor) / SIMČIČ, Marjan (somentor) / HRIBAR, Janez (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2009  
IN OBSTOJNOST VITAMINOV IN SKUPNI ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL V SADNO-ŽITNI REZINI
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 62 s., 11 pregl., 19 slik, 49 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AI V sklopu diplomske naloge smo preverjali obstojnost askorbinske kisline ter skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine, v odvisnosti od dodatka luteina in  $\alpha$ -tokoferola. Po izdelavi smo sadno-žitne rezine hranili dva meseca na temperaturi 37 °C. Ugotovili smo, da je pri teh pogojih askorbinska kislina dokaj neobstoja, saj je koncentracija v dveh mesecih pri 37 °C padla za več kot 90 %, ne glede na prisotnost ostalih antioksidantov (luteina in  $\alpha$ -tokoferola). Pri sadni rezini, ki je bila shranjena pri temperaturi 4 °C, pa je vsebnost askorbinske kisline po sedmih mesecih padla le za 20 %. Skupni antioksidativni potencial smo določali z metodo DPPH\* (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Izkazalo se je, da je antioksidativni potencial najbolj stabilen v sadno-žitni rezini kateri smo dodali vse tri antioksidante. Pri rezinah z dodatkom antioksidantov pride do padca antioksidativnega potenciala, vendar le-ta po 5. do 7. tednu ponovno naraste. Naš poskus je pokazal, da je oksidativno najbolj stabilna sadno-žitna rezina z dodatkom luteina, askorbinske kisline in  $\alpha$ -tokoferola.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 664.68.016.022.3: 577.16: 542.943.78(043) = 163.6  
CX fruit-cereal bars / confectionery products / antioxidants / additives / vitamin C / vitamin E / lutein / vitamin stability / antioxidative potential / Maillard reaction  
AU ŽVOKELJ, Matej  
AA VIDRIH, Rajko (supervisor) / SIMČIČ, Marjan (co-advisor) / HRIBAR, Janez (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2009  
TI VITAMIN STABILITY AND TOTAL ANTIOXIDANTIVE POTENTIAL IN FRUIT-CEREAL BAR  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 62 p., 11 tab., 19 fig., 49 ref.  
LA sl  
AL sl / en  
AB In the graduation thesis we examined the subsistence of ascorbic acid and the total antioxidative potential of a fruit-cereal bar in dependence to the supplement of lutein and  $\alpha$ -tocopherol. After making them, we kept the fruit-cereal bars at 37 °C for two months. We discovered that at these conditions, the ascorbic acid is rather unsubsistent because the concentration had fallen by more than 90 % in two months at 37 °C regardless of the presence of other antioxidants (lutein and  $\alpha$ -tocopherol). With the fruit-cereal bar that was kept at the temperature 4 °C, the concentration had fallen only by 20 %. The total antioxidative potential was determined with the DDPH method (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). It was proven that the antioxidative potential is most stable in the fruit-cereal bars with the supplement of all three antioxidants. With bars with the supplement of antioxidants a fall in the antioxidative potential, but it rises again after the 5th to 7th week. Our experiment demonstrated that oxidatively, the fruit-cereal bars with the supplement of lutein, ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol, is the most stable.

## KAZALO

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 SADNO-ŽITNA REZINA .....	3
2.1.1 Sadno-žitna rezina Frutabela sedem sadežev z vlaknino .....	4
2.1.2 Proizvodnja sadne rezine .....	5
2.1.2.1 Opis strojev na liniji za proizvodnjo sadno-žitnih rezin .....	7
2.2 ANTIOKSIDANTI .....	10
2.2.1 Definicija in splošni pomen antioksidantov .....	10
2.2.2 Določanje antioksidativnega potenciala z metodo DPPH .....	13
2.3 VITAMINI .....	14
2.3.1 Vitamin C .....	14
2.3.1.1 Splošne značilnosti .....	14
2.3.1.2 Zgodovina .....	14
2.3.1.3 Kemijske lastnosti .....	15
2.3.1.4 Stabilnost vitamina C .....	17
2.3.2 Vitamin E .....	18
2.3.2.1 Kemijske lastnosti .....	18
2.3.2.2 Stabilnost vitamina E .....	20
2.4 KAROTENOIDI .....	21
2.4.1 Karotenoidi kot antioksidanti .....	22
2.5 VPLIV PREDELAVE IN SKLADIŠČENJA NA ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL .....	22
2.5.1 Maillardova reakcija .....	23
2.5.1.1 Vpliv produktov Maillardove reakcije na antioksidativno stabilnost .....	24
2.6 MEDSEBOJNI UČINKI VITAMINOV C, E IN KAROTENOIDOV .....	25
2.6.1 Interakcije med vitaminoma C in E .....	27
2.6.2 Interakcije med vitaminom C in karotenoidi .....	28
2.6.3 Interakcije med vitaminom E in karotenoidi .....	29
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>30</b>
3.1 MATERIALI .....	30
3.1.1 Sadno-žitna rezina .....	30
3.1.1.1 Energjska ploščica K3 .....	30
3.2 METODE .....	31
3.2.1 Določanje askorbinske kisline .....	32
3.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI .....	34

<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>36</b>
4.1	OBSTOJNOST ASKORBINSKE KISLINE .....	36
4.1.1	Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatkom askorbinske kisline .....	36
4.1.2	Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatki askorbinske kisline, luteina in $\alpha$ -tokoferola.....	37
4.1.3	Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatkom askorbinske kisline in luteina .....	38
4.1.4	Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatkom askorbinske kisline in $\alpha$ -tokoferola .....	39
4.2	SKUPNI ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL .....	41
4.2.1	Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine brez dodatkov .....	41
4.2.2	Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline .....	42
4.2.3	Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline, luteina in $\alpha$ -tokoferola.....	43
4.2.4	Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom luteina ...	44
4.2.5	Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom $\alpha$ -tokoferola.....	45
4.2.6	Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in luteina .....	46
4.2.7	Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in $\alpha$ -tokoferola.....	47
4.2.8	Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom luteina in $\alpha$ -tokoferola.....	48
4.3	REZULTATI VSEBNOSTI I-ASKORBINSKE KISLINE, I-DEHIDRO-ASKORBINSKE KISLINE IN $\alpha$ -TOKOFEROLA .....	49
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>50</b>
5.1	RAZPRAVA.....	50
5.1.1	Askorbinska kislina .....	50
5.1.2	Antioksidativni potencial.....	51
5.2	SKLEPI.....	53
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>56</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Podatki o povprečni prehranski vrednosti sadno-žitne rezine Frutabela 7 sadežev z vlaknino (Fructal, 2008a) .....	4
<b>Preglednica 2:</b> Fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline (Davey in sod., 2000). .....	16
<b>Preglednica 3:</b> Strukture tokoferolov (Sen in sod., 2006). .....	19
<b>Preglednica 4:</b> Strukture tokotrienolov (Sen in sod., 2006). .....	19
<b>Preglednica 5:</b> Prikaz količine dodatkov askorbinske kisline, luteina in $\alpha$ -tokoferola v maso Frutabele. ....	31
<b>Preglednica 6:</b> Koncentracija askorbinske kisline v Frutabeli z dodatkom 100 mg askorbinske kisline na 100 g Frutabele. ....	36
<b>Preglednica 7:</b> Koncentracija askorbinske kisline v Frutabeli z dodatkom 100 mg askorbinske kisline, 200 mg 2 % luteina in 30 mg 50 % $\alpha$ -tokoferola na 100g Frutabele. ....	37
<b>Preglednica 8:</b> Koncentracija askorbinske kisline v Frutabeli z dodatkom 100 mg askorbinske kisline in 200 mg 2 % luteina na 100 g Frutabele. ....	38
<b>Preglednica 9:</b> Koncentracija askorbinske kisline v Frutabeli z dodatkom 100 mg askorbinske kisline in 30 mg 50 % $\alpha$ -tokoferola na 100 g Frutabele. ....	39
<b>Preglednica 10:</b> Statistična primerjava dveh neodvisnih vzorcev (t-test) .....	40
<b>Preglednica 11:</b> Rezultati analize vsebnosti L-askorbinske kisline, L-dehidroaskorbinske kisline in $\alpha$ -tokoferola v treh različnih vzorcih .....	49



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Bločni diagram postavitve strojev na liniji za proizvodnjo sadnih rezin (Fructal, 2008c).....	6
<b>Slika 2:</b> Strukturna formula l-askorbinske kisline (Davey in sod., 2000).....	16
<b>Slika 3:</b> Oksidacija l-askorbinske kisline (Davey in sod., 2000). ....	17
<b>Slika 4:</b> Strukturna formula tokoferola (Sen in sod., 2006). ....	19
<b>Slika 5:</b> Strukturna formula tokotrienola (Sen in sod., 2006). ....	19
<b>Slika 6:</b> Struktura likopena, beta-karotena in luteina (El-Agamey in sod., 2004). ....	21
<b>Slika 7:</b> Relativne spremembe skupne antioksidativne aktivnosti med toplotno obdelavo sadno-zelenjavnega matriksa (Nicoli in sod., 1999). ....	25
<b>Slika 8:</b> Interakcije med lipidnim peroksilnim radikalom ( $\text{LOO}^\bullet$ ), karotenoidi (CAR), karotenoidnim radikalom ( $\text{CAR}^{+\bullet}$ ), $\alpha$ -tokoferoksilnim radikalom ( $\alpha\text{-TO}^\bullet$ ) in askorbinsko kislino (AscH), v lipidni in vodni fazi (Krinsky in Yeum, 2003). ....	26
<b>Slika 9:</b> Shematski diagram oksidacije $\alpha$ -tokoferola in redukcijski cikel z askorbinsko kislino in glutationom (Kitts, 1997). ....	27
<b>Slika 10:</b> Umeritvena krivulja za določanje koncentracije l-askorbinske kisline .....	34
<b>Slika 11:</b> Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatkom različnih kombinacij antioksidantov v osem tedenskem poskusu pri 37 °C. ....	40
<b>Slika 12:</b> Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine brez dodatkov v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.....	41
<b>Slika 13:</b> Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.....	42
<b>Slika 14:</b> Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline, luteina in $\alpha$ -tokoferola v osem tedenskem poskusu pri 37 °C. ....	43
<b>Slika 15:</b> Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom luteina v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.....	44
<b>Slika 16:</b> Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom $\alpha$ -tokoferola v osem tedenskem poskusu pri 37 °C. ....	45

<b>Slika 17:</b> Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in luteina v osem tedenskem poskusu pri 37 °C .....	46
<b>Slika 18:</b> Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in $\alpha$ -tokoferola v osem tedenskem poskusu pri 37 °C .....	47
<b>Slika 19:</b> Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom luteina in $\alpha$ -tokoferola v osem tedenskem poskusu pri 37 °C .....	48

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	askorbinska kislina
AOP	antioksidativni potencial
BHA	butilhidroksianizol
BHT	butilhidroksitoluen
DPPH <sup>•</sup>	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
MK	maščobna kislina
PG	propil galat

## 1 UVOD

Sadno-žitne rezine postajajo vse bolj popularna oblika tako imenovane hitre prehrane. Glavna surovina za izdelavo sadno-žitnih rezin so žita ter suho sadje, za izboljšanje njihove prehranske vrednosti pa se dodajajo razni dodatki, kot so minerali, vitamini, itd... V sadno-žitne rezine se dodajajo tudi antioksidanti za izboljšanje oksidativne stabilnosti. Obstojnost nekaterih vitaminov je problematična, saj rezultati nekaterih študij kažejo, da se zelo hitro razgradijo. Možnost za povečanje stabilnosti vitaminov je v dodatku sinergističnih antioksidativnih vitaminov v različnih kombinacijah.

Askorbinska kislina (vitamin C) in  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) delujeta kot močna in morda najpomembnejša antioksidanta. Vsak posebej delujeta s svojim lastnim mehanizmom, medtem ko je njuno skupno delovanje sinergistično.  $\beta$ -karoten (pro-vitamin A) ima manjšo antioksidativno aktivnost kot  $\alpha$ -tokoferol in v raztopini deluje kot šibak antioksidant, vendar ima prav tako sposobnost zmanjševanja reaktivnosti posameznih molekul v sistemu, kjer so prisotni prosti radikali. Medtem, ko je reakcija med vitaminom C in vitaminom E kooperativna (sinergistična) in učinkovita, pa naj bi bila interakcija med vitaminom C in  $\beta$ -karotenom nemogoča, med vitaminom E in  $\beta$ -karotenom pa mogoča (Niki in sod., 1995).

Antioksidativno aktivnost pa imajo tudi nekateri produkti Maillardove reakcije, ki običajno poteka predvsem pri višjih temperaturah, vendar pa lahko reakcija med prostimi amino skupinami in reducirajočimi sladkorji poteka tudi pri nižjih temperaturah med dolgotrajnim skladiščenjem. Produkti Maillardove reakcije delujejo kot antioksidanti, pod določenimi pogoji pa tudi kot prooksidanti, kar je nezaželeno, saj tako pospešujejo oksidacijo v raznih žitno-sadno-zelenjavnih proizvodih (Nicoli in sod., 1999).

## 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil v možnosti povečanja prehranske vrednosti in oksidativne stabilnosti sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola. Preučevali smo stabilnost vitaminov v sadnih rezinah obogatenih z askorbinsko kislino, luteinom in  $\alpha$ -tokoferolom, ter njihov vpliv na skupni antioksidativni potencial. Uporabili smo razne kombinacije omenjenih vitaminov ter določili stabilnost le-teh pri skladiščenju v pogojih pospešenega staranja pri 37 °C.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- dodatki askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola povečajo antioksidativni potencial,
- dodatki luteina in  $\alpha$ -tokoferola povečujejo obstojnost askorbinske kisline,
- produkti Maillardove reakcije povečujejo skupni antioksidativni potencial.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SADNO-ŽITNA REZINA

Sadno-žitne rezine spadajo v skupino proizvodov hitre prehrane in so narejene iz dehidrirane sadne kaše in s tehnološkim postopkom valjanja v plasti (Vijayanand in sod., 2000). Sadno-žitne rezine so zdravstveno ustrenejša alternativa raznim slaščičarskim izdelkom, ker so njihova glavna sestavina žita, sadje in razni oreščki. Na žalost pa dobimo na trgu veliko podobnih izdelkov s povečano vsebnostjo maščobe in sladkorjev, kar jim kljub žitu in sadju zmanjšuje prehransko vrednost. Cilji in prizadevanja temeljijo na tem, da bi podobni izdelki vsebovali čim več minimalno predelanega žita, koščke sadja in oreščkov, ter z minimalnim dodatkom raznih aditivov. Namesto sladkorja bi bilo bolje uporabiti koncentrirane sadne sokove. Higgs in Styles (2006) sta pri raziskavi o šolski prehrani ugotovila, da je v sadnih rezinah povprečno 40 % sadnega deleža, od tega pa je večina v obliki koncentrata sadnih sokov in brez koščkov sadja. Sadna rezina naj bi izgledala kot slaščica, ker bi bila s tem privlačnejša za otroke, obenem pa bi imela bogato prehransko vrednost (Higgs in Styles, 2006).

Sadno-žitne rezine so bile razvite zaradi potrebe po pred pripravljenih in hitro dostopnih sadno-žitnih obrokih, ki jih lahko zaužijemo brez predhodne rehidracije. Zaradi zelo nizke vodne aktivnosti so odporne proti mikrobiološkemu kvaru in ne zahtevajo posebnih skladiščnih pogojev. Zaradi vseh pozitivnih lastnosti se sadno-žitne rezine veliko uporabljajo v vojaški prehrani, na vesoljskih misijah, razni delavci na terenu, popotniki in drugi, ki želijo hiter, kakovosten in zdrav sadno-žitni obrok (Rahman in Schafer, 1972).

Ahmad in sod. (2005) so določali fizikalno-kemijske lastnosti raznih sadnih rezin in ugotovili, da vsebujejo povprečno 21 % vlage, 78 °Brix suhe snovi, pH 4,4, 0,80 g skupnih kislin na 100 g izdelka in 41 mg vitamina C v 100 g izdelka. Po štiri mesečnem skladiščenju na sobni temperaturi je prišlo do povprečno 23 % izgube vitamina C, pH pa se je znižal v povprečju za 0,3 enote (Ahmad in sod., 2005). Rahman in Schafer (1972) pa poročata, da lahko pri sadno-žitnih rezinah predstavlja velik problem prevelika izguba vode, zaradi skladiščne atmosfere s prenizko relativno vlago, kar povzroči, da postanejo rezine presuhe in trde, zato so skoraj neužitne brez predhodne rehidracije.

Na trdoto sadnih rezina pa poleg vlage znatno vpliva tudi vrsta sadja iz katerega je rezina narejena. Trše so predvsem sadne rezine, ki vsebujejo smokve in hruške (Rahman in Schafer, 1972).

### 2.1.1 Sadno-žitna rezina Frutabela sedem sadežev z vlaknino

Sadno žitna rezina Frutabela 7 sadežev z vlakninami je sestavljena iz sedmih različnih vrst sadja: jabolka, hruške, višnje, kokos, belo grozdje, rdeče grozdje in aronija. Sadju so primešani ovseni kosmiči in ovsena vlaknina. Oblita je s čokoladnim prelivom brez sladkorja. Masa sadne rezine je 35 g.

Sestavine sadne rezine so: jabolčna kaša (32 %), hruškova kaša (8 %) ter višnjeva kaša (2 %), kokosova moka (13 %), koščki suhih jabolk (7 %), rozine (6 %), zgoščeni sadni sokovi iz grozdja (20 %) in aronije (0,3 %), ovseni kosmiči (11 %), stabilizator sorbitol, inulin, robidnice (4 %), ovsena vlaknina in hidrogenirana rastlinska maščoba. Vse skupaj je prelito z brezsladkornim mlečnim čokoladnim oblivo (18 %).

