BIOTEHNIŠKI CENTER NAKLO
SREDNJA ŠOLA

RAZISKOVALNA NALOGA

Področje: Biotehnologija (Živilstvo)

PRIMERJAVA ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA BELJAKOVINSKIH ŽIVIL ŽIVALSKEGA IN RASTLINSKEGA IZVORA

Gibanje znanost mladini

Avtorji: Sara MEZE
Jakob ROZMAN
Maks RUPARČIČ

Program: Tehniška gimnazija

Mentor-ica: mag. Marjetka KASTELIC ŠVAB, prof. biol., gosp.

Strahinj, marec 2024

I KAZALO VSEBINE

Povzetek ... **1**
Abstract ... **2**
Zahvala ... **3**
1 UVOD ... **4**
DELOVNE HIPOTEZE ... **6**
2 TEORETIČNI DEL ... **7**
2.1 VPLIV TEMPERATURE NA AOP ŽIVILA ... 7
2.2 SESTAVA ŽIVALSKE IN RASTLINSKE HRANE ... 7
2.2.1 Antioksidanti v živalski hrani in AOP ... 8
2.1.2 Antioksidanti v rastlinski hrani in AOP ... 8
2.3 ANTIOKSIDANTI ... 9
2.3.1 Prosti radikali ... 10
2.4 DIETE ... 10
3 EKSPERIMENTALNI DEL ... **12**
3.1 PRIPRAVA REAGENTOV IN EKSTRAKTOV ... 12
3.1.1 Priprava 3% metafosforne kisline $(HPO_3)_3$ ... 12
3.1.2 Ekstrakcija vzorcev hrane s 3% vodno raztopino metafosforne kisline (MFK) ... 12
3.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA Z RADIKALOM DPPH• ... 15
3.2.1 Priprava DPPH• v metanolu ... 16
3.2.2 Priprava umeritvene krivulje s Troloxom ... 16
3.2.3 Eksperimentalni postopek določanja AOP vzorcev ... 20
3.2.4 Izračun AOP ... 20
4 REZULTATI ... **23**
5 RAZPRAVA ... **30**
6 ZAKLJUČEK ... **32**
7 VIRI IN LITERATURA ... **35**
7.1 KNJIŽNI VIRI ... 35
7.2 SPLETNI VIRI ... 35

II KAZALO SLIK

Slika 1: Pripravljena 3% vodna raztopina metafosforne kisline (Foto: S. Meze, 13. 12. 2023) 12
Slika 2: Kuhanje alg na magnetnem mešalu (Foto: S. Meze, 13. 12. 2023).....13
Slika 3: Teriranje surovih in kuhanih alg (Foto: S. Meze, 13. 12. 2023).....13
Slika 4: Priprava vzorcev v epruvetah z raztopino metafosforne kisline (Foto: M. Ruparčič, 13. 12. 2023).....14
Slika 5: Centrifugiranje vzorcev (Foto: S. Meze, 3. 1. 2024) 14
Slika 6: Mikrofilter (Foto: S. Meze, 3. 1. 2024).....15
Slika 7: Mikrofiltriranje vzorca surovih acai jagod s pomočjo brizge (Foto: S. Meze, 3. 1. 2024) 15
Slika 8: Priprava DPPH• raztopine v metanolu (Foto: S. Meze, 23. 1. 2024).....16
Slika 9: Zatehtana količina Troloxa (Foto: S. Meze, 19. 1. 2024) 17
Slika 10: Narejene razredčitve Troloxa (Foto: S. Meze, 19. 1. 2024) 17
Slika 11: Paralelke z dodanim DPPH• različnih razredčitev Troloxa (levo zgoraj koncentracija z najmanj Troloxa (1:80), spodaj desno koncentracija raztopine z največ Troloxa (1:10)) (Foto: M. Ruparčič, 23. 1. 2024) 17
Slika 12: Šolski spektrofotometer UV-1201.....19
Slika 13: Polnjenje kivete z raztopino DPPH• (Foto: S. Meze, 23. 1. 2024) 20
Slika 14: Vzorci kuhanega piščanca, jeter in čičerike pripravljeni za spektrofotometrijo (Foto: S. Meze, 31. 1. 2024).....22
Slika 15: Vzorci govejega mesa in alg pripravljeni za spektrofotometrijo (Foto: J. Rozman, 24. 1. 2024).....22
Slika 16: Vzorci acai jagod in kvasnih kosmičev pripravljeni na spektrofotometrijo (Foto: S Meze, 29. 1. 2024) 22

III KAZALO TABEL

Tabela 1: Prikaz redčenja za umeritveno krivuljo s Troloxom 18

Tabela 2: Vrednosti absorbanc in AOP vzorcev izbranih živil 23

IV KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvena krivulja, absorbanca v odvisnosti od masne koncentracije Troloxa.....19
Graf 2: Primerjava AOP živalskih beljakovinskih vzorcev živil.....26
Graf 3: Primerjava AOP rastlinskih beljakovinskih vzorcev živil 27
Graf 4: Primerjava AOP vseh obravnavanih vzorcev beljakovinskih živil.....28
Graf 5: Prikaz AOP v primerjavi z dA 29

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AOP	antioksidativni potencial
°C	stopinj Celzija
ml	mililiter
mg	miligram
UV	ultravijolična svetloba
LDL	lipoprotein nizke gostote
EPA	eikozapentaenojska kislina
DHA	dokozaheksaenojska kislina
BHA	butilirani hidroksianizol
BHT	butilirani hidroksitoluen
µm	mikrometer
MFK	metafosforna kislina
RF	referenčni vzorec
SP	slepi vzorec
VZ	vzorec
MeOH	metanol
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dA	razlika v izmerjenih absorbancah
ALA	alfalinolenska kislina
DPPH•	1,1 -difenil-2-pikril-hidrazil

Povzetek

V človekovi prehrani so poleg ostalih hranil zelo pomembni tudi antioksidanti, saj preprečujejo delovanje prostih radikalov kisika (oksidantov) in posledično varujejo celice, celične membrane pred poškodbami. Nastajanje oksidantov spodbujajo stres in zunanji dejavniki, kot so npr. strupi v zraku, vodi, nikotin v tobaku, alkohol. Antioksidantov je več vrst, ki so med seboj neločljivo povezani, vsi pa so sestavni del hrane. V raziskovalni nalogi smo želeli primerjati antioksidativni potencial živalskih in rastlinskih beljakovinskih živil v surovi in kuhani obliki. Za primerjalne vzorce smo izbrali piščančje, goveje in svinjsko meso, losos, divjačino, goveja jetra, alge (Wakame – morska zelena alga), tofu, kvasne kosmiče, fižol, čičeriko in acai jagode. Vsa živila za analizo smo pripravili surova in kuhana.

Praktičen del raziskave smo začeli s pripravo vzorcev živil v 3% metafosforni kislini in nadaljevali z določanjem antioksidativnega potenciala (AOP) z radikalom DPPH•. Vzorce smo uspešno centrifugirali in mikrofiltrirali. Pred pipetiranjem vzorcev v kivete smo vsakič znova pripravili in z metanolom umerili novo DPPH raztopino. Vzorce smo med raziskavo stalno hranili v zamrzovalniku, DPPH• in druge reagente pa v digestoriju. S kemijsko-instrumentalno analizo s spektrofotometrom smo vzorcem izmerili absorbanco. S pomočjo zbranih rezultatov smo na koncu izračunali AOP 24-ih različnih vzorcev. Vse priprave vzorcev in poskuse smo izvajali v šolskem laboratoriju. Z raziskovanjem smo dokazali, da imajo najvišji AOP kuhane acai jagode, takoj za njimi kuhana jetra, surovi kvasni kosmiči, surove alge, surova goveja jetra, surov fižol in kuhan fižol. Najnižji AOP smo izračunali pri kuhanem govejem mesu. Približno enake vrednosti AOP smo izračunali pri piščančjem mesu in divjačini, kuhanem in surovem tofuju ter kuhanem in surovem lososu. Menimo, da bi se tudi surove acai jagode po rezultatih AOP približale kuhanim, vendar so zaradi močne rdeče barve zmotile analizo. Pokazale so previsoke vrednosti absorbance, kar je pri izračunu dalo netočen rezultat vrednosti AOP. Glede na dobljene rezultate izbranih vzorcev, imajo rastlinska beljakovinska živila v večini višji AOP kot živalski vzorci hrane, razen govejih jeter, ki imajo takoj za acai jagodami najvišje vrednosti AOP. Z grafičnimi prikazi smo tudi potrdili, da imajo surovi vzorci večinoma višji AOP kot vsi kuhani izbrani vzorci beljakovinskih živil.

Ključne besede: antioksidanti, antioksidativni potencial, absorbanca, DPPH•, spektrofotometer.