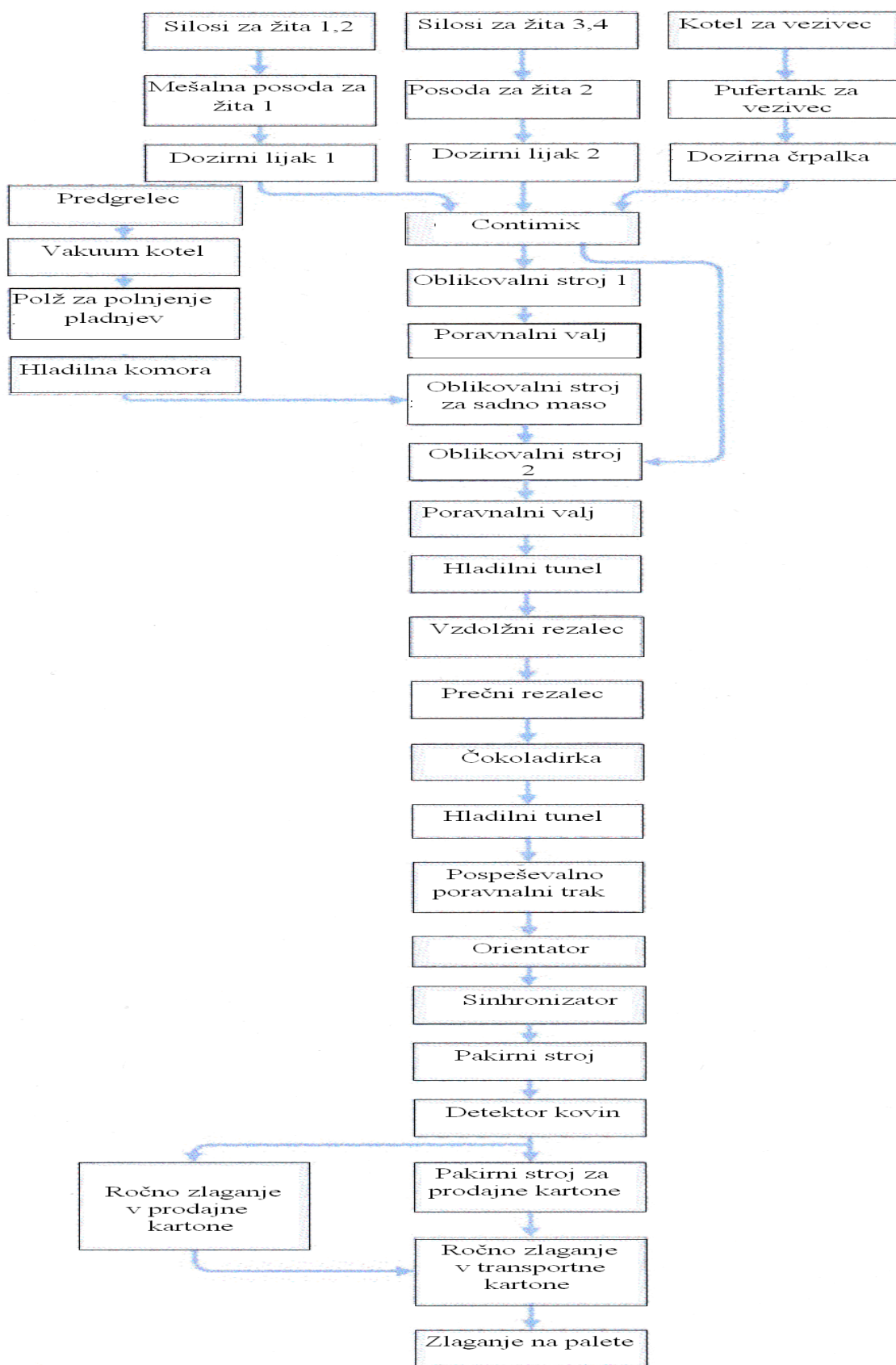
Preglednica 1: Podatki o povprečni prehranski vrednosti sadno-žitne rezine Frutabela 7 sadežev z vlaknino (Fructal, 2008a)

<b>Hranilna vrednost</b>	<b>v 100 g</b>	<b>v 35 g</b>
<b>Energijska vrednost</b>	1301 kJ (311 kcal)	455kJ (109 kcal)
<b>Beljakovine</b>	4,6 g	1,6 g
<b>Ogljikovi hidrati</b>	33,3 g	11,7 g
<b>od teh sladkorji</b>	19,3 g	6,8 g
<b>Maščoba od te nenasičene</b>	17,7 g	6,2 g
<b>MK</b>	12,9 g	4,5 g
<b>Vlaknine</b>	10,7 g	3,7 g
<b>Natrij</b>	0,04 g	0,01 g

### 2.1.2 Proizvodnja sadne rezine

Postopek se začne s pripravo sadne mase. Najprej zmeljejo zmrznjene sadne kaše (namesto teh uporabljajo tudi sadne kaše v tekočem stanju), jih v predgrelniku segrejejo in dozirajo v vakuumski izparilnik ali kotel. Dodajo se sladkor v razsutem stanju in ostale komponente. Po dodatku vseh surovin prične odparevati voda, da na koncu ostane sadna masa z visoko vsebnostjo suhe snovi in s primerno čvrsto konsistenco. Sadna masa se nato ohladi in uporabi na proizvodni liniji kot sadni delež rezin. Žitne komponente premešajo skupaj s toplim vezivnim sredstvom. Dobijo toplo žitno maso, ki jo spuščajo na proizvodno linijo, kjer se na dveh modelih oblikujeta spodnji in zgornji žitni sloj. Med njima je lociran sadni sloj. Ta sadno-žitna masa gre skozi hladilni tunel tako, da se ohladi in pridobi na kompaktnosti. Na koncu prvega hladilnega tunela so vzdolžni rezalniki, ki sadno-žitno maso razrežejo na več trakov, za njimi pa še prečni rezalniki, ki oblikujejo posamezne rezine. Sledi jogurtov preliv, za Frutabelo sedem sadežev pa čokoladni preliv. Po prelivanju potuje rezine skozi drug hladilni tunel, kjer se preliv ohladi in strdi. Suhe in čvrste rezine se pakirajo v stroju za posamično pakiranje. Folija za pakiranje je večslojna z vmesnim aluminijastim slojem, ki podaljšuje obstojnost. Po pakiranju gredo rezine skozi detektor kovin, kateri odstrani rezine, ki vsebujejo delce kovin. Sledi pakiranje posameznih ovitih rezin v prodajne kartončke s po 24 kosi rezin. Prodajne kartone nato zložijo v transportni karton v katerem je 6 prodajnih kartončkov (Fructal, 2001).





Slika 1: Bločni diagram postavitve strojev na liniji za proizvodnjo sadnih rezin (Fructal, 2008b)

### 2.1.2.1 Opis strojev na liniji za proizvodnjo sadno-žitnih rezin

#### **Predgrelec**

V predgrelec se avtomatsko dozira bonbonski sirup in ostale sadne surovine. Tu se predgrejejo in dobro razmešajo. Ogrevanje poteka indirektno s paro (dvojni plašč).

#### **Vakuum kotel**

V vakuum kotlu poteka kuhanje in koncentriranje-izparevanje sadne mase, ki je prišla iz predgrelca. Vakuum v kotlu se doseže z vakuumsko črpalko pod kotlom.

#### **Polž za polnjenje pladnjev**

S pomočjo polža se sadna masa vodi ven iz kotla, kjer jo polnijo v pladnje. Pladnje se postavlja na vozičke.

#### **Hladilna komora**

Ogreta sadna masa iz kotla je tekoča, zato vozičke s pladnji postavijo za določen čas v hladilno komoro, kjer se ohladi.

#### **Temperirna komora**

Iz hladilne komore gredo vozički še v temperirno komoro, kjer stojijo 36 ur z namenom enakomerne porazdelitve temperature po celotni masi v pladnju.

#### **Silos za žita**

V silosih za žita se hranijo in avtomatsko dozirajo žitne komponente (riževi kosmiči, ovseni kosmiči, koruzni kosmiči).

#### **Mešalna posoda za žita**

V posodo za žita se s podtlakom izvaja transport žit iz silosov. Ko je dosežena zahtevana masa v mešalni posodi, se z ventilatorjem, ki je prej ustvarjal podtlak, izvede vpihovanje zraka za transport žit. Vpihovanje poteka od spodaj navzgor, da se s tem žita tudi premešajo.

### **Dozirni lijak**

Skozi dozirni lijak poteka doziranje prave količine žita v Contimix.

### **Kotel za vezivno sredstvo**

V kotlu za vezivno sredstvo poteka kuhanje bonbonskega sirupa in drugih surovin. Ogrevanje je indirektno s paro. Vezivno sredstvo se dozira v žita kot vezivo.

### **Contimix**

Contimix premeša žita in vezivno sredstvo v homogeno maso. Mešanje poteka z dvema vzporednima polžema, ki sta postavljena eden ob drugem. Med polže se dozira vezivno sredstvo ter žita.

### **Oblikovalni stroj**

Ta stroj nam premeša maso iz Contimixa in oblikuje v obliko tepiha. Oblikovanje poteka s pomočjo treh valjev.

### **Poravnalni valj**

Poravnalni valj se med premikanjem tepiha po tekočem traku vrti. Zaradi nastavljene višine valja se tepih valja na določeno debelino in obenem poravna.

### **Hladilni tunel**

Skozi hladilni tunel, se masa premika s pomočjo tekočega traku in se medtem ohlaja z vpihovanjem hladnega zraka.

### **Vzdolžni rezalec**

Stroj ima valj, na katerem so postavljene po štiri krožne žage. Razmak med žagami je za širino rezine. Med premikanjem mase skozi stroj, se le-ta vzdolžno reže.

### **Prečni rezalec**

Na stroju je postavljena posebna giljotina, ki prečno reže maso na ustrezno dolžino.

### **Čokoladirka**

Na tem stroju poteka nanašanje čokoladnega preliva na sadne rezine. Nanašanje poteka tako, da stroj rezine obliva oziroma pri nekaterih skrbi le za namakanje spodnjega dela rezine. Seveda pa pred izvajanjem tega postopka grelci na stroju topijo in temperirajo čokoladni preliv.

### **Orientator**

Tu se rezine obrnejo iz prečne lege v vzdolžno. Obračanje poteka tako, da rezine ob premikanju po tekočem traku, zadenejo ob oviro, ki jih zavrti.

### **Sinhronizator**

Sinhronizator razporedi rezine na pravilno medsebojno razdaljo.

### **Pakirni stroj**

Pakirni stroj vstavlja rezine v embalažo, ki je predhodno vzdolžno varjena. Nato stroj še prečno vari in reže embalažo v kateri so rezine.

### **Detektor kovin**

Detektor zaznava morebitne kovinske tujke v pakirani rezini.

## 2.2 ANTIOKSIDANTI

### 2.2.1 Definicija in splošni pomen antioksidantov

Po definiciji živilcev so antioksidanti tiste sestavine živil oz. tisti dodatki živilom, ki so bodisi lovilci radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo ali zmanjšujejo pojav žarkosti živil in druge oksidativne spremembe senzoričnih in prehranskih lastnosti živil.

Po definiciji dietetikov in nutricionistov so antioksidanti vsaj še (endogene ali eksogene) snovi, ki ščitijo telo pred kvarnim vplivom prostih radikalov, kovinskih ionov in raznih drugih oksidantov (Vidrih in Kač, 2000).

Osnovna funkcija antioksidantov je preprečevanje oksidacije biološko in senzorično pomembnih komponent živil. Spontane reakcije organskih snovi z atmosferskim kisikom, vodijo do številnih sprememb, ki so v večini primerov nezaželene (Raspor in sod., 2000).

Porušeno ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul. Antioksidanti, ki telo ščitijo pred učinki prostih radikalov so encimi (superoksidna dismutaza, katalaza, glutationska peroksidaza, metionin sulfoksid reduktaza...), vitamini (A, E, C), karotenoidi, bioflavonoidi, katehini, itn., ter mikrorudnine selen, cink, baker, mangan. Nekatere antioksidante sintetizira telo samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (antioksidativni vitamini, kovine v sledovih) (Korošec, 2000).

Antioksidante razvrščamo v tri skupine. V prvi skupini so pravi antioksidanti, ki vežejo proste radikale, v drugi skupini so reducenti, v tretji pa antioksidantni sinergisti, ki povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine (Korošec, 2000).

### **Primarni antioksidanti**

Primarni antioksidanti nastajajo v organizmu ali pa jih tvorijo mikroorganizmi, predvsem encimi. Njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov. Med primarne antioksidante prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinajo verižno reakcijo avtooksidacije (Raspor in sod., 2000).

### **Sekundarni antioksidanti**

Sekundarni antioksidanti nevtralizirajo novonastale proste radikale in preprečujejo, da bi vstopali v verižne reakcije in tvorili nove proste radikale. To so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo.

Delujejo lahko kot:

- odjemalci kisika: z reakcijo odvzemanja kisika preprečijo neželjeno oksidacijo živil. Te spojine reagirajo s prostim kisikom in ga kot takšnega odstranijo iz reakcije. Prost kisik reagira z odjemalci kisika, ki jih tudi oksidira. Med najpogostejše odjemalce kisika spadajo: askorbinska kislina, flavonoidi, karatenoidi, polifenoli, sulfiti.
- odjemalci radikalov: te snovi preprečujejo prostim radikalom reagiranje pri verižnih reakcijah s tem, da preprečijo tvorbo hidroperoksidov. Med najpogostejše lovilce radikalov spadajo: flavonoidi, polifenoli, karatenoidi, tokoferoli.
- sinergisti: so snovi, ki po načinu delovanja niso antioksidanti, vendar znatno povečajo njihovo delovanje. Tako je citronska kislina aktivna s primarnimi antioksidanti in odjemalci kisika. Glavni princip reakcije je v tem, da elektronski par v strukturi sinergista pospešuje tvorbo kelatov. S tem se tvorijo stabilne oblike s kovinskimi ioni, kot sta železo in baker. Med najpogostejše sinergiste spadajo: estri citronske kisline, citronska kislina, lecitin, polifosfati in vinska kislina (Raspor in sod., 2000).

### **Terciarni antioksidanti**

So snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročijo prosti radikali v strukturi celice. Največkrat so to encimi, ki popravljajo poškodbe DNA (Raspor in sod., 2000).

Smotri uporabe antioksidantov so:

- podaljšanje obstojnosti živil,
- zmanjšanje izgube hranilnih snovi,
- znižanje stroškov.

Lastnosti idealnega antioksidanta:

- varen za uporabo,
- ne prizadene zelenih okusov in barv,
- učinkovit pri nizkih koncentracijah,
- enostavna vključitev v izdelek,
- odporen na postopke toplotne obdelave,
- dostopen po nizkih cenah.

Antioksidanti se v živila lahko dodajajo direktno z vmešavanjem, s pomočjo razprševanja ali pa so vgrajeni v embalažne materiale.

Uporaba antioksidanta v obliki prahu ima dokazano večjo antioksidativno učinkovitost kot raztopina istega antioksidanta (Bernot - Sotenšek, 2001).

Ločimo dve veliki skupini antioksidantov:

- naravni (askorbinska kislina, vitamin A, ekstrakti nekaterih začimb),
- sintetični (butilhidroksianizol – BHA, butilhidrositoluen – BHT, propil galat – PG...).

Sintetični antioksidanti so mnogo cenejši, vendar je zaradi toksičnosti nekaterih pri uporabi potrebna pazljivost. Butil hidroksi toluen (BHT) in butil hidroksi anizol (BHA) sta močna sintetična antioksidanta, vendar obstaja sum, da vsebujeta določene substance, ki povzročajo raka (Škvarča, 2000).

Po kemijski zgradbi so vodotopni (askorbinska kislina-vitamin C, glutation, flavonoidi) in v maščobah topni (ubikinon-koencim Q<sub>10</sub>, vitamin E, karotenoidi) (Korošec, 2000).

V večini primerov industrijske predelave živil, kakor tudi med domačo pripravo obrokov, prihaja do bistvenega zmanjšanja vsebnosti in aktivnosti naravnih antioksidantov. Večina antioksidantov izgubi v procesu predelave antioksidativne lastnosti zaradi nestabilnosti. Veliko raziskav obravnava vpliv različnih toplotnih procesov na oksidativno in termično razgradnjo askorbinske kisline. Precej je tudi raziskan vpliv svetlobe, kisika in temperature na razgradnjo tokoferolov in fenolnih snovi ter vpliv izomerizacije  $\beta$ -karotena na aktivnost vitamina A (Hribar in Simčič, 2000).

### **2.2.2 Določanje antioksidativnega potenciala z metodo DPPH**

Ena najstarejših indirektnih metod, za določanje antioksidativne učinkovitosti, je metoda z radikalom DPPH $\cdot$  (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metoda temelji na reakciji med DPPH $\cdot$  radikalom in donorji vodika. DPPH $\cdot$  je stabilen radikal s sposobnostjo delokalizacije prostega elektrona okrog celotne molekule (Molyneux, 2004). DPPH $\cdot$  ima velik molarni absorpcijski koeficient z maksimumom pri 517 nm, kar lahko izkoristimo za to, da merimo koncentracijo radikala DPPH $\cdot$  spektrofotometrično (Roginsky in Lissi, 2005). Ko alkoholna raztopina DPPH $\cdot$  reagira z antioksidantom, se tvori reducirana oblika DPPH $_2$ , kar povzroči spremembo barve iz vijolične v rumeno. Če molekula DPPH $\cdot$  reagira samo z eno molekulo antioksidanta, potem je stehiometrično razmerje 1:1. V primeru, da ima molekula antioksidanta, ki reagira z DPPH $\cdot$  radikalom, dve vezalni mesti (npr. askorbinska kislina in  $\alpha$ -tokoferol), pa je teoretično razmerje med DPPH $\cdot$  in antioksidantom 2:1. Koncentracijo DPPH $\cdot$  izberemo v območju med 50 in 100  $\mu$ M, tako da so vrednosti absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. Reakcijski čas metode naj bi bil okrog 30 minut, valovna dolžina pri kateri merimo absorbanco pa med 515 in 520 nm.

Rezultate lahko podajamo z izračunom razmerja med številom molov DPPH $\cdot$ , ki zreagira s številom molov določenega antioksidanta. V praksi pa se zaradi kompleksnosti in nepoznavanja dejanske sestave in molarosti antioksidantov, podaja antioksidativno učinkovitost vzorca kot razmerje med številom molov DPPH $\cdot$ , ki reagirajo z antioksidanti v 1 g suhe snovi (Molyneux, 2004).



## 2.3 VITAMINI

Vitamini so organske spojine najrazličnejših struktur in kemijskih lastnosti. V živilih se nahajajo v majhnih količinah, vendar so nujno potrebni za normalno delovanje človeškega organizma (Medić in sod., 2000).

### 2.3.1 Vitamin C

#### 2.3.1.1 Splošne značilnosti

Askorbinska kislina, imenovana tudi vitamin C je najmočnejši antioksidant med vodotopnimi vitamini (Medić in sod., 2000). Je zelo pogosto uporabljen antioksidant v živilstvu z namenom ohranjanja organoleptične kakovosti živil (Kitts, 1997). Kot antioksidant sodeluje v različnih reakcijah celičnega metabolizma. Pred oksidativnimi poškodbami lahko zaščiti komponente celične membrane in citosola. Deluje kot primarni antioksidant v citosolu in pobira proste radikale, ki nastajajo kot produkt celičnega metabolizma (Chepda in sod., 2001). Askorbinska kislina ima poleg vitamina E tudi veliko vlogo pri fotozaščiti kožnih celic pred UV svetlobo (Offord in sod., 2002).

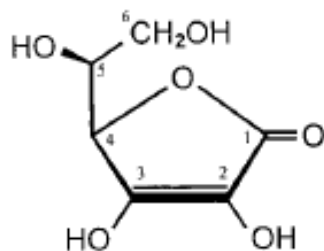
#### 2.3.1.2 Zgodovina

Vitamin C je eden najbolj raziskanih in največkrat opisanih vitaminov. Začetek zgodovine C vitamina je bil povezan z zdravljenjem in preprečevanjem skorbuta. Prvi pisni viri bolezni sežejo še v čas Egipta, Grčije in Rima. Pozneje je bolezen v 16. stoletju zahtevala mnoge smrtne žrtve, predvsem mornarjev, ker so imeli na razpolago le konzervirano hrano (Davies, 1991). Jack Cartier je že davnega leta 1535 preučeval možnost zdravljenja skorbuta z limoninim sokom. Od takrat številne študije raziskujejo povezanost pojavljanja skorbuta z nepravilno prehrano. Nadaljnje raziskave je leta 1747 nadaljeval zdravnik britanske mornarice James Lind, ki je preučeval možnost zdravljenja skorbuta pri britanskih mornarjih. Ugotovil je, da se s plodovi in sokovi citrusov hitro dosežejo pozitivni rezultati v zdravljenju. Leta 1907 sta Holst in Frölich ugotovila, da lahko morski

prašiček dobi skorbut, če se hrani le z otrobi in ovsom brez dodatka sveže zelenjave. S tem je bilo dokazano, da nekateri sesalci ne morejo sami sintetizirati vitamina C, med njimi so človek, opica in morski prašiček (Medić in sod., 2000). Prvi je C vitamin v kristalinični obliki izoliral madžarski znanstvenik Szent-Gyorgyi. Imenoval ga je heksuronska kislina z empirično formulo  $C_6H_8O_6$ . Leta 1932 je bila odkrita prava identiteta heksuronske kisline, ki je imela enako sestavo kot vitamin C. Heksuronska kislina je bila preimenovana glede na svojo fiziološko delovanje v L-askorbinsko kislino, s čimer je izražena njena antiskorbutna sposobnost. Za svoje delo je leta 1937 znanstvenik Albert Szent-Gyorgyi dobil Nobelovo nagrado (Davies in sod., 1991).

### 2.3.1.3 Kemijske lastnosti

V živilih se nahajata dve obliki vitamina C, askorbinska kislina in dehidroaskorbinska kislina, obe obliki pa imata vitaminsko aktivnost (Gkömen in Acar, 1996). L-askorbinska kislina je močan reducent, v oksidirani obliki je kot L-dehidroaskorbinska kislina, ki se v encimsko kataliziranih reakcijah oksidacije in redukcije pretvarjata ena v drugo (Basu in Dickerson, 1996). Kemično je askorbinska kislina lakton 2-keto-l-glukonske kisline (Rudan-Tasič, 2000) oziroma aldono-1,4 lakton heksuronske kisline, ki je po strukturi podobna heksoznim sladkorjem (Davey in sod., 2000). Zaradi enolnih hidroksilnih skupin vezanih na C2 in C3 atomu, med katerima je dvojna vez, kaže L-askorbinska kislina močno kisle lastnosti (Rudan-Tasič, 2000; Davey in sod., 2000). Na četrtem in petem mestu ima dva kiralna centra, ki omogočata štiri različne izomere: (L-askorbinska kislina, D-askorbinska kislina, L-araboaskorbinska kislina in D-araboaskorbinska kislina (eritorbinska kislina). L-izomera askorbinske kisline deluje kot vitamin, D-izomera pa ne (Davies, 1991). V območju fiziološkega pH (okrog 7) je L-askorbinska kislina v obliki monovalentnega aniona (L-askorbata) (Davey in sod., 2000). Točka disociacije hidroksilne skupine na 3C atomu je  $pK_{a1}=4,13$ , na 2C atomu pa  $pK_{a2}=11,6$  (Davey in sod., 2000).



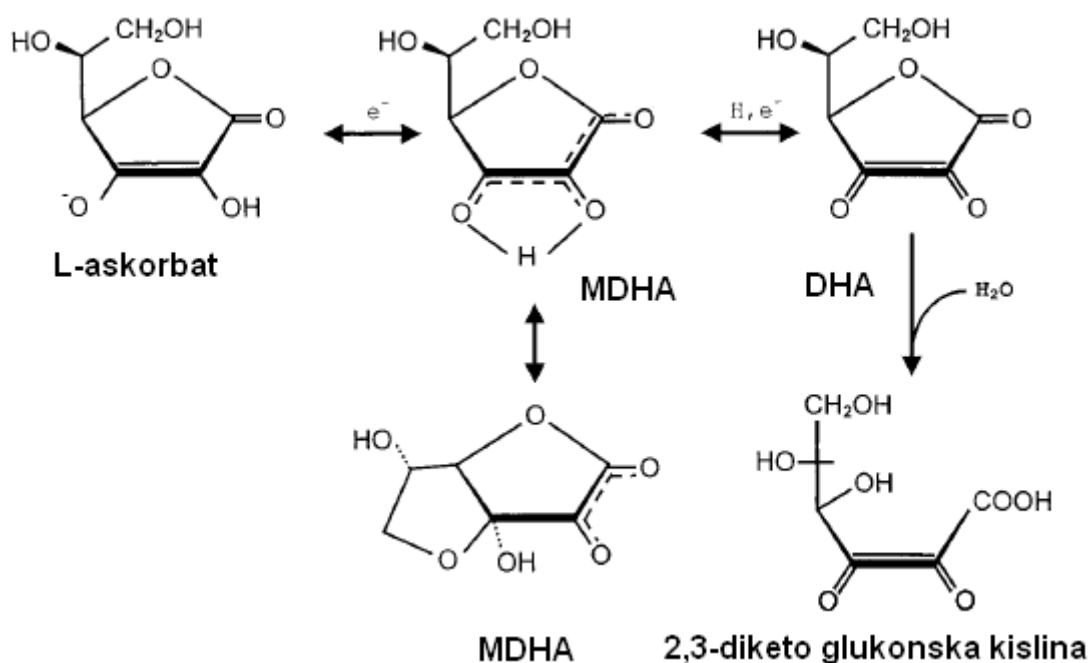
Slika 2: Strukturna formula L-askorbinske kisline (Davey in sod., 2000).

Preglednica 2: Fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline (Davey in sod., 2000).

Izgled	Bela kristalinična snov, brez vonja in z ostro kislim okusom
Formula / Molska masa	$C_6H_8O_6$ / 176,13 g/mol
Točka tališča	190-192 °C
Gostota	1,65 g/mm <sup>3</sup>
pH vrednost	3 ( 5 mg/ml) 2 (50 mg/ml)
pK1	4,13
pK2	11,6
Topnost:	
Voda	0,33 g/ml
95 % etanol	0,033 g/ml
Glicerol	0,01 g/ml
Maščobe in olja	Netopna

### 2.3.1.4 Stabilnost vitamina C

Obe obliki vitamina C, L-askorbinska kislina in L-dehidroaskorbinska kislina, se oksidirata predvsem pri izpostavljenosti povišanim temperaturam, prisotnosti nekaterih dvovalentnih kationov, alkalnem pH, svetlobi in degradacijskim encimom (Odriozola-Serrano in sod., 2007). Askorbinska kislina je najbolj stabilna v suhi obliki (Davey in sod., 2000). Oksidacija askorbinske kisline v dehidroaskorbinsko kislino je reverzibilna, dehidroaskorbinska kislina pa se lahko ireverzibilno hidrolizira do diketoglukonske kisline, ki pa nima biološke aktivnosti vitamina C (Odriozola-Serrano in sod., 2007).



Slika 3: Oksidacija L-askorbinske kisline (Davey in sod., 2000).

Oksidacija in izguba vitaminov med predelavo in kuhanjem povzroča veliko skrbi nutricionistom, predelovalcem in porabnikom. Zaradi svoje občutljivosti na razgradnjo med postopki predelave in staranja, se vitamin C uporablja tudi kot pokazatelj ustrezne prehranske kakovosti sadja in sadnih izdelkov ter ocenitev vsebnosti ostalih biološko pomembnih sestavin (Odriozola-Serrano in sod., 2007). Med sušenjem sadja, pade koncentracija vitamina C tudi za 75 % ( Davey in sod., 2000).

### 2.3.2 Vitamin E

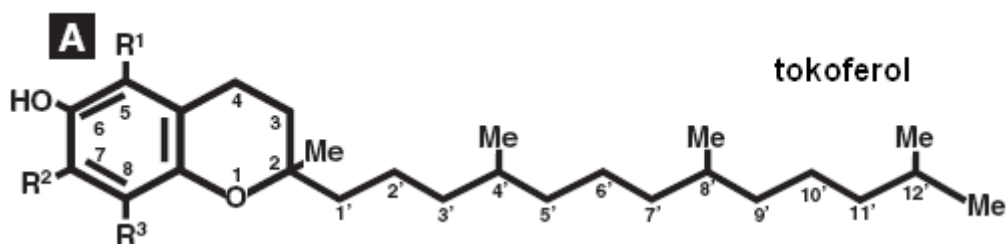
Vitamin E je v maščobah topen vitamin. Poznamo osem različnih oblik vitamina E, ki so razdeljene v dve skupini, tokoferoli (nasičena C<sub>16</sub> izopropenoidna veriga) in tokotrienoli (nenasičena C<sub>16</sub> izopropenoidna veriga) z različno biološko aktivnostjo (Meydani, 1995).

Vitamin E je esencialni vitamin v humani prehrani in je sintetiziran izključno v organizmih, ki imajo fotosintezo (Sen in sod., 2006). Vitamin E obstaja v naravi kot zmes kemijsko med seboj podobnih spojin, ki so metilni derivati tokola. Razlikujejo se le po položaju in številu metilnih skupin na benzenovem obroču (Rudan-Tasič, 2000). Največjo biološko aktivnost med vsemi oblikami ima  $\alpha$ -tokoferol in je najboljši lipofilen antioksidant *in vivo* (Niki in sod., 1995).

V živilski industriji ima dodajanje  $\alpha$ -tokoferola in ostalih tokoferolov različnim živilom bolj kot samo povečanje vsebnosti vitamina E (izboljšava hranilne vrednosti živil), predvsem namen povečati obstojnost živil (Rudan-Tasič, 2000).

#### 2.3.2.1 Kemijske lastnosti

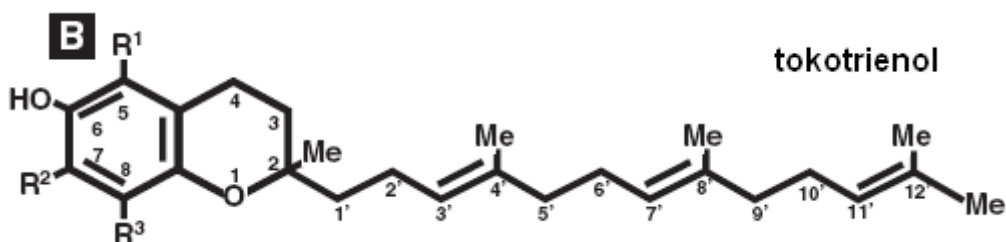
Najpomembnejši tokoferol je  $\alpha$ -tokoferol (5,7,8-trimetiltokol), ki predstavlja 90 % vseh tokoferolov v živalskih tkivih. Pojavlja se v dveh optično izomernih oblikah, od katerih je D-oblika aktivnejša od L-oblike.  $\alpha$ -tokoferol je derivat kromana z izoprenoidno bočno verigo. Ena najpomembnejših kemijskih lastnosti tokoferola je, da deluje kot antioksidant v preventivi lipidne peroksidacije polinenasičenih maščobnih kislin v celičnih membranah. Antioksidativna aktivnost  $\alpha$ -tokoferola je podobna aktivnosti glutation peroksidaze, ki vsebuje selen (Medić-Šarić in sod., 2000).



Slika 4: Strukturna formula tokoferola (Sen in sod., 2006).

Preglednica 3: Strukture tokoferolov (Sen in sod., 2006).

Oblike tokoferola	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>α-tokoferol</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>β-tokoferol</b>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<b>γ-tokoferol</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>δ-tokoferol</b>	H	H	CH <sub>3</sub>



Slika 5: Strukturna formula tokotrienola (Sen in sod., 2006).

Preglednica 4: Strukture tokotrienolov (Sen in sod., 2006).

Oblike tokotrienola	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>α-tokotrienol</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>β-tokotrienol</b>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<b>γ-tokotrienol</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>δ-tokotrienol</b>	H	H	CH <sub>3</sub>

### 2.3.2.2 Stabilnost vitamina E

Na stabilnost tokoferolov lahko vplivajo okoliški dejavniki, kot so svetloba, kisik in temperatura. Vplivajo pa tudi lastnosti živila, kot so vsebnost vode, vodna aktivnost, stopnja oksidacije lipidov, visok pH in že majhna količina prisotnih kovinskih ionov. Sintetična oblika tokoferola je manj občutljiva kot naravni tokoferol (Miquel in sod., 2004). Pri povišani temperaturi se razgrajujejo vse oblike vitamina E, vendar je hitrost razpada odvisna od izomere. Raziskava na stabilnosti vitamina E je pokazala, da se po 24 urah pri 95 °C v riževi moki razgradi 27,3 %  $\alpha$ -tokoferola, 32 %  $\gamma$ -tokotrienola, 46,4 %  $\alpha$ -tokotrienola in 47,4 %  $\gamma$ -tokoferola (Park in sod., 2004).

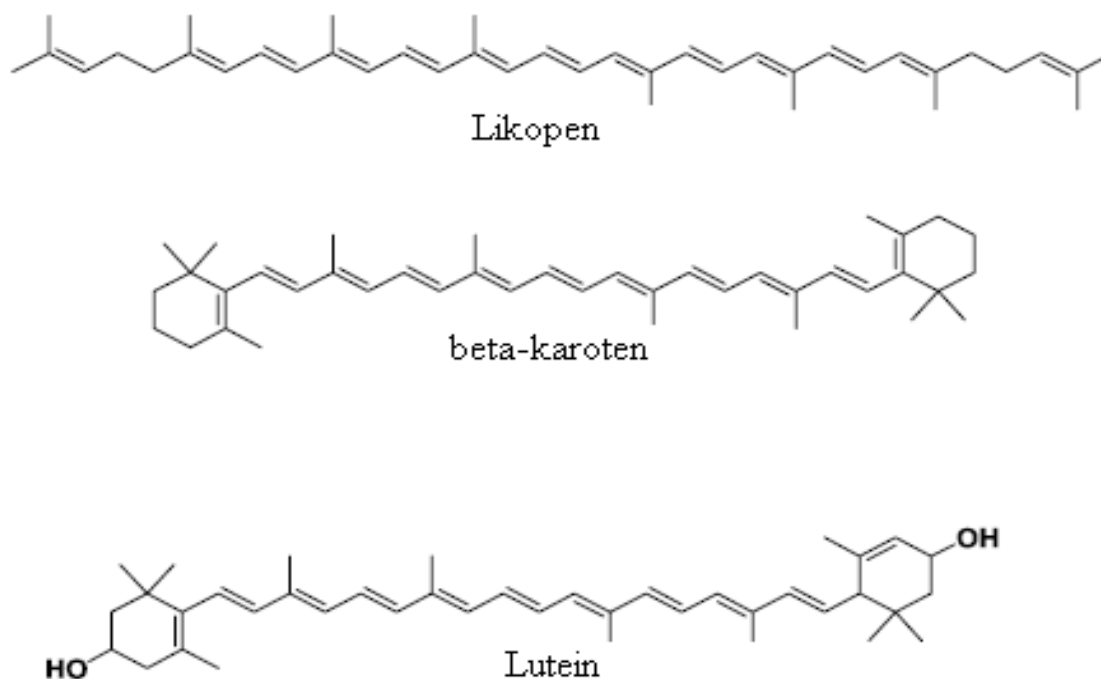
Na razpad vitamina E pa vpliva tudi kisik, kajti pri 95 °C v štirih urah ni prišlo do nobenega razpada v riževi moki, kjer ni bilo prisotnega kisika. Pri 21 % kisika, kakršna je koncentracija v atmosferi in pri enaki temperaturi (95 °C) pa je štirih urah razpadlo kar 45 %  $\gamma$ -tokoferola, 43 %  $\gamma$ -tokotrienola, 24 %  $\alpha$ -tokoferola in 19 %  $\alpha$ -tokotrienola. Že 2 % kisika je povzročilo razpad več kot 20 % gama izomer (Park in sod., 2004). Okogeri in Tasioula-Margari (2002) poročata, da naj bi se v oljčnem olju, ki ga hranimo v temi v 12 mesecih razgradilo okrog 62 % tokoferolov, medtem, ko se v olju, ki je podvrženo razpršeni svetlobi razgradi v dveh mesecih 30 %, v štirih mesecih pa kar 79 % tokoferola. To kaže na veliko neobstoječnost tokoferola na svetlobi.