Abstract

Antioxidants are very important in the human diet, along with other nutrients, as they prevent the action of oxygen free radicals (oxidants) and consequently protect cells, cell membranes from damage, etc. The production of oxidants is stimulated by stress and external factors such as toxins in the air, water, nicotine in tobacco, alcohol. There are several types of antioxidants, all of which are inextricably linked to each other and all of which are a component of food. In this research we wanted to compare the antioxidant potential of animal and plant protein foods. The comparative samples were chicken, beef, pork, salmon, venison, beef liver, algae (Wakame - green seaweed), tofu, yeast flakes, beans, chickpeas and acai berries. All foods were prepared raw and cooked for analysis.

The practical part of the study started with the preparation of food samples in 3% metaphosphoric acid and continued with the determination of the antioxidant potential (AOP) with the DPPH• radical. The samples were successfully centrifuged and microfiltered. Before pipetting the samples into cuvettes, a new DPPH• solution was prepared and recalibrated each time with methanol. The samples were kept in a freezer at all times during the study and the DPPH• and other reagents were stored in a digestory. The absorbance of the samples was measured by chemical-instrumental analysis using a spectrophotometer. Finally, the AOP of the 24 different samples was calculated using the collected results. All sample preparations and experiments were carried out using the laboratory method. We have shown that cooked acai berries have the highest AOP, followed by cooked liver, raw yeast flakes, raw algae, raw beef liver, raw beans and cooked beans. The lowest AOP was calculated for cooked beef. Approximately the same AOP values were calculated for chicken and venison, cooked and raw tofu and cooked and raw salmon. We believe that raw acai berries would also be close to cooked acai berries in terms of AOP results, but due to their strong red colour they showed too high absorbance values, which gave an inaccurate AOP result in the calculation. According to the results obtained for the selected samples, plant protein foods tend to have a higher AOP than animal food samples. However, it was confirmed by graphical representations that the raw samples mostly have a higher AOP than all cooked selected protein food samples.

Keywords: antioxidants, antioxidant potential, absorbance, DPPH•, spectrophotometer.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujemo naši mentorici profesorici Marjetki Kastelic Švab, ki nam je za začetek sploh dala možnost opravljanja te naloge in nam predstavila metodo dela, ki je sami še nismo poznali. Med našim raziskovanjem nas je usmerjala, nam nudila strokovno pomoč in nas motivirala, da smo nalogo uspešno zaključili.

Zahvaljujemo se tudi laborantkama Katji Dobnikar in Meti Žefran, ki sta nam priskočili na pomoč v laboratoriju vedno, ko smo ju potrebovali.

1 UVOD

Antioksidanti v naši prehrani igrajo ključno vlogo, saj preprečujejo delovanje prostih radikalov kisika. Ti proizvodi presnove neprestano nastajajo v človeškem telesu kot stranski produkt različnih bioloških procesov. Naloga antioksidantov je, da ščitijo celice in tkiva pred poškodbami. Vnos s hrano lahko zmanjša tveganje za razne kronične bolezni, povezane z oksidativnim stresom.

Različne vrste živil različno obdelamo tako, da so antioksidanti v njih telesu laže dostopni. Karotenoidi, ki krepijo naš imunski sistem, kožo varujejo pred UV-sevanjem in preprečujejo nastanek sive mrene, so telesu lažje dostopni termično obdelani. Flavonoidi nam omogočajo primerno redko, zdravo in pretočno kri, LDL-holesterol varujejo pred oksidacijo in tako zavirajo njegovo odlaganje na žilah. Najbolj prisotni so v svežem sadju in zelenjavi, s shranjevanjem pa se njihova vsebnost zmanjšuje (Merljak in Koman, 2008: str. 36). Začimbe in zelišča pomagajo zniževati vrednost holesterola v krvi, znižujejo krvni tlak in delujejo antibakterijsko. Njihovo delovanje se pri toplotni obdelavi skoraj izniči, zato jih pri pripravi jedi dodajamo na koncu.
Glavni namen naše raziskovalne naloge je ugotavljanje in primerjanje AOP različnih vrst beljakovinskih živil živalske in rastlinske hrane, ki pa jih delimo glede na načine priprave na surove in kuhane. Še posebej smo želeli ugotoviti rezultate živalskih beljakovinskih živil, torej različnih vrst mesa, saj jih bolj poredko povezujemo z antioksidanti. Na podlagi prebrane literature smo izbrali dvanajst različnih živil, med njimi polovico živalskega in polovico rastlinskega izvora, katere dietetiki pogosto uporabljajo v predpisanih dietah. Živila, ki smo jih izbrali za raziskovanje so: piščančje, goveje in svinjsko meso, losos, divjačina, goveja jetra, tofu, kvasni kosmiči, Wakame morske zelene alge, fižol, čičerika in acai jagode. Izpostaviti smo želeli živila z najvišjim in najnižjim AOP, pri tem pa ugotoviti ali na AOP živila vpliva termična obdelava. Z ugotovitvijo AOP živila presodimo, zakaj je živilo vredno uživati v redni prehrani in kaj ta doprinese našemu telesu. Večji kot je AOP, več antioksidantov vsebuje živilo, to pa so snovi, ki nas varujejo pred številnimi boleznimi srca in ožilja, virusi in bakterijami.

V študiji so raziskovali izolacijo antioksidantov iz rastlinskih beljakovinskih živil. Naravni antioksidanti, ki izvirajo iz rastlinskih beljakovinskih živil so v zadnjem času pritegnili svetovno pozornost zaradi varstva okolja, nizkih stroškov in so brez vsebnosti toksičnih stranskih učinkov (Wen, C. s sod., 2020). Želeli smo preučiti vrednosti AOP nekaterih rastlinskih beljakovinskih živil, da bi dodatno potrdili njihovo prednost uporabe v zdravi prehrani.

Zanimiv se nam je zdel podatek v študiji, ki omenja acai jagode, kot sadje z bogatim virom antioksidantov, fenolnih in maščobnih kislin (Camargo Neves, L. s sod., 2022). Med drugim so študije pokazale tudi, da imajo koristne lastnosti proti širjenju rakavih celic. To nas je spodbudilo k izbiri acai jagod kot enega od izbranih vzorcev.

V študiji smo prebrali, da na vrednosti AOP pri racah vpliva starost, in sicer je ta najvišji pri racah starih štiri tedne (Guo, Y., 2021). To nas je spodbudilo k izbiri analize piščanca, ki je pogosto na našem jedilniku in ima podobne lastnosti kot raca, da bi ugotovili njegovo vsebnost antioksidantov.

DELOVNE HIPOTEZE

Na osnovi prebrane literature smo si pri raziskovalni nalogi postavili naslednje hipoteze.

- Domnevamo, da ima beljakovinska rastlinska hrana višji AOP kot beljakovinska hrana živalskega izvora.
- Domnevamo, da bosta imela vzorca surovih alg Wakame in surovih acai jagod najvišji in tudi približno enako visok AOP od vseh izbranih vzorcev.
- Domnevamo, da bo imel surov losos najvišji AOP med analiziranimi beljakovinskimi živili živalskega izvora.
- Domnevamo, da termična obdelava živil zniža vrednosti AOP.
- Domnevamo, da mesna hrana nima antioksidantov.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 VPLIV TEMPERATURE NA AOP ŽIVILA

Oksidativne spremembe v živilu ne vodijo le v nastanek spojin, ki povzročijo poslabšanje senzorične in prehranske vrednosti živila, vendar tudi v nastanek toksičnih spojin. Toplotna obdelava živil (npr. cvrenje) predstavlja težavo zaradi toplotne razgradnje in pretvorb lipidov in antioksidantov, pri čemer nastanejo produkti, ki imajo negativne učinke na zdravje ljudi (Abramovič, 2011: str. 57). Med postopkom pridelave surovin in priprave izdelka se mnogi antioksidanti uničijo, zato jih je treba dodajati tudi neodvisno od prehrane.

2.2 SESTAVA ŽIVALSKE IN RASTLINSKE HRANE

Hrana živalskega izvora je izredno bogat vir kakovostnih beljakovin za človeški organizem. Poleg beljakovin, v njej najdemo tudi številne vitamine (vitamini skupine B, vitamini E in D), rudnine (železo, kalij, natrij, magnezij, cink, itd.), malo ogljikovih hidratov ter tako nasičene kot nenasičene maščobe. Meso je težko nadomestljiv biološki vir železa in cinka ter vitaminov B_1 in B_{12}. Vrednosti teh hranil so višje pri pustem mesu in precej nižje v mastnem ali mletem mesu (Merljak in Koman, 2008: str. 48). Ribe (tuna, losos, skuša, postrv, itd.) so edini vir posebnih polinenasičenih maščobnih kislin EPA in DHA, ki pa so v človeški prehrani zelo pomembne. V telesu nastajata tudi kot presnovni produkt alfalinolenske kisline (ALA), s katero je bogato laneno olje, vendar pogosto ta količina za zdravje ne zadošča. Vse tri (ALA, DHA, EPA) so omega-3 maščobne kisline. EPA in DHA so prvotno odkrili v ribjih maščobah. Njuna količina v ribah je odvisna od letnega časa in se močno spreminja.

Prehransko najbogatejša **rastlinska hrana** je proizvod tiste rastline, ki raste v najbolj neugodnih pogojih. Proti njim se borijo s snovmi, imenovanimi sekundarni metaboliti. Vse od teh snovi niso koristne, nekatere so celo strupene. Koristne sekundarne metabolite imenujemo bioaktivne snovi, saj v človeškem telesu spodbujajo razstrupljanje in delujejo kot antioksidanti. Poleg sekundarnih metabolitov so v rastlinski hrani tudi številni vitamini (vitamin C, K, skupina B, itd.), minerali, kisline, sladkor, škrob, beljakovine (kalčki, soja, stročnice, žita), encimi, mlečnokislinske bakterije in prehranska vlaknina. Te imajo za človeško telo velik pomen, saj spodbujajo debelo črevo in tako zagotavljajo učinkovito peristaltiko. Najbolj celovita hrana rastlinskega izvora so žita. Ker iz žitnega zrna vzklije nova rastlina, mora zrno imeti na voljo vse hranilne snovi, potrebne za rast nove rastline. Toplotna obdelava takega živila omogoči telesu izkoristek ogljikovih hidratov, pri tem pa se pogosto izgubijo vitamini in maščobe, zato

je v prehrano priporočeno vključevati tako surova, kot toplotno obdelana žitna zrna (Merljak in Koman, 2008: str. 40).

2.2.1 Antioksidanti v živalski hrani in AOP

Z živalsko hrano lahko v telo v največji meri vnesemo vire selena, cinka in koencima Q10, kot antioksidantov. Selen je mikroelement, ki pomaga pri pravilnem delovanju ščitnice, ščiti jetra, krepi imunski sistem, povečuje nastanek moških spolnih celic in spodbuja nastajanje antioksidantnega encima glutation peroksidaze. Najbogatejši viri selena so morska hrana, jetra, meso in jajca. Vsebujejo ga tudi žita, sadje, zelenjava in oreški, vendar v manjših količinah. Cink deluje kot kofaktor in sodeluje pri številnih encimskih reakcijah. Pomemben je za normalno rast in razvoj, pospešuje tudi celjenje in obnovo tkiva. Najdemo ga večinoma v hrani živalskega izvora, tj. morski hrani (še posebej ostrigah), divjačini, perutnini, govedini, teletini (telečjih jetrih), jajcih in mlečnih izdelkih, temni čokoladi, rjavem in divjem rižu, ajdi ter gobah (Merljak in Koman, 2008: str. 49, 50).

Koencim Q10 je koencim dihalne verige, kar pomeni, da sodeluje pri procesih pridobivanja energije v celicah. Spada v skupino ubikinonov. V celicah je potreben za optimalno delovanje mišičnega dela, aktivnosti živčevja, regeneracijskih procesov in imunskih reakcij. Največ ga najdemo v govejem in svinjskem srcu, jetrih in mišicah ter v piščančjih jetrih (https://www.abczdravja.si/hrana/abc-antioksidantov/, 20. 1. 2024).

2.1.2 Antioksidanti v rastlinski hrani in AOP

Rastline so pomemben vir sekundarnih metabolitov, ki sodijo med fenolne spojine in so glavni viri rastlinskih antioksidantov (Schoss in Mravljak, 2023). Polifenoli so skupina metabolitov, ki imajo v rastlini različne funkcije, od barvil v listih, cvetovih in plodovih do antioksidativnega, protimikrobnega in protiglivnega delovanja ter zaščite pred UV-sevanjem. Npr. karotenoidi se v človeških prebavilih absorbirajo, kar se pri mnogih sesalcih ne zgodi.

Pri rastlinah so karotenoidi pomembni antioksidanti, ki odstranjujejo singletni kisik in preprečujejo njegovo nastajanje v procesu fotosinteze. Telesu so laže dostopni termično obdelani in z malo maščobe, so dobra zaščita pred rakom, boleznimi srca in ožilja, spodbujajo nastajanje in delovanje celic, ki sestavljajo naš imunski sistem, kožo varujejo pred UV-sevanjem in preprečujejo nastanek sive mrene. Ne učinkujejo ločeno, ampak v povezavi z

drugimi bioaktivnimi snovmi. Med najbolj znanimi karotenoidi so betakaroten, alfakaroten, likopen in lutein (Kočevar Glavač, 2013).

Flavonoidi so prav tako pomembni antioksidanti v rastlinski hrani. Največ jih je v svežem sadju in zelenjavi, s shranjevanjem pa se njihova vrednost zmanjšuje. Na vročini so obstojni, vendar so topni v vodi in zato med kuho preidejo v vodo (Merljak in Koman, 2008: str. 36). Zavirajo razvoj škodljivih bakterij in virusov, omogočajo zdravo in pretočno kri ter zavirajo odlaganje LDL-holesterola na žilah (Kočevar Glavač, 2013).

Tudi začimbe in zelišča imajo precejšnje količine različnih fenolnih spojin in drugih antioksidantov, zato se uporabljajo predvsem kot preventiva pred rakom. Ker se njihovo delovanje pri toplotni obdelavi skoraj povsem izniči, je pri pripravi jedi priporočljivo vse začimbe in zelišča dodati na koncu. Nekatera zelišča in začimbe z najvišjim antioksidativnim delovanjem so: kurkuma, ingver, dišeči klinčevec in listi žajblja (Merljak in Koman, 2008: str. 38, 39).

Primerjalne vrednosti AOP smo vzeli iz raziskave, kjer so določali vrednosti korenja in rdeče pese, sušene z vakuumskim sušilnikom pri 50 °C. Vrednosti so pokazale 1,11 $mmol_{DPPH}$/100 g pri rdeči pesi in 0,64 $mmol_{DPPH}$/100 g pri korenju (Kastelic Švab, 2016). Ker so bila živila sušena in je bila voda odstranjena, se je koncentracija snovi v njih povečala, prav tako pa tudi AOP. Poleg drugih razlogov so bile vrednosti korenja in rdeče pese zato višje, kakor pa pri naših živilih, ki smo jih kuhali v vodi.

Podobnejše vrednosti našim živilom pa so imeli vzorci iz raziskave, v kateri so določali AOP zelišč. Ugotovili so, da ima bezeg vrednost AOP 1,1 $mmol_{DPPH}$/L, materina dušica pa 4,0 $mmol_{DPPH}$/L (Pregelj, 2009).

2.3 ANTIOKSIDANTI

Naloga antioksidantov je zaustaviti škodljivo delovanje prostih kisikovih radikalov, tako da radikalom oddajajo elektrone, sami pa ne postanejo novi prosti radikali in verižna reakcija se tako prekine. Pravimo, da proste radikale nevtralizirajo in tako zaščitijo naše telo in celice (Abramovič, 2011).

Antioksidanti so združeni v antioksidativni sistem, katerega temelj so beljakovine, ki sestavljajo sistem antioksidativnih encimov. Poleg njih ščitijo telo tudi mikroelementi, vitamini in nekatere druge snovi. Antioksidantov je torej več vrst, vendar so med seboj neločljivo povezani, vsi pa so sestavine hrane. Dodatek posameznih antioksidantov, kot so vitamin C, vitamin E, kompleks

karotenoidnih snovi in selen uspešno delujejo le skupaj, zato pri zdravljenju bolezni uživamo sadje in zelenjavo kot kompleks teh antioksidativnih snovi. V človekovo prehrano je antioksidante torej treba vključevati kar se da pogosto, najbolje pri vsakem obroku (Merljak in Koman, 2008: str. 30, 31).

Antioksidanti so zelo heterogena skupina snovi, ki jih delimo po različnih kriterijih: glede na izvor, strukturo, fizikalno-kemijske lastnosti, mehanizem delovanja in glede na možnost obnavljanja (Schoss in Mravljak, 2023).

Glede na delovanje jih razvrščamo v tri skupine. V prvo skupino sodijo pravi (primarni) antioksidanti, ki vežejo proste radikale, v drugi skupini so reducenti, v tretji skupini pa sinergisti (sekundarni antioksidanti), ki povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine. Poznamo antioksidante naravnega izvora (fenolne kisline, flavonoidi, karotenoidi, stilbeni, kumarini, lignani in tanini) in antioksidante sinteznega izvora (BHA, BHT) (Korošec, 2000).

2.3.1 Prosti radikali

Kemično so prosti radikali majhni, zelo reaktivni atomi in molekule. Nastajajo lahko kot rezultat normalne celične presnove in kot posledica dejavnikov iz okolja. Ti so lahko UV in gama žarki, temperatura, kajenje, onesnaževanje okolja ali celo nekatera zdravila. Takoj reagirajo z molekulami v bližini, naj so to strukture celične membrane, molekule DNA ali antioksidanti (Merljak in Koman, 2008: str. 30). Velika količina prostih radikalov v telesu povzroča poškodbe celičnih struktur, staranje in mutacije celic, kar privede do bolezni srca in ožilja, bolezni sklepov in vse vrste rakavih obolenj. Vzrok teh težav je težnja k tem, da bi dosegle stabilno stanje elektronskega para in zato zelo hitro reagirajo. Posledice so poškodbe tkiv, ki so opazne tudi navzven (Abramovič, 2011).