Analiza obstojnosti  $\alpha$ -tokoferola je pokazala, da naj bi bil  $\alpha$ -tokoferol najbolj obstojen pri pH vrednosti 3 in najmanj pri pH 7. Pri pH 7 se je v osmih dneh pri 60 °C razgradilo kar 90 %  $\alpha$ -tokoferola, pri pH 3 pa le 20 %. Ista raziskava je tudi pokazala, višjo antioksidativno aktivnost pri nižjem pH (Osborn-Barnes in Akoh, 2003).

Piironen in sod. (1987) poročajo, da naj bi se v 12 mesecih v različnih mokah razgradilo 80 %  $\alpha$ -tokoferola in  $\alpha$ -tokotrienola, ter okrog 60 %  $\beta$ -tokotrienola.

## 2.4 KAROTENOIDI

Karotenoidi so intenzivno obarvani, v maščobah topni naravni pigmenti. Imajo dolge molekule z velikim številom dvojnih vezi, ki si izmenično sledijo. Karotenoide delimo v dve podskupini: karotene, ki so sestavljeni le iz atomov ogljika in vodika ter imajo lahko odprte verige (na primer pri likopenu) ali pa na koncih sklenjene v šestčlenske obroče (na primer pri  $\beta$ -karotenu). Ksantofili pa vsebujejo tudi atome kisika, pogosto v obliki  $-OH$  skupine na obroču. Primer je lutein (El-Agamey in sod., 2004). Karotenoide najdemo v membranah kloroplastov v vseh zelenih delih rastlinskih tkiv ter v stromi kromoplastov v rumeno, oranžno in rdeče obarvanih tkivih (Šircelj, 2008).



Slika 6: Struktura likopena, beta-karotena in luteina (El-Agamey in sod., 2004).



### 2.4.1 Karotenoidi kot antioksidanti

Karotenoidi igrajo pomembno vlogo kot antioksidanti v lipidni fazi. Delujejo kot lovilci prostih radikalov ali kot fizikalni dušilci singletnega kisika (Subagio in Morita, 2003). Možno pa je tudi kemijsko dušenje singletnega kisika, pri katerem karotenoidi reagirajo s kisikom, posledica tega je, da se njihova vsebnost zmanjša. Zaradi tega je boljše, če fizikalno dušenje poteka v večji meri kot kemijsko (Edge in sod., 1997).

Karotenoidi se lahko obnašajo kot antioksidanti, ali pa kot prooksidanti, odvisno od pogojev (Kiokias in sod., 2008). Antioksidativna aktivnost je odvisna od koncentracije kisika, kemijske strukture karotenoidov in prisotnosti drugih antioksidantov. Večjo antioksidativno aktivnost naj bi imeli kisik vsebujoči karotenoidi, kot na primer lutein, ki ima večjo aktivnost kot  $\beta$ -karoten (Haila in sod., 1996). Pri avtooksidaciji imajo lahko karotenoidi tudi negativno vlogo, zaradi oksidiranih produktov, ki lahko reagirajo z lipidnim substratom in tako pospešujejo oksidacijo (Subagio in Morita, 2003). Kot prooksidanti pa lahko delujejo tako v temi, kot na svetlobi, vendar pa naj bi že majhna koncentracija  $\gamma$ -tokoferola, zmanjšala njihovo prooksidativno aktivnost (Haila in sod., 1996).

## 2.5 VPLIV PREDELAVE IN SKLADIŠČENJA NA ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL

Med postopki predelave in skladiščenja prihaja do vrsto kompleksnih reakcij, ki lahko bistveno spremenijo antioksidativni potencial živila (Hribar in Simčič, 2000).

Možni so različni učinki predelave na antioksidativni potencial in sicer:

- predelava nima vpliva na antioksidativni potencial,
- naravno prisotni antioksidanti se med predelavo in skladiščenjem izgubijo,
- antioksidativne lastnosti prisotnih antioksidantov se povečajo,
- nastanejo nove spojine z antioksidativno aktivnostjo,
- nastanejo nove spojine z prooksidativnimi lastnostmi.

Povečanje antioksidativnih lastnosti prisotnih antioksidantov je predvsem posledica prisotnosti polifenolov v živilu. Kljub temu, da oksidacija polifenolov zmanjšuje njihovo antioksidativno aktivnost, pa med oksidacijo nastajajo novi produkti, ki imajo še boljše antioksidativne lastnosti kot neoksidirani polifenoli (Nicoli in sod., 1999; Hribar in Simčič, 2000; Simčič, 1995).

### **2.5.1 Maillardova reakcija**

Maillardova reakcija je ena od reakcij neencimskega porjavenja, ki je rezultat reakcije kondenzacije med prostimi amino skupinami in karbonilnimi skupinami. Prvi jo je leta 1912 odkril Maillard, kasneje pa jo je leta 1953 podrobno opisal Hodge (1953) (Laroque in sod., 2008). Maillardova reakcija običajno poteka med reducirajočimi sladkorji in peptidi ali proteini. Reakcija poteče, ko živila toplotno obdelujemo, poteka pa tudi pri sobni temperaturi, vendar počasneje (Hribar in Simčič, 2000). Ta kompleksna kemijska reakcija je odvisna od vrste dejavnikov, kot so: vrsta, koncentracija in lastnosti reaktantov (amino in karbonilne komponente), vodne aktivnosti, pH, temperature, časa, prisotnosti kisika, svetlobe in kovinskih ionov, kar ima za posledico različne produkte reakcije, ki imajo zelo različne učinke na prehranske lastnosti živila (Laroque in sod., 2008).

Maillardova reakcija lahko pri živilih povzroči:

- zelene ali neželene spremembe barve in okusa,
- zmanjšanje prehranske vrednosti (zmanjšanje vsebnosti vitamina C, dostopnih amino kislin in mineralov),
- nastanek toksičnih snovi (mutageni),
- zmanjšanje topnosti živil.

Poleg tega, pa imajo produkti Maillardove reakcije tudi naslednje lastnosti:

- antioksidativno delovanje,
- antimutageno delovanje,
- inhibicija encimov polifenol oksidaze,
- zmanjšanje aktivnosti mikroorganizmov.

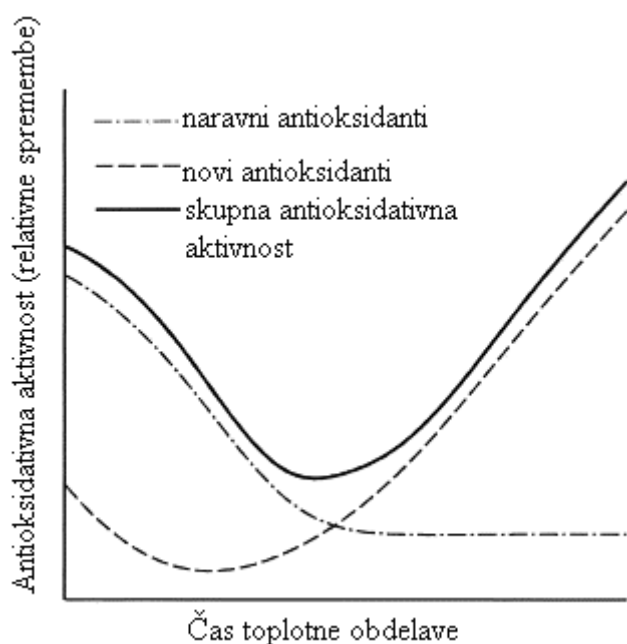
(Nicoli in sod., 1999; Hribar in Simčič, 2000; Simčič, 1995).

Karotenoidi in askorbinska kislina, so zelo učinkoviti antioksidanti, vendar pa se pri višjih temperaturah njihova vsebnost precej zmanjša. Pri povišanih temperaturah nastajajo melanoidini in reduktoni, ki lahko povečajo antioksidativno aktivnost živila (Samaras in sod., 2005).

#### 2.5.1.1 Vpliv produktov Maillardove reakcije na antioksidativno stabilnost

Nosilci antioksidativnih lastnosti produktov Maillardove reakcije naj bi bili predvsem reduktoni z endiolno strukturo, ki naj bi inaktivirali proste hidroperoksidne radikale. Produkti Maillardove reakcije dajejo lahko živilu povsem nasprotujoče lastnosti in sicer lahko so mutageni ali pa antimutageni agensi, ter lahko delujejo kot antioksidanti ali pa prooksidanti, odvisno od sestave in načina predelave živila (Nicoli in sod., 1999; Hribar in Simčič, 2000). Antioksidativne lastnosti produktov Maillardove reakcije naj bi bile predvsem posledica delovanja rjavih spojin z večjo molsko maso, ki nastajajo v zadnji fazi Maillardove reakcije. Pri tretiranju živil kratek čas na relativno nizkih temperaturah, pa nastajajo produkti, ki imajo izrazite prooksidativne lastnosti. Ob intenzivnejšem porjavenju pa je njihova vsebnost manjša.

V živilih rastlinskega izvora prihaja med toplotno obdelavo pri nizkih temperaturah do zmanjšanja skupnega antioksidativnega potenciala, kot posledica zmanjšanja aktivnosti naravno prisotnih antioksidantov ter zaradi nastanka produktov Maillardove reakcije, ki imajo prooksidativne lastnosti. Pri daljšem postopku toplotne obdelave ali pa pri tretiranju pri višjih temperaturah, nastajajo produkti Maillardove reakcije, ki imajo antioksidativne lastnosti, zaradi tega se skupni antioksidativni potencial živila poveča (Nicoli in sod., 1999; Hribar in Simčič, 2000).

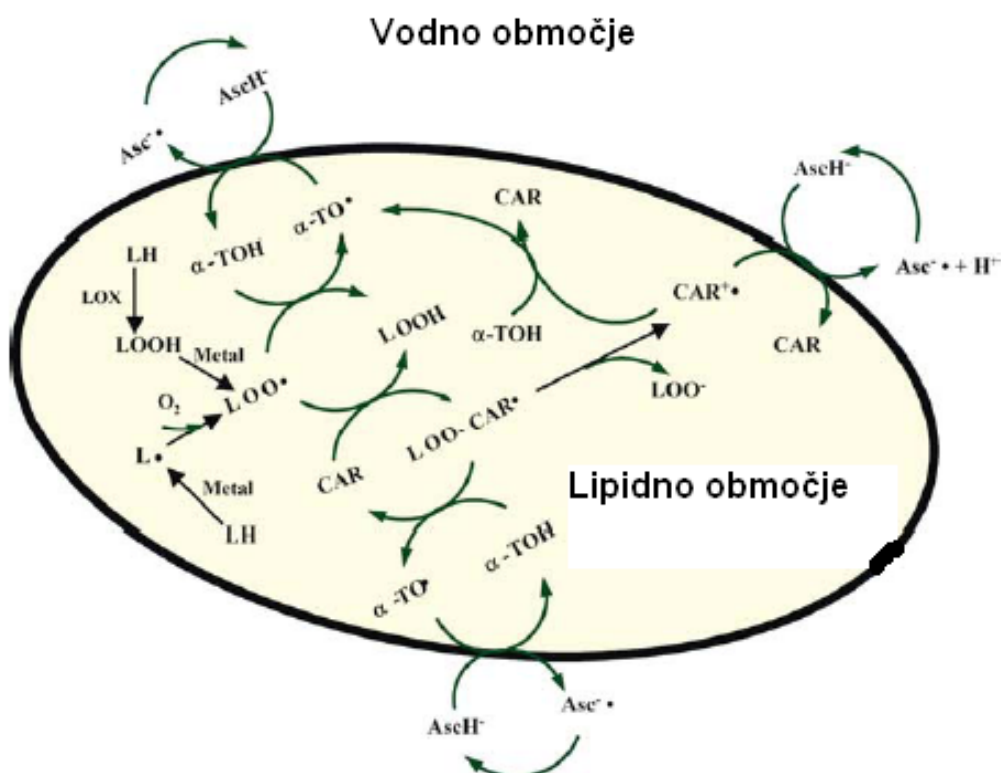


Slika 7: Relativne spremembe skupne antioksidativne aktivnosti med toplotno obdelavo sadno-zelenjavnega matriksa (Nicoli in sod., 1999).

## 2.6 MEDSEBOJNI UČINKI VITAMINOV C, E IN KAROTENOIDOV

Kot pravita Young in Lowe (2001), univerzalnega antioksidanta ni. Različni antioksidanti delujejo na različnih področjih pri zaščiti pred prostimi radikali, nobeden pa na vseh (Young in Lowe, 2001). Malo verjetno je, da vitamini s svojo antioksidativno aktivnostjo delujejo le samostojno, prej je verjetno, da askorbinska kislina,  $\alpha$ -tokoferol in karotenoidi skupaj pod določenimi pogoji delujejo bolj optimalno, pri zaščiti pred oksidativnim stresom (Kitts, 1997). Askorbinska kislina (vitamin C) in  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) delujeta kot močna in morda najpomembnejša vodotopna oziroma v maščobah topna antioksidanta. Vsak posebej delujeta s svojim lastnim mehanizmom, medtem ko je njuno skupno delovanje sinergistično.  $\beta$ -karoten (pro-vitamin A) ima manjšo antioksidativno aktivnost kot  $\alpha$ -tokoferol in v raztopini deluje kot šibak antioksidant, vendar ima prav tako sposobnost zmanjševanja reaktivnosti posameznih molekul do prostih radikalov. Je v maščobah bolj topen kot  $\alpha$ -tokoferol in predpostavljajo, da naj bi bil prisoten v membranah ali lipoproteinih, kar mu omogoča, da lovi proste radikale mnogo učinkoviteje kot  $\alpha$ -tokoferol.

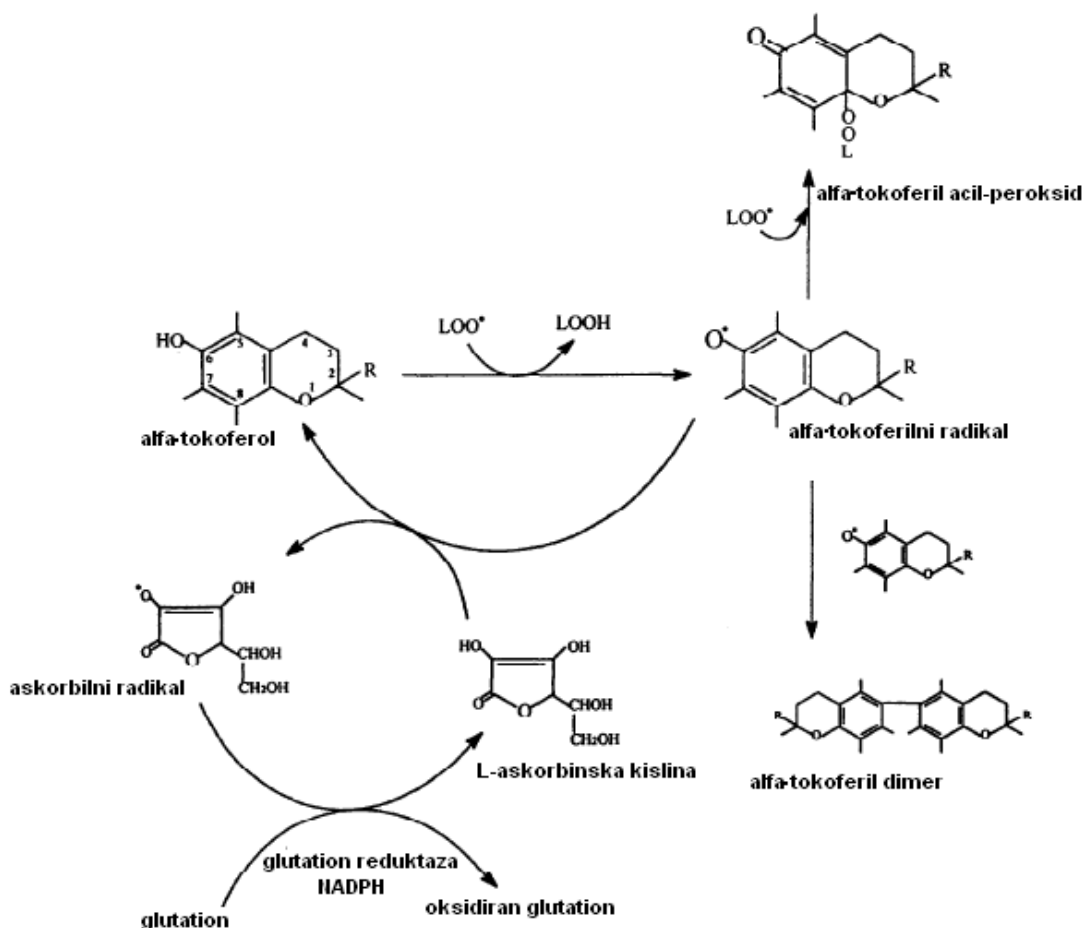
Medtem ko je reakcija med vitaminom C in vitaminom E kooperativna in učinkovita, pa naj bi bila interakcija med vitaminom C in  $\beta$ -karotenom zanemarljiva, med vitaminom E in  $\beta$ -karotenom pa mogoča (Niki in sod., 1995). Pri sinergističnem učinku mešanice antioksidantov pa je poleg kombinacije le-teh, zelo pomembna tudi koncentracija, kar so Liu in sod. (2008) dokazali pri raziskavi o sinergističnem učinku mešanice likopena, vitamina C, vitamina E in  $\beta$ -karotena z DPPH metodo (Liu in sod., 2008).