2.4 DIETE

Živeti zdravo zahteva kar nekaj potrpljenja in razumevanja. Uravnotežena prehrana pa lahko pripomore k zdravemu življenju. Raznolike diete niso preproste in na posameznika lahko vplivajo drugače, zato se moramo držati tiste prehrane, ki nam ustreza. Paziti pa moramo, da je le-ta tudi zdrava, varna in raznolika. Obstaja mnogo diet, mi pa smo si za primerjanje izbrali beljakovinska živila veganske in mesne ali keto diete.

Veganska dieta je način prehranjevanja, ki vključuje samo prehrano v obliki uživanja rastlin in rastlinskih izdelkov. To pomeni, da vegani ne uživajo mesa, mlečnih izdelkov, jajc ali katerih koli drugih živalskih proizvodov. Veganska prehrana je bogata z zelenjavo, žitaricami, oreščki, sadjem in drugo rastlinsko hrano. Vegani dobijo večino potrebnih hranil na raznolik in uravnotežen način. Pri veganski prehrani pa se lahko soočimo s pomanjkanjem vitamina B_{12}, ki ga mesna prehrana vsebuje v obilju.

Veganska prehrana vključuje pogosto tudi kvasne kosmiče, ki so pomemben vir vitaminov B kompleksa, in gobe. Še posebej gobe npr. šampinjone, ki jih dodatno sončijo in s tem zagotavljajo več vitamina D. Študije v eni od raziskav (https://lacna-bucka.com/post/vitamin-d-in-soncenje-gob/) pri analizi gob so pokazale, da so gobe (šampinjoni) pred sončenjem vsebovale 0,5 µg, po sončenju (nekaj več kot 15 min sončnega dne) pa 25 µg vitamina D2 v 100 g gob. V naravi nabrane gobe vsebujejo do 60 µg vitamina D2 v 100 g gob, kar je dovolj za potrebe telesa, ki štiri dni ni bilo izpostavljeno soncu. Nekateri redki proizvajalci, gobe pred rezanjem in prodajo osvetlijo z UV-svetlobo, da spodbudijo nastajanje vitamina D2 (Kreft, Lačna Bučka https://lacna-bucka.com/post/vitamin-d-in-soncenje-gob/, 23. 2. 2024).

Mesna ali keto dieta predstavlja način prehranjevanja, ki temelji predvsem na uživanju mesa. Mesna dieta je bogata z beljakovinami, a z minimalnim oz. skoraj ničelnim vnosom ogljikovih hidratov. Mesna dieta je lahko koristna za vzdrževanje telesne teže, vendar je pomembno upoštevati, da nekateri mesni produkti vsebujejo nasičene maščobe, ki lahko povečajo raven holesterola v krvi.

Obe dieti imata svoje prednosti in slabosti, zato je pomembno, da se posameznik s prehranskim strokovnjakom odloči za dieto, ki najbolje ustreza njegovim prehranskim potrebam in življenjskemu slogu. Uravnotežena prehrana pa je ravno pomembna, ker je raznovrstna in z njo zaužijemo dovolj potrebnih hranilnih in esencialnih snovi (https://core.ac.uk/download/pdf/189140824.pdf, 13. 2. 2024).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

Eksperimentalni del zajema metode dela kemijskih in kemijsko-instrumentalnih analiz za določanje AOP v živilih.

3.1 PRIPRAVA REAGENTOV IN EKSTRAKTOV

3.1.1 Priprava 3% metafosforne kisline $(HPO_3)_3$

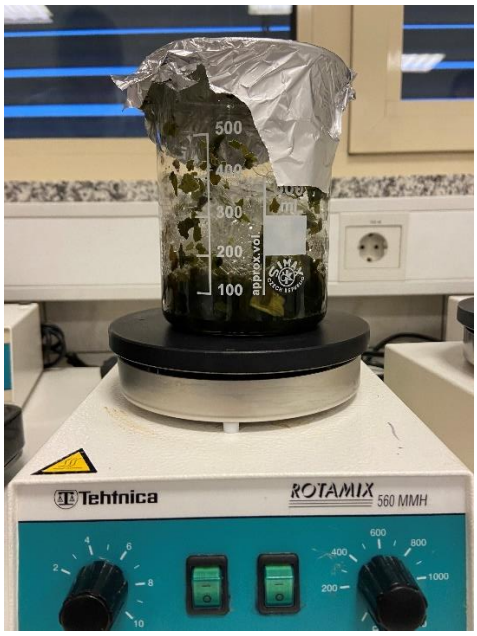
3% metafosforno kislino smo pripravili tako, da smo 30 g metafosforne kisline v obliki kristalov zatehtali v 1000 mL čašo in dodali 970 mL destilirane vode. Raztopino smo mešali na magnetnem mešalu pol ure. Nato smo raztopino prelili v 1000 ml reagenčno stekleničko in jo zaprto shranili v hladilniku do uporabe (slika 1).

Slika 1: Pripravljena 3% vodna raztopina metafosforne kisline (Foto: S. Meze, 13. 12. 2023)

3.1.2 Ekstrakcija vzorcev hrane s 3% vodno raztopino metafosforne kisline (MFK)

Za postopek ekstrakcije smo v epruvete zatehtali 1 g ± 0,1 g vzorca hrane, ki smo ga terirali na čim manjše kose (slika 3) in dodali 10 mL 3% $(HPO_3)_3$ (slika 4). Vzorce v epruvetah smo premešali na vibromiksu, da bi se delci hrane čim bolje zmešali z raztopino. Vzorce smo med drugim delili na surove in kuhane, zato smo slednje skuhali v vodi na magnetnem mešalu (slika 2), kot bi naredili pri običajni pripravi hrane. Za vsak vzorec posebej smo pripravili po tri epruvete in jih nato shranili v zamrzovalniku na –20 °C.

Naslednji dan smo vzorce odmrznili v čaši s toplo (ne vročo) vodo in jih ponovno premešali na vibromiksu. Vsak vzorec smo s kapalko prelili v tri 2 mL epice ter jih tako pripravili za centrifugiranje in mikrofiltracijo.



Slika 2: Kuhanje alg na magnetnem mešalu (Foto: S. Meze, 13. 12. 2023)

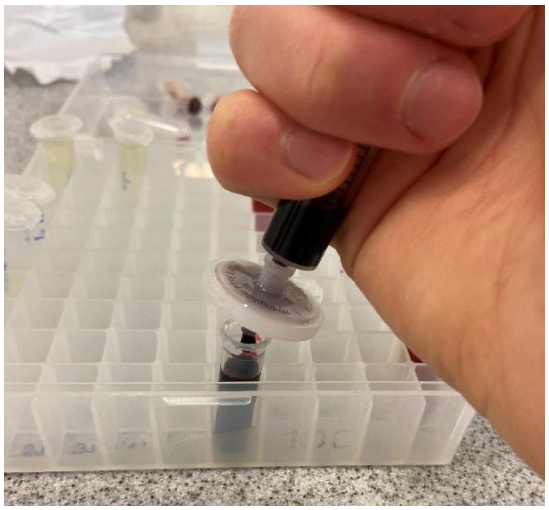
Slika 3: Teriranje surovih in kuhanih alg (Foto: S. Meze, 13. 12. 2023)

Slika 4: Priprava vzorcev v epruvetah z raztopino metafosforne kisline (Foto: M. Ruparčič, 13. 12. 2023)

Vzorce smo centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi na 1300 obratih/min (slika 5) in nato mikrofiltrirali tako, da smo supernatant odpipetirali v brizgo skozi filter z velikostjo por 0,45 µm (slika 6 in 7) v nove 2 mL epice. Vzorce ekstraktov smo med analizami shranjevali pri –20 °C.

Slika 5: Centrifugiranje vzorcev (Foto: S. Meze, 3. 1. 2024)

Slika 6: Mikrofilter (Foto: S. Meze, 3. 1. 2024)



Slika 7: Mikrofiltriranje vzorca surovih acai jagod s pomočjo brizge (Foto: S. Meze, 3. 1. 2024)

3.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA Z RADIKALOM DPPH•

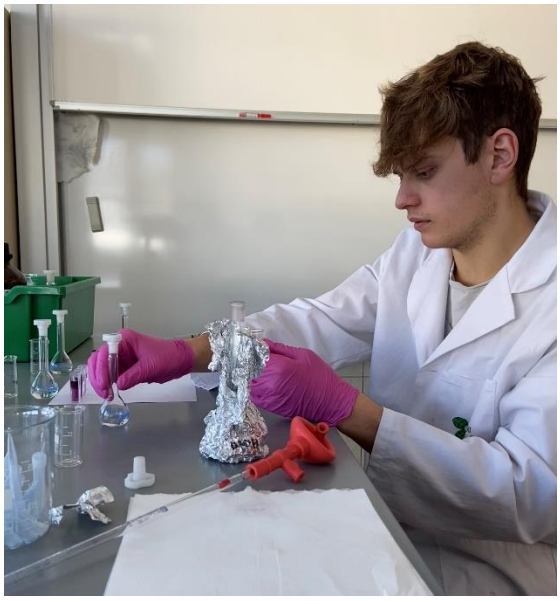
DPPH• je stabilen dušikov radikal, ki reagira z antioksidanti. Pri reakciji se tvori reducirana oblika $DPPH_2$, kar povzroči spremembo barve iz vijolične v rumeno (Kastelic Švab, 2016). Večje je razbarvanje radikala, nižja je absorbanca in tako večji antioksidativni potencial. Absorbanco smo merili s spektrofotometrom UV-1201 pri valovni dolžini 517 nm.

Material:

- 1,1 -difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•)
- metanol
- Trolox (sintetični vitamin E)
- spektrofotometer UV-1201

3.2.1 Priprava DPPH• v metanolu

V erlenmajerico smo zatehtali 4,0 mg oz. 0,004 g radikala DPPH• in dolili 40 mL metanola. Ker nismo imeli ultrazvočne kopeli in smo ugotovili, da se radikal zelo dobro topi, smo raztopino približno 10 minut mešali ročno. Raztopino DPPH• smo vsak dan pripravili na novo (slika 8), saj je DPPH• na svetlobi nestabilen. Zaradi istega razloga smo erlenmajerico z raztopino vedno ovili v aluminijasto folijo. Ves material in reagente smo ob koncu dela v laboratoriju vedno shranili v digestoriju.



Slika 8: Priprava DPPH• raztopine v metanolu (Foto: S. Meze, 23. 1. 2024)

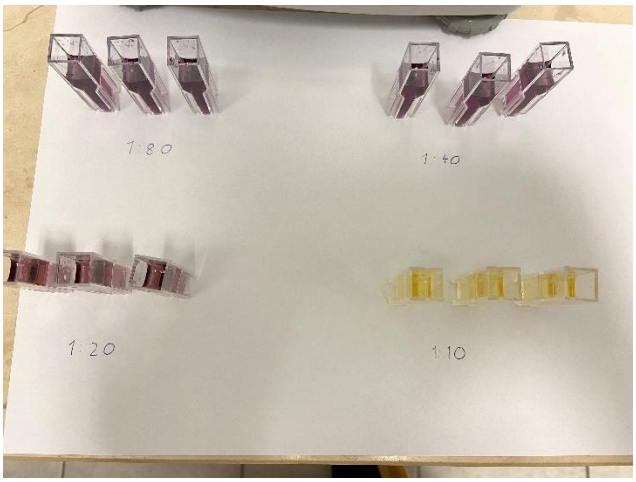
3.2.2 Priprava umeritvene krivulje s Troloxom

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili štiri koncentracije Troloxa v razponu od 0,0175 mg/mL do 0,14 mg/mL (tabela 1). Za prvo razredčitev smo v 25 mL bučko zatehtali 1,4 mg Troloxa (slika 9) in odpipetirali 10 mL metanola. Za vsako naslednjo razredčitev smo iz bučke s prejšnjo razredčitvijo odpipetirali 5 mL tekočine in dodali 5 mL metanola (slika 10).

Trolox je sintetična oblika vitamina E in se je uveljavil kot primerjalni antioksidant (Kač in Vidrih, 2000).

Slika 9: Zatehtana količina Troloxa (Foto: S. Meze, 19. 1. 2024)

Slika 10: Narejene razredčitve Troloxa (Foto: S. Meze, 19. 1. 2024)



Slika 11: Paralelke z dodanim DPPH• različnih razredčitev Troloxa (levo zgoraj koncentracija z najmanj Troloxa (1:80), spodaj desno koncentracija raztopine z največ Troloxa (1:10)) (Foto: M. Ruparčič, 23. 1. 2024)

Tabela 1: Prikaz redčenja za umeritveno krivuljo s Troloxom

Točka	**Faktor redčenja**	**ɣ (mg Trolox/mL)**
1	1:80	0,0175
2	1:40	0,035
3	1:20	0,07
4	1:10	0,14

Meritve za umeritveno krivuljo (graf 1) smo izvedli v 3 paralelkah v 1,5 ml kivetah.

RF (referenčni vzorec) = 60 µL MeOH + 1,5 mL DPPH•

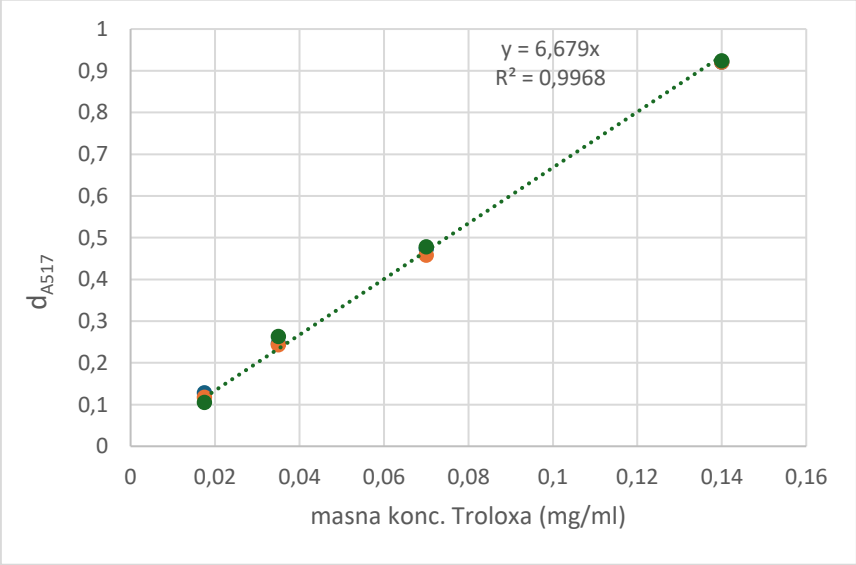
SP (slepi vzorec) = 60 µL Trolox raztopine + 1,5 mL MeOH

3 paralelke = 60 µL Trolox raztopine + 1,5 mL DPPH•

Kivete smo pustili čakati od 15 minut do pol ure (slika 11) in nato na spektrofotometru izmerili absorbanco (A) pri valovni dolžini 517 nm (slika 12). Referenčni vzorec smo pripravili v območju A okoli 1,000. Če je bila vrednost večja od 1,000 smo dodajali metanol, da smo se čim bolj približali A = 1,000 (Kastelic Švab, 2016). Nadalje smo z umerjenim RF merili absorbanco SP in absorbanco treh paralelk vzorcev redčenj raztopin Troloxa v 1,5 mL kivetah.

Spektrofotometer je inštrument, s katerim določamo vrednosti absorbanc. Princip delovanja spektrofotometra temelji na selektivni absorbciji svetlobe snovi. Deluje tako, da primerja delež svetlobe, ki preide skozi referenčno raztopino in skozi merjen vzorec. Ko svetloba potuje skozi vzorec, se je del pri tem absorbira, prepuščena svetloba pa pride do detektorja (http://si.gnscomponent.com/info/working-principle-and-characteristics-of-spect-80107481.html).

Slika 12: Šolski spektrofotometer UV-1201



Graf 1: Umeritvena krivulja, absorbanca v odvisnosti od masne koncentracije Troloxa

3.2.3 Eksperimentalni postopek določanja AOP vzorcev

Z vsako na novo pripravljeno raztopino DPPH•, smo ponovno umerili referenčni vzorec. Zaradi pojava oborine smo nekatere vzorce prelili v epice in jih ponovno mikrofiltrirali in centrifugirali 5 minut na 14000 obratov/min. Vzorce smo ponovno prelili v kivete (slika 13), ter jim po približno 15 minutah izmerili absorbanco (slika 14, 15, 16).

RF (referenčni vzorec) = 60 µL MeOH + 1,5 mL DPPH•

SP (slepi vzorec) = 60 µL vzorca + 1,5 mL MeOH

VZ (vzorec; 3 paralelke) = 60 µL vzorca + 1,5 mL DPPH•

Slika 13: Polnjenje kivete z raztopino DPPH• (Foto: S. Meze, 23. 1. 2024)

3.2.4 Izračun AOP

AOP vzorcev smo izračunali s pomočjo spodnje enačbe (Kastelic Švab, 2016).