Slika 8: Interakcije med lipidnim peroksilnim radikalom ( $LOO^\bullet$ ), karotenoidi (CAR), karotenoidnim radikalom ( $CAR^\bullet$ ),  $\alpha$ -tokoferoksilnim radikalom ( $\alpha\text{-TO}^\bullet$ ) in askorbinsko kislino ( $AscH^\bullet$ ), v lipidni in vodni fazi (Krinsky in Yeum, 2003).

### 2.6.1 Interakcije med vitaminoma C in E

Askorbinska kislina in  $\alpha$ -tokoferol sta pomembna faktorja pri boju proti oksidativnemu stresu. Interakcija med njima je ključnega pomena pri nevtralizaciji prostih radikalov (Chepda in sod., 2001). Vitamin C povečuje antioksidativno zaščito tudi hidrofobnih delov celice, saj z redukcijo  $\alpha$ -tokoferilnega radikala, regenerira metabolno aktivno obliko vitamina E. Pri regeneraciji vitamina E pride do izgube askorbinske kisline, saj le-ta preide v askorбилni radikal, ki pa nima aktivnosti vitamina C. Askorбилni radikal pa se lahko nazaj reducira v askorbinsko kislino, ob prisotnosti glutaciona, ki s pomočjo glutation reduktaze regenerira askorбилni radikal v askorbinsko kislino, kar je shematsko prikazano na sliki 9 (Kitts, 1997).

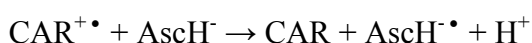


Slika 9: Shematski diagram oksidacije  $\alpha$ -tokoferola in redukcijski cikel z askorbinsko kislino in glutationom (Kitts, 1997).

Pri raziskavi o sinergističnih učinkih med askorbatom in  $\alpha$ -tokoferolom v celici, se Chepda in sodelavci (2001) ugotovili, da koncentracija  $\alpha$ -tokoferola pada počasneje ob prisotnosti askorbata. Torej so dokazali, da askorbinska kislina ščiti  $\alpha$ -tokoferol, kar pa ne velja v obratni smeri, kajti  $\alpha$ -tokoferol ni imel vpliva na askorbinsko kislino. Sama kombinacija vitamina C in E v alkoholni raztopini pa ni pokazala sinergističnega učinka za čiščenje prostih radikalov ampak celo antagonističen. Če pa je bil tej mešanici dodan še likopen in/ali  $\beta$ -karoten, pa se je sinergizem pokazal (Liu in sod., 2008).

### 2.6.2 Interakcije med vitaminom C in karotenoidi

Čeprav nekateri avtorji poročajo, da je med askorbinsko kislino in karotenoidi zanemarljiva interakcija (Niki in sod., 1995), pa nekatere študije kažejo, da čeprav ima v vodi topna askorbinska kislina veliko nižjo afiniteto do lipidnih radikalov kot hidrofobni likopen, pa lahko le-ta reagira z oksidirano obliko likopena in ga tako regenerira (Liu in sod., 2008). Krinsky in Yeum (2003) predvidevata, da verjetno pride do direktne interakcije med lipofilnimi karotenoidi in hidrofilno askorbinsko kislino takrat, ko se nabiti karotenoidi približajo notranji površini membrane. Askorbinska kislina naj bi pospešila razpad kationa karotenoidnega radikala verjetno po spodnji formuli (Krinsky in Yeum, 2003). El-Agamey in sodelavci (2004) pa pravijo, da do interakcije med karotenoidnim radikalom in askorbinsko kislino lahko pride, če je orientacija karotenoida v membrani taka, da ogljiko-vodikov karotenoid lahko migrira proti vodni fazi, kot na primer zeaksanitin.



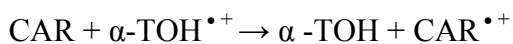
Reakcije, pri katerih karotenoidi reagirajo z nekaterimi reaktivnimi radikali in pri tem nastanejo karotenoidni radikali, lahko povzročijo razne poškodbe v bioloških sistemih.

Kation karotenoidnega radikala lahko reagira z aminokislinama tirozin in cistein, kar povzroči spremembo aminokislin *in vivo* in s tem tudi spremembo strukturnih beljakovin in njihovo funkcijo (El-Agamey in sod., 2004). Za večji sinergistični učinek v mešanici vitamina C in likopena ali/in  $\beta$ -karotena je potrebna čim višja koncentracija vitamina C,

likopena ter  $\beta$ -karotena. Izmed likopena in  $\beta$ -karotena pa se je kot boljši sinergist z vitaminom C veliko bolj izkazal likopen (Liu in sod., 2008).

### 2.6.3 Interakcije med vitaminom E in karotenoidi

Interakcija med  $\alpha$ -tokoferolom in karotenoidi ni tako očitna, kot med  $\alpha$ -tokoferolom in askorbinsko kislino. Skupni efekt zaščite pred oksidativnimi poškodbami celične membrane  $\alpha$ -tokoferola in  $\beta$ -karotena je zanemarljivo večji kot, če delujeta vsak posamezno (Niki in sod., 1995). Vitamin E, lahko zaščiti karotenoide pred oksidacijo (Kitts, 1997), kar velja tudi v obratni smeri, saj karotenoidi lahko regenerirajo  $\alpha$ -tokoferol s prenosom elektrona na  $\alpha$ -tokoferolni radikal, pri čemer nastane nazaj  $\alpha$ -tokoferol (Krinsky in Yeum, 2003). Sinergistični učinek med  $\alpha$ -tokoferolom in likopenom naj bi deloval predvsem na antioksidativno zaščito LDL (lipoproteini nizke gostote) pred oksidacijo (Liu in sod., 2008).



Pri raziskavi o sinergističnih učinkih likopena, vitamina C in E ter  $\beta$ -karotena so Liu in sodelavci (2008) prišli do zaključka, da je največji sinergistični učinek pri mešanicah, kjer je likopenu dodan samo še en antioksidant. Pri raztopini 95 % etanola s koncentracijo 15,63  $\mu\text{mol/L}$  likopena ter 5  $\mu\text{mol/L}$  vitamina E je bil sinergistični učinek največji in sicer 1,82 po 30 minutah in 1,81 po eni uri. Sinergistični učinek se je pojavil samo pri koncentraciji likopena 15,63  $\mu\text{mol/L}$ , pri koncentracijah 5 in 10  $\mu\text{mol/L}$  pa ne v nobeni kombinaciji. Nasprotno pa je vitamin E deloval sinergistično le pri najnižji koncentraciji (5  $\mu\text{mol/L}$ ), pri višjih (10 in 15  $\mu\text{mol/L}$ ) pa ne. Ta raziskava je pokazala, da je kombinacija različnih antioksidantov lahko veliko bolj uspešna pri inaktivaciji prostih radikalov, vendar pa je ta uspešnost zelo odvisna od koncentracij posameznih antioksidantov, ki ne sme biti ne prenizka in ne previsoka (Liu in sod., 2008).



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Sadno-žitna rezina

Kot glavno surovino za izvedbo poskusa smo uporabili Frutabelo sedem sadežev z vlaknino, proizvajalca Fructal d.d. S strani proizvajalca (Fructal d.d.), smo dobili svežo maso brez čokoladnega preliva. V samo maso smo nato dodali različne kombinacije antioksidantov.

###### 3.1.1.1 Energijska ploščica K3

Za primerjavo smo določali askorbinsko kislino in  $\alpha$ -tokoferol tudi v energijski ploščici K3, nemškega proizvajalca Simpert Reiter GmbH. Ploščica je sestavljena iz suhih fig in mandljev, z rokom uporabe do marca 2010.

Na embalaži je deklarirana naslednja sestava: smokve (26 %), mandlji (15 %), sladkor, med, rastlinske beljakovine, pšenična moka, hidrogenirane rastlinske maščobe, beljakovine sirotke, kosmiči pire, ovseni kosmiči, čokolada, kakao, sezam, glukozni sirup, citronska kislina, naravne arome, mešanica vitaminov in mineralov, jedilna sol.

Vsebnost vitaminov: vitamin C (20 mg/100 g), vitamin E (3,3 mg/100 g)

Neto masa je 75 g, rok uporabe pa marec 2010.

### 3.2 METODE

#### Priprava vzorcev

Odločili smo se, da bomo imeli osem različnih kombinacij treh dodanih antioksidantov. Za vsako kombinacijo smo vzeli 500 g mase sadno-žitne rezine in ji dodali antioksidante kot je prikazano v preglednici 5.

Vzorce smo nato homogenizirali 7 minut v gospodinjskem multipraktiku. Nato smo vzorce dali v inkubator na 37 °C in jih vsak teden vzorčili. Vzorčili smo tako, da smo vzeli po 4 g vsakega vzorca v plastične centrifugirke in jim dodali 16 g 2 % raztopine metafosforne kisline ter homogenizirali eno minuto z Ultraturaxom. Vzorce smo nato zamrznili na -25 °C.

Preglednica 5: Prikaz količine dodatkov askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola v maso Frutabele

Oznaka vzorca	Masa Frutabele [g]	Dodatek askorbinske kisline [g]	Dodatek dvo procentnega luteina [g]	Dodatek petdeset procentnega $\alpha$ -tokoferola [g]
K	500	/	/	/
C	500	0,5	/	/
L	500	/	1,0	/
E	500	/	/	0,15
CLE	500	0,5	1,0	0,15
CL	500	0,5	1,0	/
CE	500	0,5	/	0,15
EL	500	/	1,0	0,15

### **3.2.1 Določanje askorbinske kisline**

#### Princip določanja L-askorbinske kisline s HPLC metodo

L-askorbinsko kislino (L-AK) stabiliziramo z 2 % metafosforno kislino ter določimo vsebnosti L-askorbinske kisline z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC).

#### Potek dela

Zamrznjene vzorce smo odtalili v vodni kopeli in jih nato centrifugirali 20 minut pri 4.000 obratih na minuto. Nato smo vzeli dvakrat po 1,5 ml supernatanta in ga dali v dve ependorfki in centrifugirali 10 min na 16.000 obratih na minuto.

#### Priprava reagentov za umeritveno krivuljo

V 250 ml bučko smo zatehtali približno 5 g metafosforne kisline proizvajalca Merck in do oznake napolnili z destilirano vodo, tako smo dobili 2 % vodno raztopino metafosforne kisline. Metafosforna kislina po določenem času hidrolizira v ortofosforno kislino. Nato smo pripravili izhodno standardno raztopino L-AK tako, da smo v 100 ml bučko zatehtali 50 mg askorbinske kisline proizvajalca Kemika standard in do oznake dopolnili s pripravljeno 2 % vodno raztopino metafosforne kisline.

#### Priprava standardnih raztopin L-AK

Iz izhodne standardne raztopine L-AK smo pripravili z ustreznim razredčevanjem različne koncentracije standardnih raztopin L-AK. V pet 25 mL bučk smo odpipetirali po 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 in 4,0 mL pripravljene izhodne standardne raztopine L-AK in do oznake dopolnili s pripravljeno 2 % vodno raztopino metafosforne kisline. Tako pripravljene raztopine smo prenesli v vialo in jih injicirali v HPLC kolono.

Kromatografski pogoji na HPLC koloni (Knauer HPLC), Bio – Rad Aminex HPX:

- razplinjevalnik:
- črpalka:
- kolona: 87 H, 300 × 7,8 mm
- mobilna faza: 0,004 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- pretok mobilne faze: 0,6 ml/min
- temperatura: 20 °C
- volumen injiciranja: 20 µl
- detektor: UV – VIS , valovna dolžina: 245 nm
- avtomatski podajalec vzorcev:
- zapis signala:

#### Izračun za umeritveno krivuljo

$$c_1 \times v_1 = c_2 \times v_2 \quad \dots(1)$$

c <sub>1</sub> (koncentracija izhodne standardne raztopine L-AK).....	500 mg/L
v <sub>1</sub> (volumni izhodne standardne raztopine L-AK).....	0,25, 0,50, 1,0, 2,0, 4,0 mL
v <sub>2</sub> (volumen bučke standardnih raztopin).....	25 mL
c <sub>2</sub> = x (koncentracija standardnih raztopin) .....	mg/L

S pomočjo enačbe smo izračunali vrednost c<sub>2</sub> (koncentracijo standardnih raztopin). Po kromatografski ločbi smo dobili kromatogram. Iz znanih površin pikov za standardne raztopine in njihovih koncentracij (c<sub>2</sub>) smo narisali umeritveno krivuljo. S pomočjo enačbe premice (enačba 2) in površine pikov našega vzorca smo izračunali koncentracijo L-askorbinske kisline v našem vzorcu.

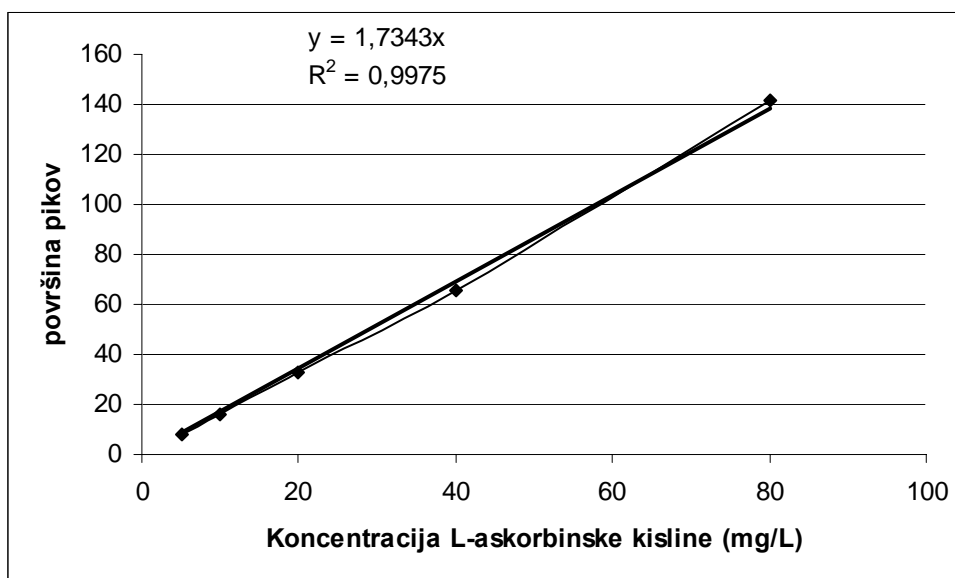
#### Izračun za vsebnost l-askorbinske kisline v vzorcu

$$y = 1,7343x \quad \dots(2)$$

y = površina pikov vzorca

x = vsebnost L-AK v vzorcu (mg/L)

Rezultat smo preračunali v mg L-AK/100 g vzorca.



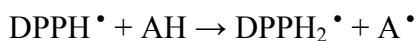
Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije L-askorbinske kisline

### 3.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Antioksidativno aktivnost sadno-žitne rezine, smo določali z DPPH metodo.

#### Princip:

Prosti radikal DPPH<sup>•</sup> je topen v raztopinah organskih topil, kot sta metanol in etanol. Ko raztopina radikala DPPH<sup>•</sup> reagira z antioksidativno komponento, ki je donor vodika, pride do redukcije, kar povzroči spremembo barve raztopine. Radikal se reducira po naslednji reakciji, kjer je AH nek reducent ali antioksidant.



Ker reducirana oblika radikala ne absorbira pri 517 nm, se absorbanca po dodatku antioksidanta zmanjša (Brand-Williams in sod., 1995). Spremembo absorbance spremljamo spektrofotometrično pri 517 nm.

#### Priprava reagentov:

V 100 ml bučko smo odtehtali 5,2 mg DPPH in ga raztopili v 40 ml etanola.

Opis dela:

DPPH pripravimo vsakič svež. V 100 ml bučko zatehtamo 5,2 mg DPPH v 40 ml etanola ter premešamo, da se popolnoma raztopi.