$dA = A_{RF} - A_{VZ} + A_{SP}$

dA = razlike v izmerjenih absorbancah

A_{RF} = absorbanca referenčnega vzorca

A_{VZ} = absorbanca vzorca po reakciji z reagentom DPPH•

A_{SP} = absorbanca slepega vzorca

$n = dA \times V_{reakcijske\ zmesi}/(\varepsilon \times l)$

n = množina radikala DPPH•, ki reagira z antioksidanti v reakcijski zmesi

ε = molarni ekstinkcijski koeficient DPPH = 12000 (L/ (mol × cm))

$V_{reakcijske\ zmesi}$ = volumen reagentov in vzorca (0,00156 L)

l = dolžina kivete oz. poti žarka skozi vzorec = 1 cm

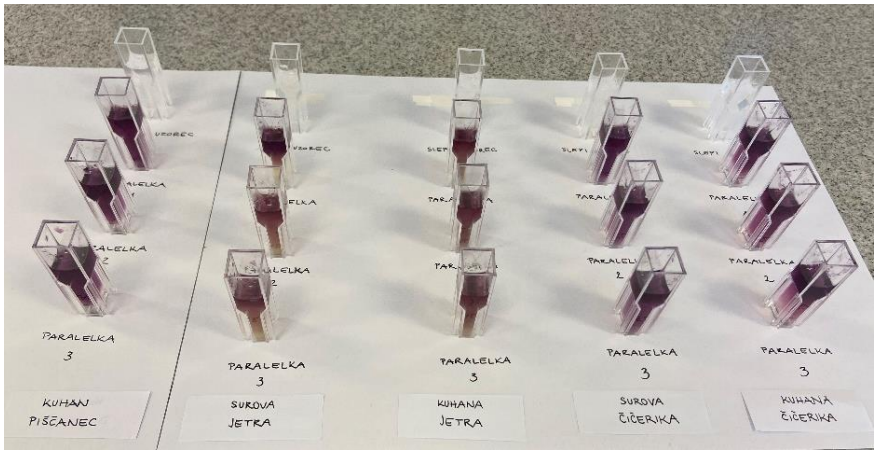
$AOP(mmol_{DPPH}/L) = n/V_{vzorca}$

AOP = antioksidativni potencial

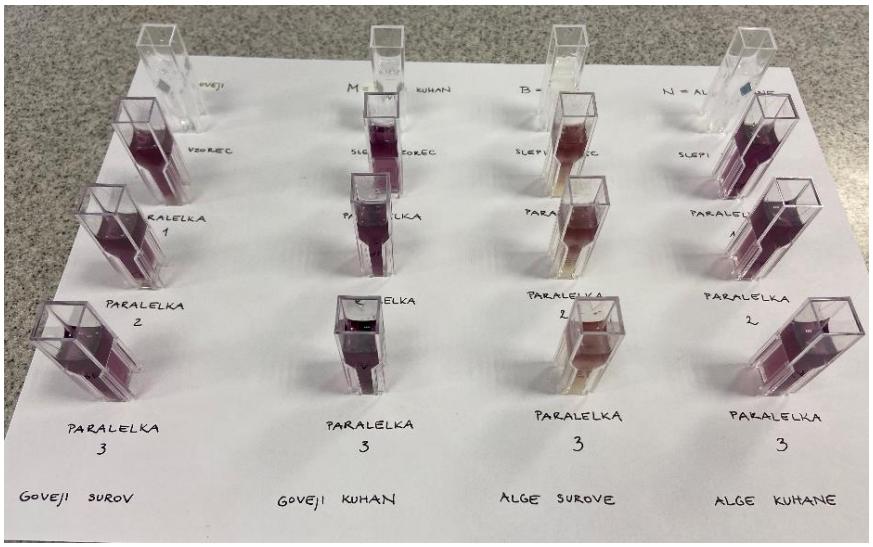
V_{vzorca} = volumen vzorca, uporabljenega pri analizi ($60 \cdot 10^{-6}$L)

m_{vzorca} = masa zatehtanega vzorca = 1 g ± 0,1 g

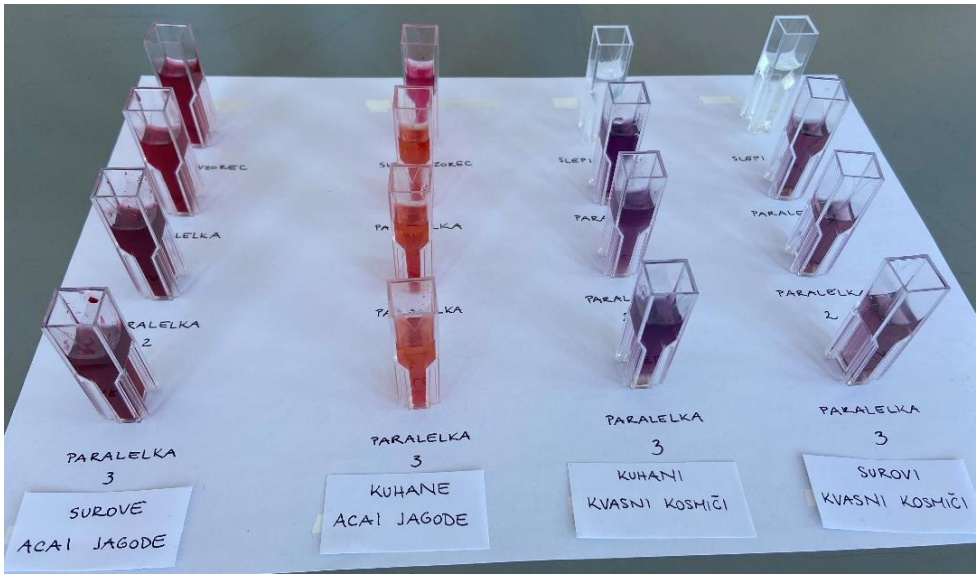
Rezultate vrednosti AOP smo izračunali na enoto $mmol_{DPPH}/L$.



Slika 14: Vzorci kuhanega piščanca, jeter in čičerike pripravljeni za spektrofotometrijo (Foto: S. Meze, 31. 1. 2024)



Slika 15: Vzorci govejega mesa in alg pripravljeni za spektrofotometrijo (Foto: J. Rozman, 24. 1. 2024)



Slika 16: Vzorci acai jagod in kvasnih kosmičev pripravljeni na spektrofotometrijo (Foto: S Meze, 29. 1. 2024)

4 REZULTATI

V sklopu raziskave smo analizirali 72 vzorcev, od tega 12 različnih vrst živil (kuhano, surovo) s po trema paralelkama. Za vse vzorce smo opravili kemijsko-instrumentalno analizo določanja AOP z radikalom DPPH• s pomočjo spektrofotometra. Rezultate smo podali v tabelo 2.

S spektrofotometrijo smo izmerili absorbance vzorcev, ki jih prikazuje tabela 2. Najnižje absorbance in s tem najvišji AOP so pokazali vzorci surovih alg, surovih kvasnih kosmičev, surovih in kuhanih govejih jeter ter AOP vrednosti najvišje med njimi kuhane acai jagode. Najbolj so nas presenetile vrednosti vzorcev govejih jeter, saj se nam zdi, da meso že na splošno redko omenjamo v povezavi z antioksidanti, goveja jetra pa so z vrednostmi AOP presegla tudi večino rastlinskih beljakovinskih vzorcev.

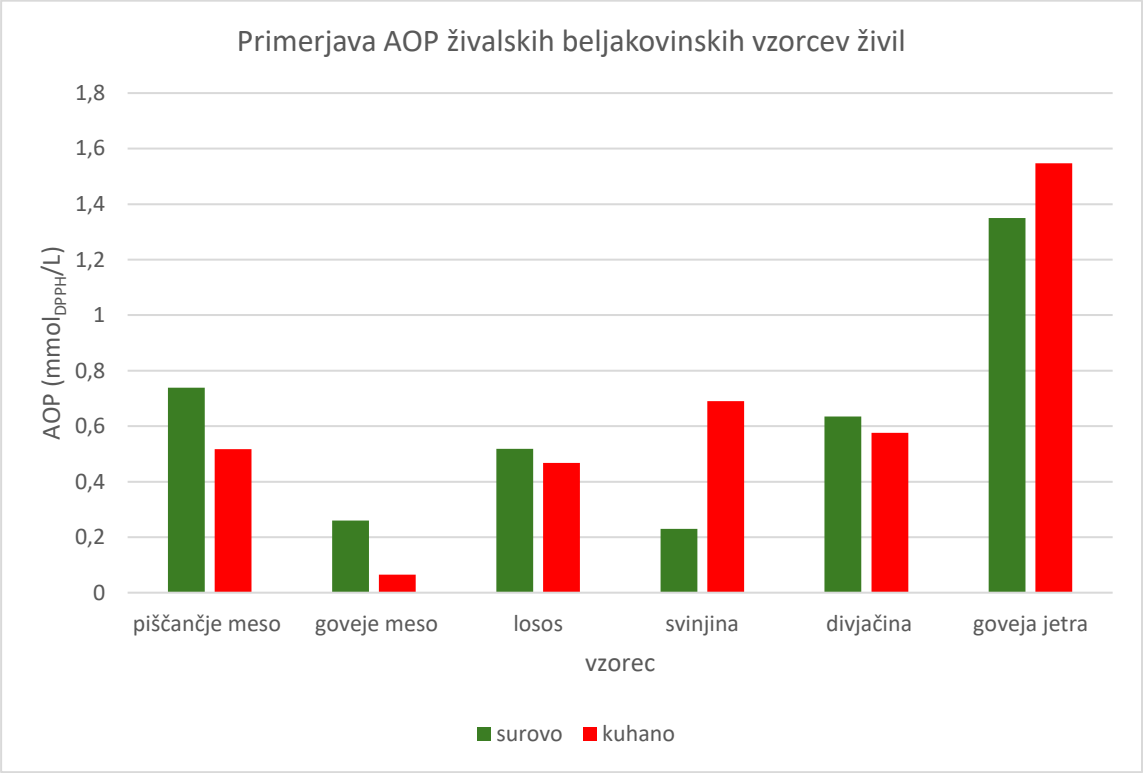
Tabela 2: Vrednosti absorbanc in AOP vzorcev izbranih živil