1. Referenčna vrednost – RF:

v ependorfki zmešamo 600  $\mu$ l metanola + 1,5 ml raztopine DPPH

2. vzorec: v ependorfki zmešamo 600  $\mu$ l vzorca + 1,5 ml raztopine DPPH

3. slepa proba: v ependorfki zmešamo 600  $\mu$ l vzorca + 1,5 ml etanola

Zmes nato dobro premešamo, prelijemo v kivete ter izmerimo absorbanco pri 517 nm po 15 minutah.

$$\Delta A = RF - \text{vzorec} + \text{slepa proba} \quad \dots(3)$$

$$n \text{ (mol)} = \Delta A / \epsilon * (V \text{ reakcijske zmesi (0,00210)} * L) \quad \dots(4)$$

$$\epsilon = 12000 \text{ (l * cm)/mol} \quad \dots(5)$$

$$L = 0,4 \text{ cm}$$

$$AOP = M_{DPPH} \text{ (nmol/l)} = n * 1 * 10^6 * 10^3 / 600 \quad \dots(6)$$

Za primerjavo smo askorbinsko kislino v sadno-žitni rezini Frutabela sedem sadežev, v masi Frutabele sedem sadežev z dodatkom askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola ter v energijski ploščici K3, določali v komercialnem laboratoriju Neutron Group.

## 4 REZULTATI

### 4.1 OBSTOJNOST ASKORBINSKE KISLINE

Vsebnost askorbinske kisline smo določali z HPLC metodo. Na začetku smo dodali askorbinsko kislino, tako da je bila začetna koncentracija 100 mg/100 g Frutabele. To zmes smo nato dali v inkubator na 37 °C in vsak teden vzeli po 4 g vzorca in ga stabilizirali z 2 % metafosforno kislino.

#### 4.1.1 Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatkom askorbinske kisline

Iz preglednice 6 in slike 11 je razvidno, da se je vsebnost askorbinske kisline vsak teden eksponentno zmanjšala.

Preglednica 6: Koncentracija askorbinske kisline v Frutabeli z dodatkom 100 mg askorbinske kisline na 100 g Frutabele

Oznaka vzorca *	Čas skladiščenja [dan]	Koncentracija L-AK [mg/100g]
C	0	99,75
C <sub>1</sub>	7	57,29
C <sub>2</sub>	20	22,11
C <sub>3</sub>	28	13,45
C <sub>4</sub>	35	11,62
C <sub>5</sub>	42	15,95
C <sub>6</sub>	49	6,89
C <sub>7</sub>	56	8,26

\* Indeksi 1-7 označujejo čas skladiščenja

Koncentracija askorbinske kisline je dokaj hitro in eksponentno padala do 3. tedna skladiščenja iz 100 na približno 20 mg/100g, nadalje pa se je zniževanje umirilo.

#### 4.1.2 Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatki askorbinske kisline, luteina in $\alpha$ -tokoferola

Iz preglednice 7 je razvidno, kako se je spreminjala vsebnost L-askorbinske kisline v vzorcu sadne rezine, kateri smo dodali 100 mg askorbinske kisline, 200 mg 2 % luteina in 30 mg 50 %  $\alpha$ -tokoferola na 100 g Frutabele.

Preglednica 7: Koncentracija askorbinske kisline v Frutabeli z dodatkom 100 mg askorbinske kisline, 200 mg 2 % luteina in 30 mg 50 %  $\alpha$ -tokoferola na 100g Frutabele.

Oznaka vzorca *	Čas skladiščenja [dan]	Koncentracija L-AK [mg/100g]
CLE	0	108,82
CLE <sub>1</sub>	7	73,70
CLE <sub>2</sub>	20	25,62
CLE <sub>3</sub>	28	15,91
CLE <sub>4</sub>	35	12,58
CLE <sub>5</sub>	42	15,83
CLE <sub>6</sub>	49	9,02
CLE <sub>7</sub>	56	2,72

\* Indeksi 1-7 označujejo čas skladiščenja

Pri Frutabeli, kjer smo dodali poleg askorbinske kisline tudi lutein in  $\alpha$ -tokoferol, je bila situacija glede padanja koncentracije askorbinske kisline zelo podobna, kot pri Frutabeli, kjer smo dodali samo askorbinsko kislino. Iz tega rezultata lahko razberemo, da lutein v koncentraciji 4 mg/100g rezine in  $\alpha$ -tokoferol v koncentraciji 25 mg/100g rezine, ne vplivajo bistveno na stabilnost askorbinske kisline v sadno-žitni rezini.



#### 4.1.3 Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatkom askorbinske kisline in luteina

Preglednica 8: Koncentracija askorbinske kisline v Frutabeli z dodatkom 100 mg askorbinske kisline in 200 mg 2 % luteina na 100 g Frutabele.

Oznaka vzorca*	Čas skladiščenja [dan]	Koncentracija L-AK [mg/100g]
CL	0	112,22
CL <sub>1</sub>	7	62,84
CL <sub>2</sub>	20	20,31
CL <sub>3</sub>	28	16,94
CL <sub>4</sub>	35	12,11
CL <sub>5</sub>	42	6,44
CL <sub>6</sub>	49	1,80
CL <sub>7</sub>	56	1,82

\* Indeksi 1-7 označujejo čas skladiščenja

Pri Frutabeli, kjer smo poleg askorbinske kisline dodali tudi lutein, je koncentracija askorbinske kisline v prvih treh tednih padala podobno hitro, kot v zgornjih dveh primerih, vendar se je nato padanje nadaljevalo hitreje kot v ostalih primerih (preglednica 8). Iz tega rezultata lahko sklepamo, da je lutein po petem tednu deloval kot prooksidant in še pospešil razgradnjo askorbinske kisline.

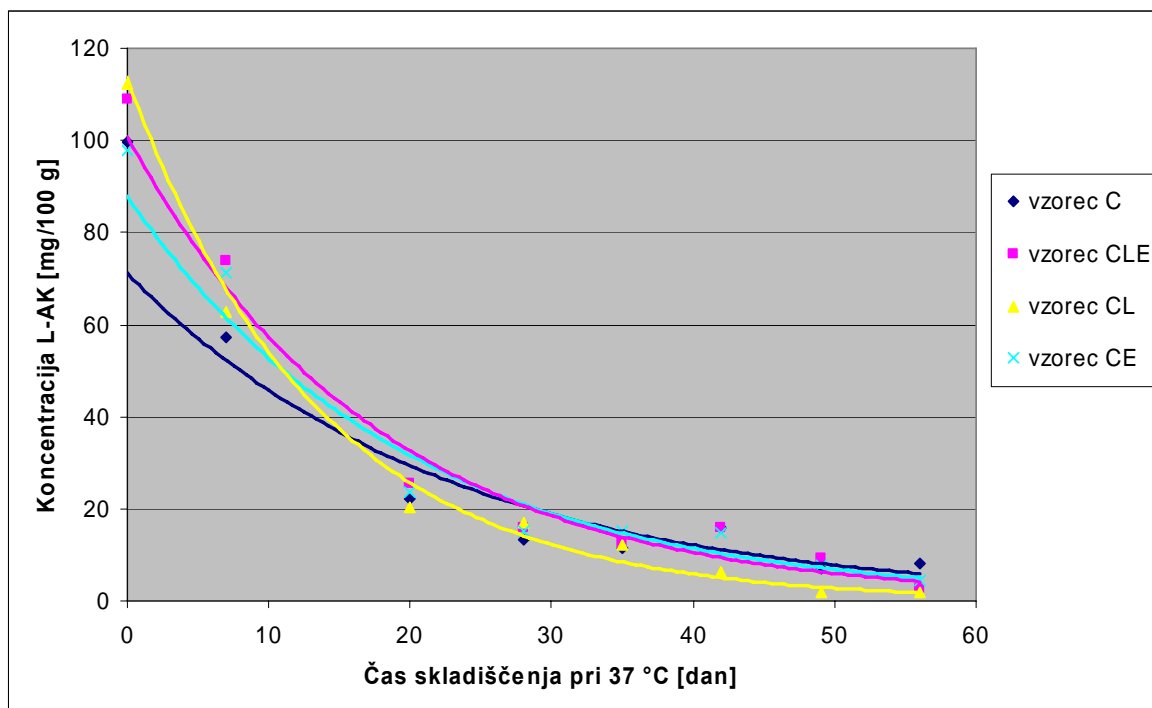
#### 4.1.4 Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatkom askorbinske kisline in $\alpha$ -tokoferola

Preglednica 9: Koncentracija askorbinske kisline v Frutabeli z dodatkom 100 mg askorbinske kisline in 30 mg 50 %  $\alpha$ -tokoferola na 100 g Frutabele.

Oznaka vzorca *	Čas skladiščenja [dan]	Koncentracija L-AK [mg/100g]
CE	0	97,71
CE <sub>1</sub>	7	71,41
CE <sub>2</sub>	20	23,58
CE <sub>3</sub>	28	15,12
CE <sub>4</sub>	35	15,28
CE <sub>5</sub>	42	14,76
CE <sub>6</sub>	49	7,65
CE <sub>7</sub>	56	4,51

\* Indeksi 1-7 označujejo čas skladiščenja

V primeru, kje smo Frutabeli poleg askorbinske kisline dodali tudi  $\alpha$ -tokoferol, tudi nismo opazili bistvenih sprememb v hitrosti padanja koncentracije askorbinske kisline v primerjavi z Frutabelo, ki ji je bila dodana samo askorbinska kislina (preglednica 9). Iz tega lahko sklepamo, da  $\alpha$ -tokoferol v koncentraciji 25 mg/100g rezine nima vpliva na stabilnost askorbinske kisline v sadno-žitni rezini.



Slika 11: Spremljanje koncentracije askorbinske kisline v sadno-žitni rezini z dodatkom različnih kombinacij antioksidantov v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.

Iz slike 11, je razvidno, da dodatki luteina in vitamina E v danih pogojih, ne vplivajo bistveno na stabilnost askorbinske kisline.

Preglednica 10: Statistična primerjava dveh neodvisnih vzorcev (t-test)

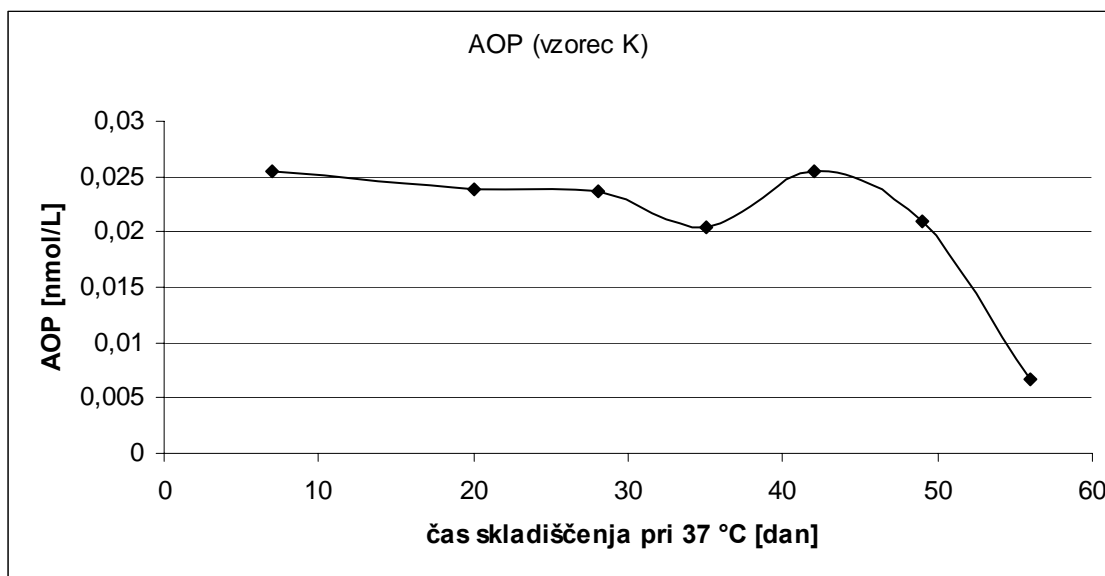
Pari dveh neodvisnih vzorcev	Razlike med dvema neodvisnima vzorcema					
	$\bar{X}$	Stand. deviacija	Stand. napaka	t-vrednost	Stopnje prostosti	Signifikanca
Koncentracija L-AK-C [mg/100g] - Koncentracija L-AK-CLE [mg/100g]	-3,610	6,5665	2,3216	-1,555	7	0,164
Koncentracija L-AK-C [mg/100g] - Koncentracija L-AK-CL [mg/100g]	0,105	7,1683	2,5344	0,041	7	0,968
Koncentracija L-AK-C [mg/100g] - Koncentracija L-AK-CE [mg/100g]	-1,837	5,4892	1,9407	-0,947	7	0,375

Statistična obdelava s t-testom je potrdila, da dodatki luteina in  $\alpha$ -tokoferola statistično značilno ( $p < 0,01$ ) ne vplivajo na stabilnost askorbinske kisline v sadno-žitni rezini v danih pogojih.

V vzorcu Frutabele sedem sadežev iz redne proizvodnje, je bila koncentracija askorbinske kisline v roku uporabe pod mejo detekcije (3 mg/100 g). V masi Frutabele sedem sadežev z dodatkom askorbinske kisline v koncentraciji 100 mg/100g Frutabele, luteina in  $\alpha$ -tokoferola je bilo po sedmih mesecih shranjevanja pri 4 °C še 80,3 mg askorbinske kisline. V energijski ploščici K3 (nemški proizvajalec) z rokom uporabe do marca 2010, je bila koncentracija askorbinske kisline pod mejo detekcije (3 mg/100 g).

## 4.2 SKUPNI ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL

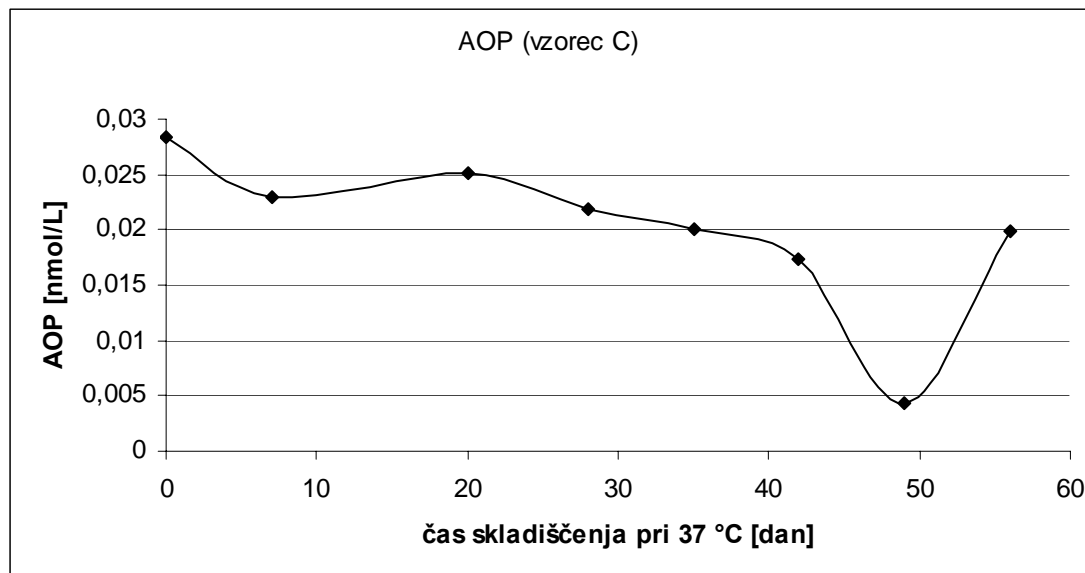
### 4.2.1 Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine brez dodatkov



Slika 12: Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine brez dodatkov v osem tedenskem poskusu pri 37 °C

Iz slike 12 je razvidno, da je antioksidativni potencial (AOP) sadno-žitne rezine brez dodatkov antioksidantov relativno stabilen do šestega tedna in sicer okrog 0,025 nmol/L, nato pa se hitro zniža.

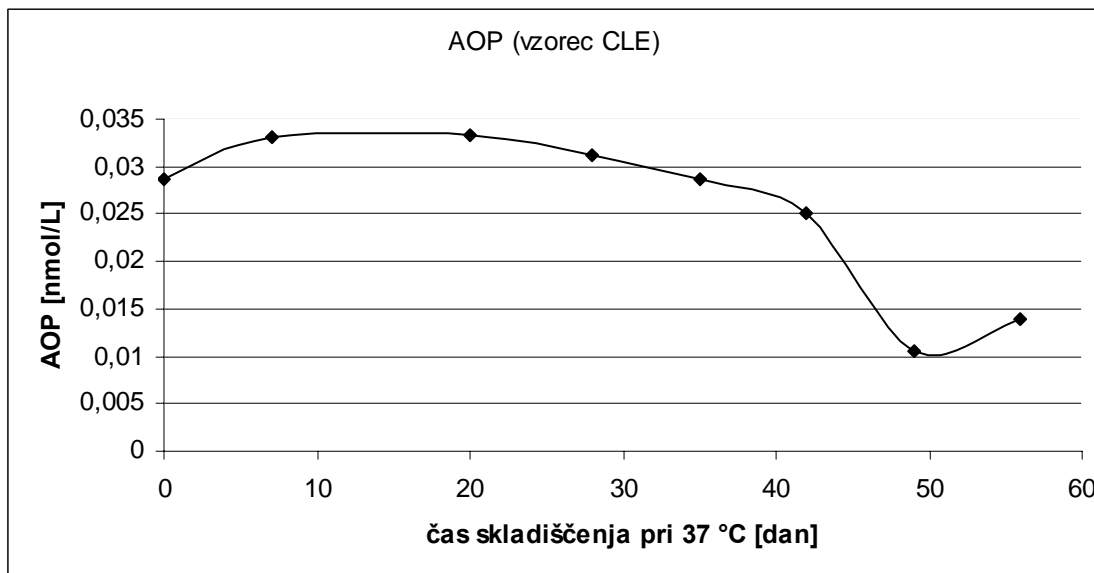
#### 4.2.2 Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline



Slika 13: Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline v osem tedenskem poskusu pri 37 °C

Iz slike 13 je razvidno, da je antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline na začetku višji kot pri kontrolnem vzorcu in dokaj stabilen do tretjega tedna in sicer okrog 0,025 nmol/L, nato pa do sedmega tedna pade pod 0,005 nmol/L. Po sedmem tednu pa začne naraščati in sicer do 0,02 nmol/L. Razlago za naraščanje antioksidativnega potenciala po sedmem tednu najdemo najverjetneje v poteku Maillardove reakcije in nastanku njenih antioksidativnih produktov. Maillardova reakcija poteka tudi pri nižjih temperaturah (v našem primeru 37 °C), vendar počasneje (Nicoli in sod., 1999), zato se ti produkti pojavijo šele po več tednih skladiščenja.