ŠTEVILO VZORCA	VRSTA ŽIVILA	PARALELKE A_{VZ}	SLEPI VZOREC A_{SP}	REFERENČNI VZOREC A_{RF}	VREDNOST AOP ($mmol_{DPPH}/L$)
1.	kuhane acai jagode	1: 0,506 2: 0,584 3: 0,504	0,563	0,996	2,23
2.	kuhana goveja jetra	1: 0,355 2: 0,349 3: 0,339	0,067	0,994	1,55
3.	surovi kvasni kosmiči	1: 0,380 2: 0,370 3: 0,355	0,062	0,996	1,49
4.	surove alge	1: 0,388 2: 0,365 3: 0,397	0,062	0,945	1,39
5.	surova goveja jetra	1: 0,421 2: 0,447 3: 0,442	0,068	0,994	1,35

ŠTEVILO VZORCA	VRSTA ŽIVILA	PARALELKE A_{VZ}	SLEPI VZOREC A_{SP}	REFERENČNI VZOREC A_{RF}	VREDNOST AOP ($mmol_{DPPH}/L$)
6.	surov fižol	1: 0,708 2: 0,842 3: 0,548	0,283	0,996	1,26
7.	kuhan fižol	1: 0,669 2: 0,686 3: 0,678	0,167	0,996	1,05
8.	surov piščanec	1: 0,677 2: 0,684 3: 0,673	0,074	0,945	0,74
9.	kuhana svinjina	1: 0,785 2: 0,921 3: 0,802	0,160	0,996	0,69
10.	surova divjačina	1: 0,820 2: 0,779 3: 0,784	0,093	0,994	0,635
11.	kuhana divjačina	1: 0,834 2: 0,856 3: 0,871	0,126	0,994	0,58
12.	surova čičerika	1: 0,785 2: 0,780 3: 0,861	0,065	0,994	0,54
13.	surov losos	1: 0,863 2: 0,923 3: 0,883	0,135	0,994	0,518
14.	kuhan piščanec	1: 0,993 2: 0,914 3: 0,924	0,188	0,994	0,517

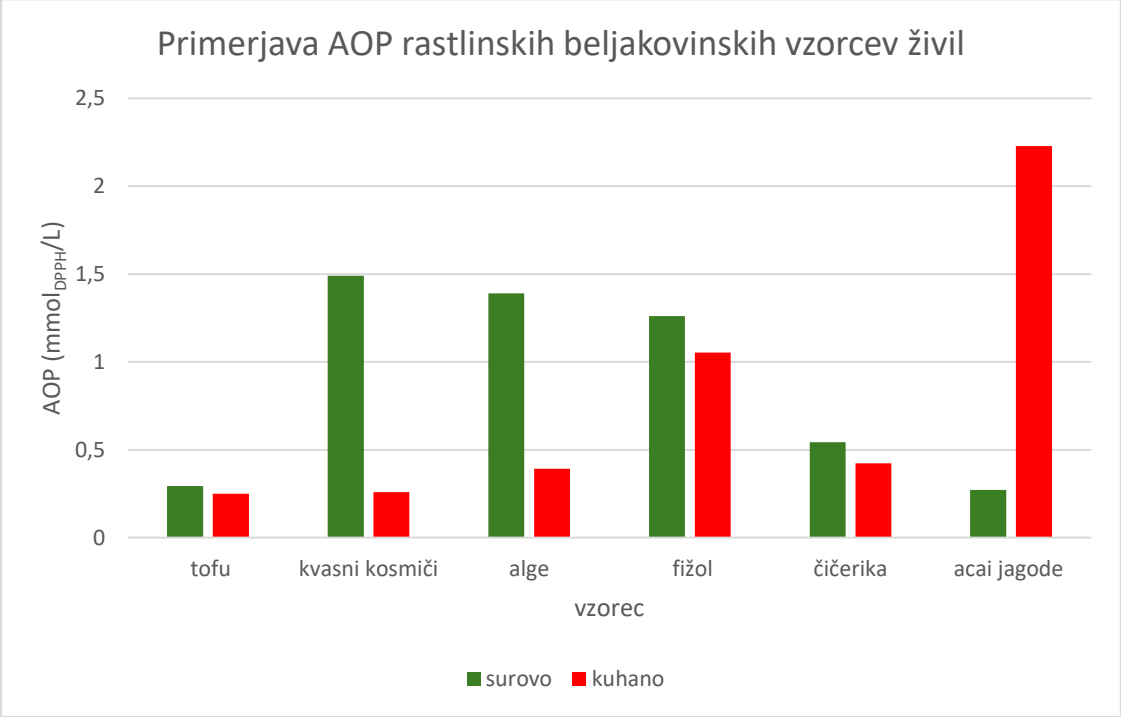
ŠTEVILO VZORCA	VRSTA ŽIVILA	PARALELKE A_{VZ}	SLEPI VZOREC A_{SP}	REFERENČNI VZOREC A_{RF}	VREDNOST AOP ($mmol_{DPPH}/L$)
15.	kuhan losos	1: 0,832 2: 0,855 3: 0,838	0,064	0,994	0,47
16.	kuhana čičerika	1: 0,879 2: 0,866 3: 0,901	0,083	0,994	0,42
17.	kuhane alge	1: 0,753 2: 0,968 3: 0,957	0,160	0,838	0,39
18.	surov tofu	1: 0,786 2: 0,748 3: 0,776	0,067	0,838	0,29
19.	surove acai jagode	1: 2,737 2: 3,436 3: 3,135	2,232	0,996	0,27
20.	surovo goveje meso	1: 1,090 2: 0,757 3: 0,803	0,062	0,838	0,26
21.	kuhani kvasni kosmiči	1: 0,817 2: 0,888 3: 0,916	0,236	0,996	0,26
22.	kuhan tofu	1: 0,797 2: 0,775 3: 0,795	0,067	0,838	0,25
23.	surova svinjina	1: 0,789 2: 0,820 3: 0,786	0,066	0,838	0,23
24.	kuhano goveje meso	1: 0,925 2: 0,931 3: 0,752	0,061	0,838	0,065

Iz tabele 2 lahko torej razvidimo, da imajo najvišjo vrednost AOP kuhane acai jagode, najnižjo pa kuhano goveje meso. Najmanjša razlika med kuhanim in surovim vzorcem istega živila je pri govejih jetrih in fižolu. Višje so vrednosti absorbanc pri paralelkah, nižji je AOP vzorca živila, in obratno.



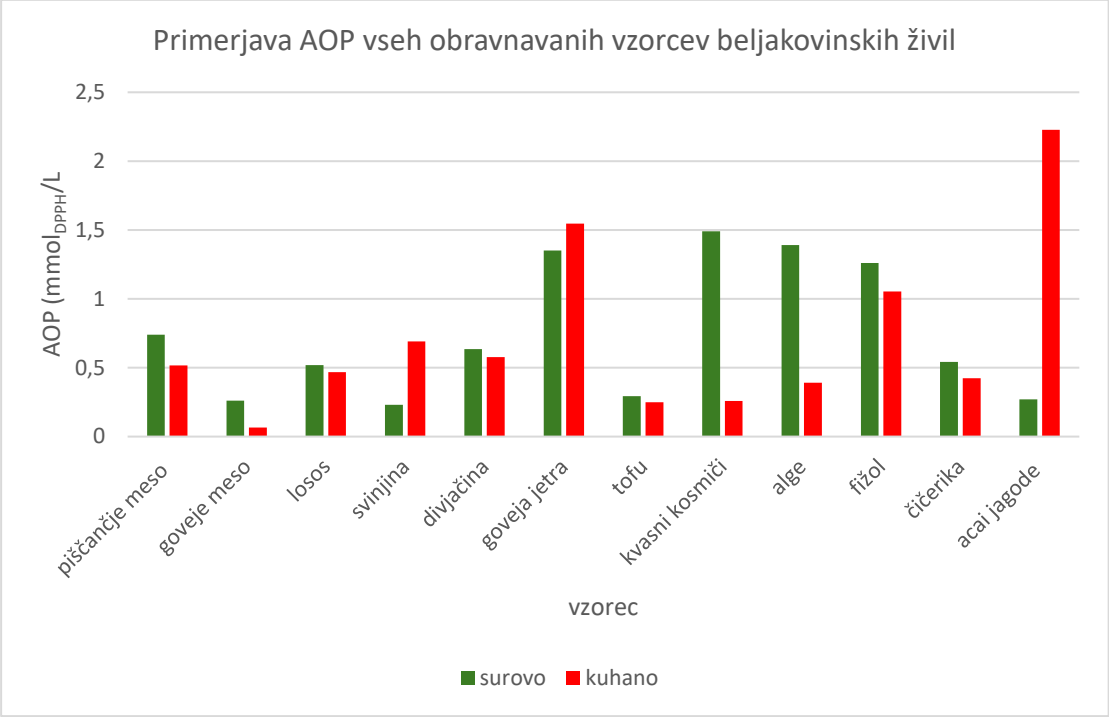
Graf 2: Primerjava AOP živalskih beljakovinskih vzorcev živil (surovo, kuhano)