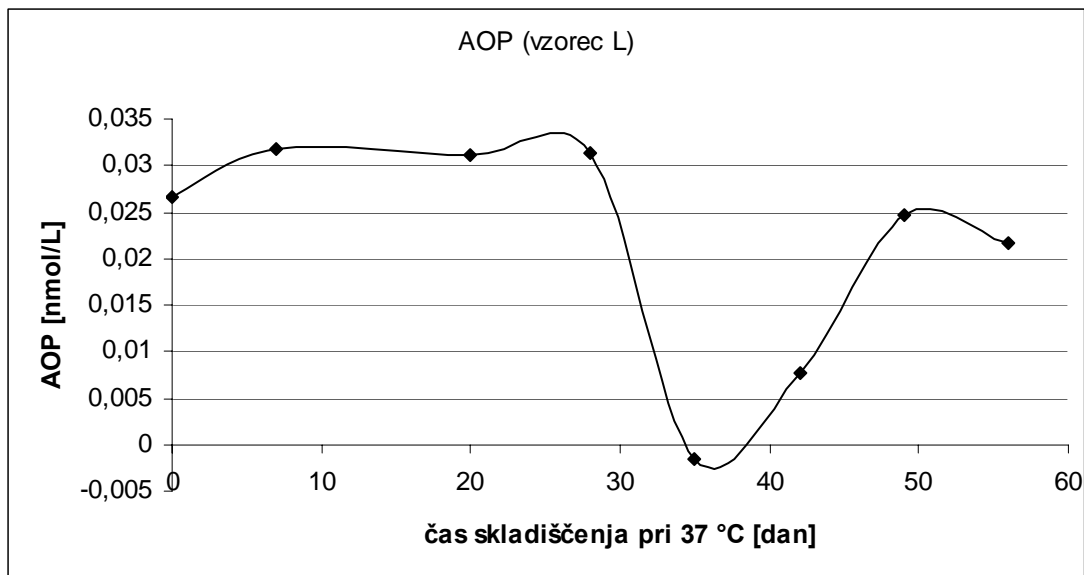
#### 4.2.3 Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline, luteina in $\alpha$ -tokoferola



Slika 14: Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.

Iz slike 14 je razvidno, da je antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola višji kot pri dodatku samo askorbinske kisline. Stabilen je do četrtega tedna, nato pa začne padati do sedmega tedna, nakar začne naraščati, kar je verjetno posledica tvorbe produktov Maillardove reakcije.

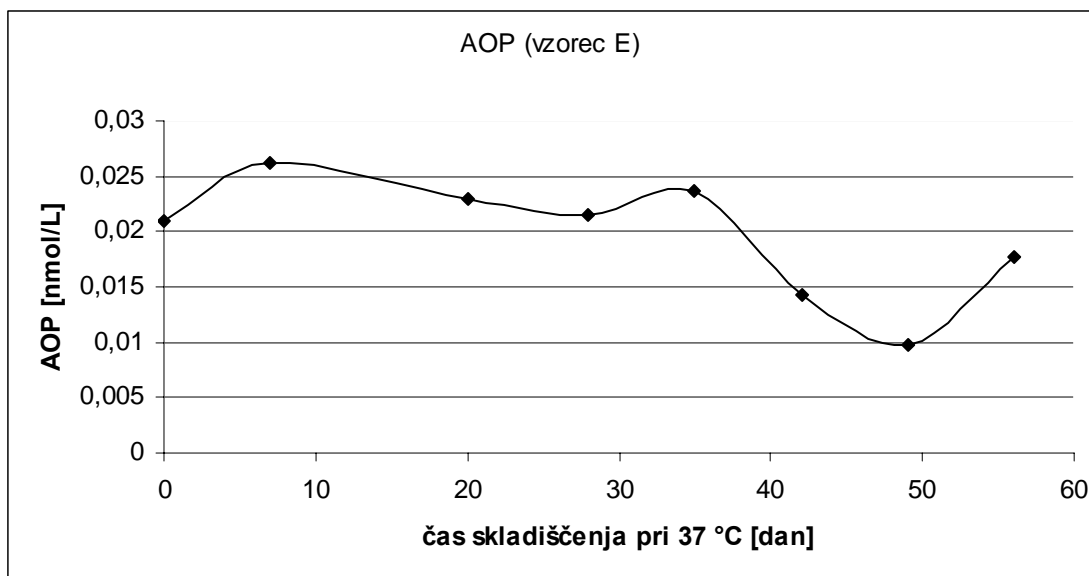
#### 4.2.4 Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom luteina



Slika 15: Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom luteina v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.

Iz slike 15 je razvidno, da je skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom luteina stabilen do četrtega tedna, nato pa strmo pade in v petem tednu zopet močno naraste, skoraj na prvotni nivo. Podobno kot v ostalih primerih, se je antioksidativni potencial dvignil verjetno zaradi produktov Maillardove reakcije, ki imajo antioksidativno aktivnost.

#### 4.2.5 Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom $\alpha$ -tokoferola

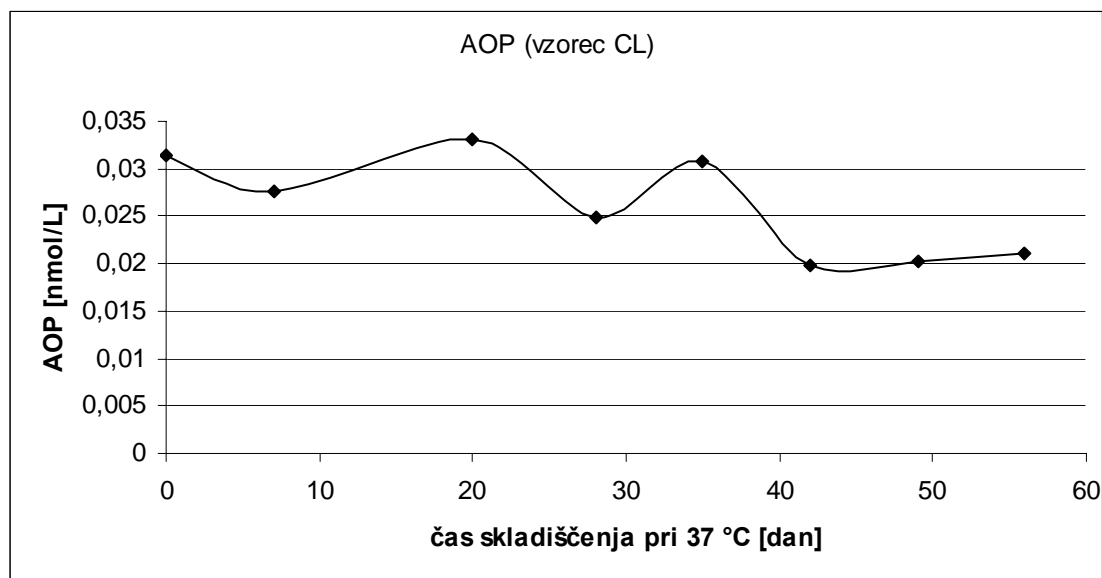


Slika 16: Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom  $\alpha$ -tokoferola v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.

Iz slike 16 lahko razberemo, da je skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom  $\alpha$ -tokoferola stabilen do petega tedna, nato pa pade in v sedmem tednu naraste. Sam dodatek  $\alpha$ -tokoferola, ni imel takega vpliva, kot dodatek vseh treh vitaminov (askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola).



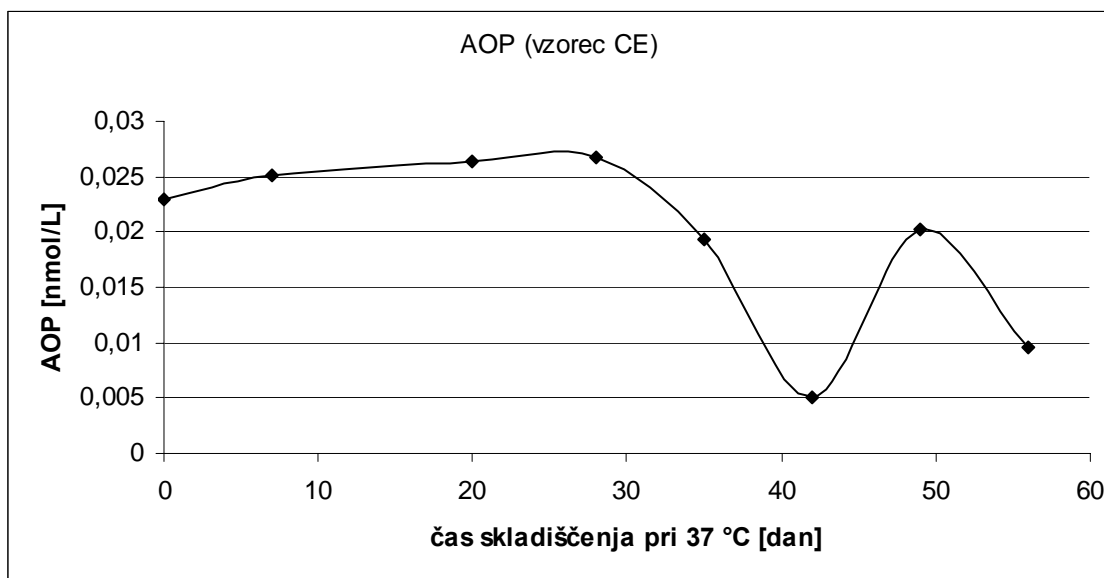
#### 4.2.6 Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in luteina



Slika 17: Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in luteina v osem tedenskem poskusu pri 37 °C

Iz slike 17 je razvidno, da je skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in luteina v primerjavi z ostalimi dokaj stabilen tekom osmih tednov in pade za manj kot tretjino začetne vrednosti.

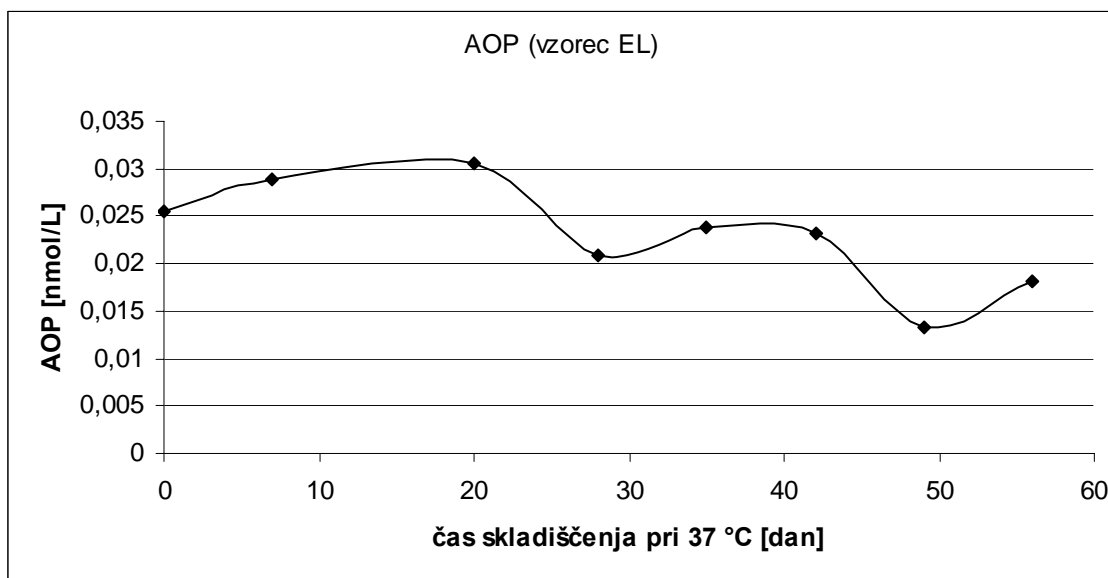
#### 4.2.7 Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in $\alpha$ -tokoferola



Slika 18: Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in  $\alpha$ -tokoferola v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.

Iz slike 18 je razvidno da ostaja skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom askorbinske kisline in  $\alpha$ -tokoferola stabilen do četrtega tedna, nato pa pade in se v šestem tednu zopet dvigne.

#### 4.2.8 Skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom luteina in $\alpha$ -tokoferola



Slika 19: Spremljanje antioksidativnega potenciala sadno-žitne rezine z dodatkom luteina in  $\alpha$ -tokoferola v osem tedenskem poskusu pri 37 °C.

Iz slike 19 je razvidno, da skupni antioksidativni potencial sadno-žitne rezine z dodatkom luteina in  $\alpha$ -tokoferola pada dokaj enakomerno. Izkazalo se je, da je pri 37 °C sadno-žitna rezina z dodatkom luteina in  $\alpha$ -tokoferola relativno oksidativno stabilna, saj je v osmih tednih skupni antioksidativni potencial padel le za okrog 30 %.

#### 4.3 REZULTATI VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE, L-DEHIDRO-ASKORBINSKE KISLINE IN $\alpha$ -TOKOFEROLA

Ob koncu raziskav smo nekatere vzorce dali na analizo v akreditiran laboratorij NEOTRON Group (Modena, Italija). Dobili smo sledeče rezultate:

Preglednica 11: Rezultati analize vsebnosti L-askorbinske kisline, L-dehidroaskorbinske kisline in  $\alpha$ -tokoferola v treh različnih vzorcih

Vzorec	L-askorbinska kislina [mg/100 g]	L-dehidroaskorbinska kislina [mg/100 g]	$\alpha$ -tokoferol [mg/ 100 g]
Frutabela 7 sadežev (4 °C)	<3	<3	<1
Vzorec CLE (4 °C)	80,3	6,0	11,0
Energijska ploščica K3 (20°C)	<3	<3	13,0

V proizvodu Frutabela 7 sadežev z vlaknino, ki je bila hranjena pri temperaturi 4 °C je bila koncentracija L-askorbinske kisline in L-dehidroaskorbinske kisline pod mejo detekcije (<3 mg/100 g),  $\alpha$ -tokoferola pa manj kot 1 mg/100g. take rezultate smo tudi pričakovali, saj na embalaži ni deklarirana vsebnost vitaminov.

V energijski ploščici K3, ki ima rok uporabe še več kot eno leto (marec 2010) in je bila hranjena pri sobni temperaturi pa so rezultati presenetljivi. Na embalaži je deklarirana vsebnost vitamina C (20 mg/100 g), rezultati pa so pokazali, da je le-tega manj kot 3 mg/100 g. Deklarirana vsebnost vitamina E pa je 3,3 mg/100 g, dejanska izmerjena vsebnost  $\alpha$ -tokoferola pa je bila 13 mg/100 g.

V vzorcu sadno-žitne rezine Frutabela 7 sadeže in dodatkom askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola, ki je bila hranjena v PVC vrečki pri temperaturi 4 °C, pa je bila vsebnost skupnega vitamina C (askorbinska + dehidroaskorbinska kislina) še 86,3 mg/100 g, vsebnost  $\alpha$ -tokoferola pa 11 mg/100 g.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Sadno-žitne rezine postajajo vse bolj priljubljena oblika sadno-žitnega obroka. Zaradi visoke vsebnosti prehranske vlaknine, imajo tudi visoko prehransko vrednost. Prehransko vrednost sadno-žitne rezine, bi lahko povečali tudi z dodatkom različnih vitaminov.

Poskus smo v tem diplomskem delu zastavili tako, da smo vzorce sadno-žitnih rezin z dodatki treh različnih naravnih antioksidantov (askorbinske kisline,  $\alpha$ -tokoferola in luteina), hranili pri temperaturi 37 °C. To so izredno ekstremni skladiščni pogoji, kar se je izkazalo tudi pri hitrosti izgube askorbinske kisline in skupnega antioksidativnega potenciala tekom osmih tednov.

#### 5.1.1 Askorbinska kislina

Askorbinska kislina je zelo občutljiva na povišane temperature, alkalni pH, dvovalentne katione in svetlobo (Odrizola-Serrano in sod., 2007). Bolj kot v raztopljeni je askorbinska kislina stabilna v suhi, kristalinični obliki (Davey in sod., 2000). Ahmad in sod. (2005), so ugotovili, da se v sadnih rezinah po štiri mesečnem skladiščenju na sobni temperaturi v povprečju izgubi 23 % vitamina C.

V diplomskem delu, smo sadno-žitni rezini dodali askorbinsko kislino v koncentraciji 100 mg/100 g. Poleg askorbinske kisline smo v različnih kombinacijah dodali tudi lutein in  $\alpha$ -tokoferol. Nekateri avtorji trdijo, da naj bi  $\alpha$ -tokoferol in karotenoidi povečali obstojnost askorbinske kisline s tem, da oksidirano obliko, ki nima aktivnosti vitamina C regenerirajo nazaj v reducirano obliko (Krinsky in Yeum, 2003; El-Agamey in sod., 2004). V našem primeru, dodatki  $\alpha$ -tokoferola in luteina niso bistveno povečali obstojnosti askorbinske kisline, kar je lepo vidno na sliki 11. V vseh primerih je koncentracija askorbinske kisline padala eksponentno in približno enako hitro. in sicer v osmih tednih za več kot 90 %. Razlog tega je verjetno sama temperatura (37 °C) skladiščenja. To so izredno ekstremni pogoji, ki so v praksi le redko doseženi. Za primerjavo, smo en vzorec sadno-žitne rezine, ki smo mu dodali askorbinsko kislino,  $\alpha$ -tokoferol in lutein hranili v hladilniku pri

temperaturi (4 °C) in izkazalo se je, da se je koncentracija askorbinske kisline je v sedmih mesecih zmanjšala le za 20 %. Na trgu najdemo veliko izdelkov, na katerih je navedena vsebnost askorbinske kisline, ki naj bi bila v izdelkih v roku časa trajanja. Zato smo določili vsebnost askorbinske kisline tudi v energetske ploščici K3, nemškega proizvajalca Simpert Reiter GmbH, z rokom uporabe še več kot 1 leto (marec 2010). Na deklaraciji je navedena vsebnost askorbinske kisline 20 mg/100g, dejanska koncentracija pa je bila pod mejo detekcije (3 mg/100g), ploščica pa je bila hranjena na sobni temperaturi.

Na podlagi poskusa v tem diplomskem delu, smo prišli do zaključka, da na obstojnost askorbinske kisline najbolj vpliva temperatura. Pri temperaturi hladilnika (4 °C), je bila izguba askorbinske kisline po sedmih mesecih le 20 %. Dodatka luteina in  $\alpha$ -tokoferola, pa nista pokazala nobenih značilnih učinkov na stabilnost askorbinske kisline. To trdijo tudi nekateri avtorji, ki pravijo, da askorbinska kislina regenerira oksidirano obliko vitamina E, kar pa ne velja v obratni smeri. Pri tej reakciji se askorbinska kislina oksidira in izgubi aktivnost vitamina C (Kitts, 1997). Niki in sod. (1995) pa poročajo, da naj bi bila interakcija med karotenoidi in askorbinsko kislino zanemarljiva.

### **5.1.2 Antioksidativni potencial**

Osnovna funkcija antioksidantov je preprečevanje oksidacije biološko in senzorično pomembnih komponent živil (Raspor in sod., 2000). Med postopki predelave in skladiščenja, prihaja do vrste kompleksnih reakcij, ki lahko bistveno spremenijo antioksidativni potencial živila (Hribar in Simčič, 2000). V glavnem se s skladiščenjem antioksidativni potencial zmanjšuje. Pri visokih temperaturah, ali pa po daljšem času tudi na sobni temperaturi, pa lahko poteka tudi Maillardova reakcija, katere produkti lahko povečajo ali pa zmanjšajo antioksidativni potencial, odvisno od pogojev (Nicoli in sod., 1999).

V našem primeru smo merili skupni antioksidativni potencial v sadno-žitni rezini z različnimi kombinacijami dodatkov askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola. Izkazalo se je, da je skupni antioksidativni potencial stabilen do enega meseca pri vseh kombinacijah dodanih vitaminov. Po tridesetem dnevu pa pride do razlik v hitrosti padanja skupnega antioksidativnega potenciala. Najvišji antioksidativni potencial je bil v vzorcu

sadno-žitne rezine, kateri smo dodali vse tri antioksidante (askorbinsko kislino, lutein in  $\alpha$ -tokoferol). Kot relativno oksidativno stabilni sta se izkazali tudi sadno-žitni rezini z dodatkom askorbinske kisline in luteina, ter luteina in  $\alpha$ -tokoferola. V teh dveh primerih je skupni antioksidativni potencial enakomerno padel in sicer v osmih tednih le za okrog 30 % začetne vrednosti. To se verjetno zgodi zato, ker  $\alpha$ -tokoferol zaščiti karotenoide pred oksidacijo (Kitts, 1997), kar velja tudi v obratni smeri, saj karotenoidi lahko regenerirajo  $\alpha$ -tokoferol s prenosom elektrona na  $\alpha$ -tokoferolni radikal, pri čemer nastane nazaj  $\alpha$ -tokoferol (Krinsky in Yeum, 2003). Rezultat tega je višja oksidativna stabilnost živila.

Pri kontrolnem vzorcu, kateremu nismo nič dodali, je bil antioksidativni potencial stabilen do štiridesetega dne, potem pa je zelo hitro padel na vrednost 0,005 nmol/L. Pri nekaterih vzorcih je prišlo do pojava, da se je antioksidativni potencial v četrtem ali petem tednu po padcu dvignil. O tem poročajo tudi Nicoli in sod. (1999), da se tekom toplotne obdelave naravni antioksidanti izgubljajo, istočasno pa nastajajo novi, ki so posledica Maillardove reakcije (slika 7). To se je zgodilo najbolj izrazito pri vzorcu, kateremu smo dodali le lutein. Samaras in sod. (2005) pravijo, da so karotenoidi in askorbinska kislina zelo učinkoviti antioksidanti, vendar pa se pri višjih temperaturah njihova vsebnost precej zmanjša. Pri povišanih temperaturah nastajajo melanoidini in reduktori, ki so produkti Maillardove reakcije in lahko povečajo antioksidativno aktivnost živila. Kot pravijo Nicoli in sod. (1999), pa lahko Maillardova reakcija poteka tudi pri sobni temperaturi, vendar bistveno počasneje kot pri visokih temperaturah. Zato predvidevamo, da pride do povišanja skupnega antioksidativnega potenciala šele po mesecu dni skladiščenja pri 37 °C.

## 5.2 SKLEPI

Glede na rezultate opravljenih analiz smo prišli do zaključkov:

- dodatki luteina in  $\alpha$ -tokoferola v danih koncentracijah in pogojih tretiranja niso vplivali na obstojnost askorbinske kisline
- askorbinska kislina je veliko obstojnejša v sadno-žitni rezini, ki je bila hranjena pri temperaturi hladilnika (4 °C)
- pri določanju skupnega antioksidativnega potenciala med posameznimi vzorci, delno izstopa vzorec CLE (z dodatkom askorbinske kisline, luteina in  $\alpha$ -tokoferola), pri katerem so med skladiščenjem, nihanja v vrednosti skupnega antioksidativnega potenciala najmanjša
- domnevamo, da produkti Maillardove reakcije po mesecu dni pri 37 °C v nekaterih primerih zvišujejo antioksidativni potencial
- dodatek askorbinske kisline,  $\alpha$ -tokoferola in luteina ni vplival na spremembo okusa sadno-žitne rezine, sprememba je le v barvi, v primeru, ko smo dodali lutein



## 6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali dodatek nekaterih naravnih antioksidantov povečuje stabilnost askorbinske kisline, ter kako ti dodatki vplivajo na skupni antioksidativni potencial v sadno-žitni rezini.

V maso sadno-žitne rezine smo dodali različne kombinacije askorbinske kisline,  $\alpha$ -tokoferola in luteina, ter termostatirali na 37 °C za dobo osmih mesecev. Vsak teden smo vzorčili in vzorce stabilizirali z 2 % raztopino metafosforne kisline. Po dveh mesecih smo določili koncentracijo askorbinske kisline kromatografsko z HPLC in skupni antioksidativni potencial z DPPH metodo.

Rezultati so pokazali, da dodatek luteina in  $\alpha$ -tokoferola v nobeni kombinaciji značilno ne povečuje obstojnosti askorbinske kisline. Kitts in sod. (1997) pravijo, da askorbinska kislina regenerira oksidirano obliko vitamina E, kar pa ne velja v obratni smeri. S tem, ko reducira oksidirano obliko  $\alpha$ -tokoferola, se sama oksidira in izgublja aktivnost vitamina C. Niki in sod. (1995), pa trdijo, da naj bi bila interakcija med askorbinsko kislino in karotenoidi zanemarljiva. Askorbinska kislina je bila veliko obstojnejša v sadno-žitni rezini, ki je bila shranjena v hladilniku pri 4 °C.

Dodatki naravnih antioksidantov vplivajo na stabilnost skupnega antioksidativnega potenciala v sadno-žitni rezini, ne pa toliko na samo vrednost. Najvišji skupni antioksidativni potencial je dosegla sadno-žitna rezina, kateri smo dodali vse tri vrste antioksidantov (askorbinska kislina, lutein in  $\alpha$ -tokoferol). Kot relativno oksidacijsko obstojni pa sta se izkazali tudi sadno-žitni rezini z dodatkom luteina in askorbinske kisline, ter luteina in  $\alpha$ -tokoferola. Pri teh treh kombinacijah antioksidantov je prišlo do izraza sinergistično delovanje luteina, askorbinske kisline in  $\alpha$ -tokoferola kar opisujejo tudi Liu in sod. (2008) ter Krinsky in Yeum (2003).

Po osmih tednih je bila najnižja vrednost antioksidativnega potenciala v sadno-žitni rezini brez dodatka antioksidantov.

V nekaterih primerih so produkti Maillardove reakcije po mesecu dni povečali antioksidativni potencial. Najbolj izrazito se je to zgodilo v rezini, ki ji je bil dodan le lutein. Antioksidativne lastnosti produktov Maillardove reakcije naj bi bile predvsem posledica delovanja rjavih spojin z večjo molsko maso, ki nastajajo v zadnji fazi Maillardove reakcije. Pri tretiranju živil kratek čas na relativno nizkih temperaturah, pa nastajajo produkti, ki imajo izrazite prooksidativne lastnosti. Ob intenzivnejšem porjavenju pa je njihova vsebnost manjša. V živilih rastlinskega izvora prihaja med toplotno obdelavo pri nizkih temperaturah do zmanjšanja skupnega antioksidativnega potenciala, kot posledica zmanjšanja aktivnosti naravno prisotnih antioksidantov ter zaradi nastanka produktov Maillardove reakcije, ki imajo prooksidativne lastnosti. Pri daljšem postopku toplotne obdelave ali pa pri tretiranju pri višjih temperaturah, nastajajo produkti Maillardove reakcije, ki imajo antioksidativne lastnosti, zaradi tega se skupni antioksidativni potencial živila poveča (Nicoli in sod., 1999; Hribar in Simčič, 2000; Simčič, 1995).

V energijski ploščici K3, kjer je navedeno, da naj bi imela vsebnost askorbinske kisline v koncentraciji 20 mg/100g, je bilo le-te, več kot leto pred iztekom roka uporabe, pod mejo detekcije, ki je 3 mg/100g.

## 7 VIRI

Ahmad S., Vashney A.K., Srivasta P.K. 2005. Quality attributes of fruit bar made from papaya and tomato by incorporating hydrocolloids. *International Journal of Food Properties*, 8: 89-99.

Basu T.K., Dickerson J.W.T. 1996. *Vitamins in human health and disease*. Wallingford, CAB International: 125-146.

Bates C.J. 1995. Vitamin A. *Lancet*, 345, 8941: 31-35.

Bernot Sotensšek M. 2001. Antioksidativno učinkovanje ekstraktov rožmarina v zamrznjenih sekljanih puranjih zrezkih. *Diplomsko delo*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 17–22.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/ Food Science and Technology*, 28: 25-30.

Chepda T., Cadau M., Lassabliere F., Reynaud E., Perier C., Frey J., Chamson A. 2001. Synergy between ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol on fibroblast in culture. *Life Science*, 69: 1587-1596.

Davey W.M., Montagu M.V., Inze D., Sanmartin M., Kanelis A., Smirnoff N Bejzie J.J. I., Strain J.J., Favell D., Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825-860.

Davies M.B., Austin J., Partridge D.A. 1991. *Vitamin C: Its chemistry and biochemistry*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 154 str.

- Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G., 1997. The carotenoids as antioxidants – a Review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 41, 3: 189-200.
- El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J., Mortensen A., Phillip D.M., Truscott G.T., Young A.J. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430: 37-48.
- Gkömen V., Acar J. 1996. A simple HPLC method for the determination of total vitamin C in fruit juices and drinks. *Fruit Processing*, 6, 5: 198-201.
- Haila K.M., Lievonen S.M., Heinonen M.I. 1996. Effects of lutein, lycopene, annatto and  $\gamma$ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 8: 2096-2100.
- Higgs J., Styles K. 2006. Principles and practical aspects of healthful school vending. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 31: 225-232.
- Hodge J.E. 1953. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 15: 928-943.
- Hribar J., Simčič M. 2000. Antioksidanti v sadju in vrtninah. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151-157.
- Fructal. 2001. Od sadja do Frutabele. Fructalove novice. Ajdovščina, Fructal, 8,1: 9-9.
- Fructal. 2008a. Sestava Frutabele sedem sadežev. Ajdovščina, Fructal. [www.fructal.si/](http://www.fructal.si/) ( 5.12.2008): 1 str.
- Fructal. 2008b. Bločni diagram postavitve strojev na liniji za proizvodnjo sadnih rezin. Interna dokumentacija. Ajdovščina, Fructal d.d.: 1 str.

- Kiokias S., Dimakou C., Oreopoulou V. 2008. Activity of natural carotenoid preparations against the autoxidative deterioration of sunflower oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 114, 4: 1278-1284.
- Kitts D.D. 1997. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 198-203.
- Korošec, L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo:11-21.
- Krinsky N.I., Yeum KJ. 2003. Carotenoid-radical interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305: 754-760.
- Laroque D., Inisan C., Berger C., Vouland E., Dufossé L., Guérard F. 2008. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chemistry*, 111, 4: 1032-1042.
- Liu D., Shi J., Ibara C.A., Kakuda Y., Xue S.J. 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/ Food Science and Technology*, 41, 7:1344-1349.
- Medić-Šarić M., Buhač I., Bradamante V. 2000. Vitamini i minerali, istine i predrasude. Zagreb, F. Hoffmann-La Roche: 359 str.
- Meydani M. 1995. Vitamin E. *Lancet*, 345: 170-175.
- Miquel E., Alegría A., Barberá R., Farré R., Clemente G. 2004. Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *International Dairy Journal*, 14: 1003-1011.

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songlanakar Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219.

Nicoli M.C., Anese M., Parpinel M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 94-100.

Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H., Goth N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E and beta-carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1322-1326.

Odriozola-Serrano I., Hernandez-Jover T., Martin-Belloso O. 2007. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*, 105: 1151-1158.

Offord E.A., Gautier J.C., Avanti O., Scaletta C., Runge F., Krämer K., Applegate L.A. 2002. Photoprotective potential of lycopene,  $\beta$ -carotene, vitamin E, vitamin C and carnolic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, 12: 1293-1303.

Okogeri O., Tasioula-Margari M. 2002. Changes occurring in phenolic compounds and  $\alpha$ -tocopherol of virgin olive oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1077-1080.

Osborn-Barnes H.T., Akoh C.C. 2003. Copper-catalyzed oxidation of a structured lipid-based emulsion containing  $\alpha$ -tocopherol and citric acid: Influence of pH and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6851-6855.

- Park SR., Kim YH., Park HJ., Lee YS. 2004. Stability of tocopherols and tocotrienols extracted from unsaponifiable fraction of rice bran under various temperature and oxygen condition. V: New directions for a diverse planet: Proceedings of the 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, 26 Sep – 1 Oct 2004. Fischer, T. (ed.), Brisbane, Australia, The Regional Institute Ltd., [http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/5/1/1/654\\_park.htm](http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/5/1/1/654_park.htm) / (9.december 2008): 5 str.
- Piironen V., Varo P., Koivistoinen P. 1987. Stability of tocopherols and tocotrienols during storage of foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1, 2: 124-129.
- Rahman A.R., Schafer G.R. 1972. Directly edible, compacted and dehydrated fruit bar. United States Patent 3 705 814.: 3 str.
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioproceni pridobivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-65.
- Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-braking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254.
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q10. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-51.
- Samaras T.S., Camburn P.A., Chandra S.X., Gordon M.H., Ames J.M. 2005. Antioxidant properties of kilned and roasted malts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8068-8074.

- Sen C.K., Khanna S., Roy S. 2006. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Science*, 78: 2088-2098.
- Simčič M. 1995. Interaktivnost postopkov skladiščenja in antioksidantov na porjavenje eksokarpa jabolka (*Malus domestica Borkh*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 80 str.
- Subagio A., Morita N. 2003. Prooxidant activity of lutein and its dimyristate esters in corn triacylglyceride. *Food Chemistry*, 81, 1: 97-102
- Širčelj H. 2008. Karotenoidi v fotosinteznem aparatu in odziv na stres. *Acta Agriculturae Slovenica*, 91: 271-282.
- Škvarča M. 2000. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179–191.
- Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114.
- Vijayanand P., Yadav A.R., Balasubramanyam N., Narasimham P. 2000. Storage stability of guava fruit bar prepared using a new process. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/ Food Science and Technology*, 33, 2: 132-137.
- Young J.A., Lowe G.M. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 1: 20-27.



## ZAHVALA

Najprej gre zahvala mentorju doc. dr. Rajku Vidrihu in somentorju prof. dr. Marjanu Simčiču za strokovno pomoč, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala tudi prof. dr. Janezu Hribarju za opravljeno recenzentsko delo.

Hvala tudi ostalemu osebju katedre za tehnologije, prehrano in vino, še posebej Kseniji in Sonji.

Posebna zahvala gre podjetju Fructal d.d., ki me je vsa ta leta študija štipendiralo.

Hvala tudi gospe Ivici Hočevar in Lini Burkan za pomoč pri zbiranju in urejanju literature.

Hvala mojim staršem, mami Zdenki in očetu Milošu, bratu Andražu in nonotu Srečku, ker ste mi stali ob strani in me na vse načine spodbujali pri študiju.

Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem.

Nenazadnje bi se zahvalil tudi tebi Janja, ker me sprejemaš takega kot sem. V vseh mojih vzponih in padcih si verjela vame, me optimistično spodbujala in mi nesebično pomagala.

Hvala vsem!