Na grafu 2 so prikazane vrednosti AOP surovih (zelena barva) in kuhanih (rdeča barva) živalskih beljakovinskih vzorcev živil. Razberemo lahko, da imata najvišje vrednosti AOP vzorca kuhanih in surovih govejih jeter. Zelo podobni vrednosti surovo/ kuhano imata vzorca divjačine in lososa. Najnižjo vrednost AOP ima kuhan vzorec govejega mesa, med surovimi vzorci pa svinjina. Toplotna obdelava je zvišala koncentracijo AOP pri vzorcu svinjine in govejih jeter, pri ostalih vzorcih pa znižala. Toplotna obdelava ni zelo vplivala na vzorca divjačine in lososa. Pri svinjini pa je toplotna obdelava pozitivno vplivala na koncentracijo AOP. Največji negativni vpliv je imela toplotna obdelava pri piščančjem in govejem mesu, kjer so razlike v vrednostih AOP med surovim in kuhanim mesom večje v prid surovo pripravljenega vzorca mesa.



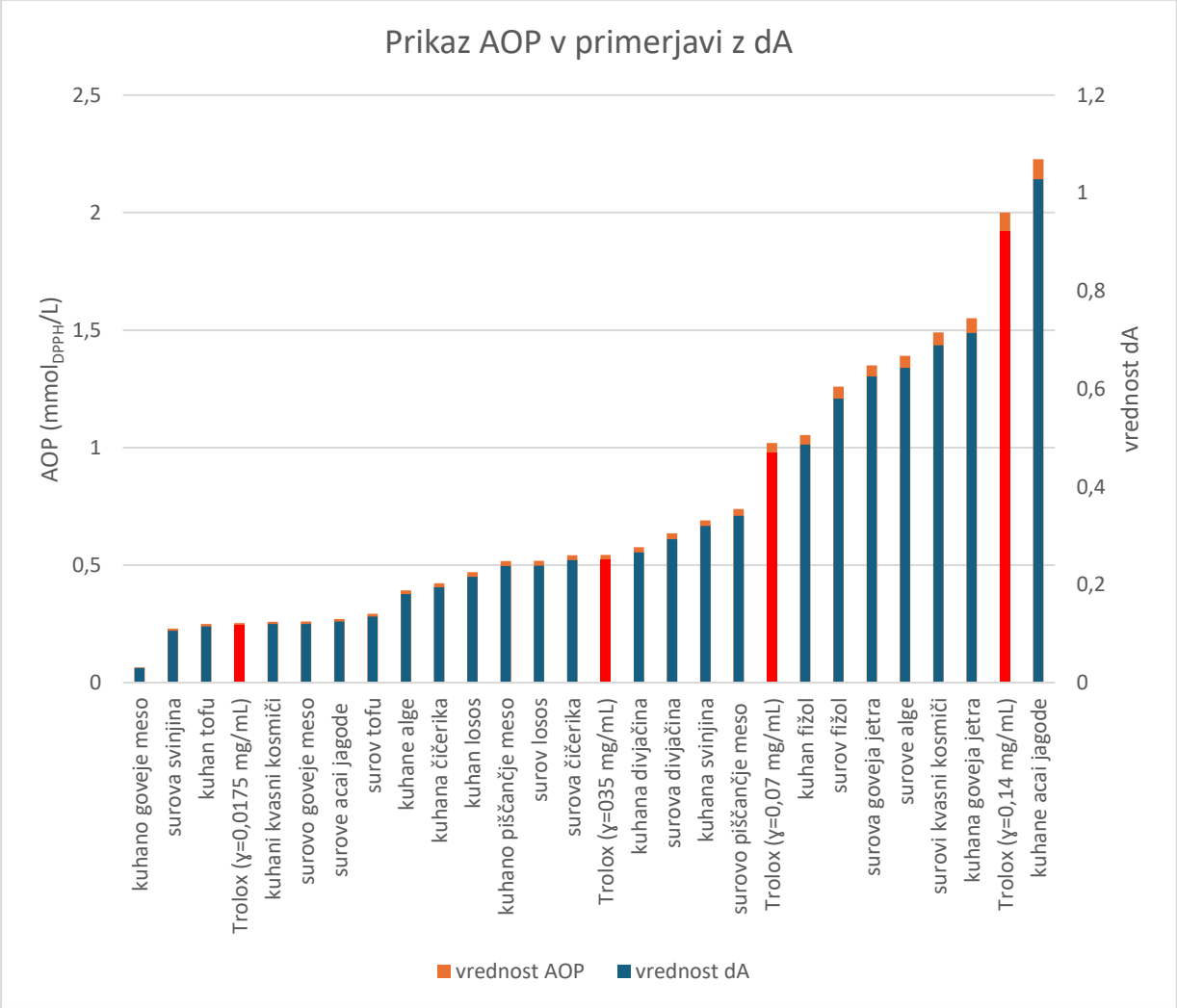
Graf 3: Primerjava AOP rastlinskih beljakovinskih vzorcev živil (surovo, kuhano)

Na grafu 3 so prikazane vrednosti AOP surovih (zelena barva) in kuhanih (rdeča barva) rastlinskih beljakovinskih vzorcev živil. Najvišjo vrednost AOP imajo kuhane acai jagode. Po vrednostih so si zelo blizu surovi vzorci alg, kvasnih kosmičev in fižola. Najnižji AOP na prikazanem grafu ima vrednost pri vzorcu kuhanega tofuja. Nizka vrednost AOP pri vzorcu surovih acai jagod, je posledica prevelike koncentracije rdečega barvila v vzorcu. Zaradi tega smo pri merjenju s spektrofotometrom izmerili višjo vrednost absorbance kot, če bi bil vzorec brez tako intenzivne obarvanosti. Temu bi se lahko izognili z uporabo drugačne metode priprave vzorca. Pri vzorcih tofuja, fižola in čičerike toplotna obdelava ni tako zelo vplivala na znižanje koncentracijo AOP, kot je pri kvasnih kosmičih in algah. Pri vseh vzorcih je toplotna obdelava znižala vrednosti AOP, razen pri acai jagodah, ki nimajo pravilne vrednosti AOP zaradi zgoraj navedenega problema.



Graf 4: Primerjava AOP vseh obravnavanih vzorcev beljakovinskih živil (surovo, kuhano)

Na grafu 4 so prikazane vrednosti AOP surovih (zelena barva) in kuhanih (rdeča barva) živalskih ter rastlinskih beljakovinskih vzorcev živil. Najvišjo vrednost AOP izmed vseh vzorcev imajo kuhane acai jagode, sledi jim vzorec kuhanih govejih jeter. Najnižjo vrednost AOP ima vzorec kuhanega govejega mesa. Kot omenjeno pod grafom primerjave AOP rastlinskih beljakovinskih vzorcev živil acai jagode nimajo pravilne vrednosti AOP. Toplotna obdelava je pozitivno vplivala na zvišanje AOP pri svinjini in govejih jetrih, pri surovih acai jagodah pa rezultati niso verodostojni zaradi napisanega. Negativen vpliv je toplotna obdelava imela pri vseh vzorcih, razen pri svinjini in govejih jetrih. Manjši vpliv nižje koncentracije AOP je toplotna obdelava imela pri lososu, divjačini, tofuju in čičeriki.



Graf 5: Prikaz AOP v primerjavi z dA

Graf 5 prikazuje vrednosti AOP v primerjavi z dA od najnižje do najvišje vrednosti surovih in kuhanih vzorcev živil. V grafu 5 so prikazane tudi vrednosti Troloxa (obarvane z rdečo) z masnimi koncentracijami za primerjavo.

Iz prikaza lahko razberemo, da dA in AOP vrednosti premo sorazmerno naraščajo. Najvišjo vrednost dA vzorec kuhanih acai jagod, najmanjšo pa vzorec kuhanega govejega mesa. Trolox ima najvišjo koncentracijo AOP pri masni koncentraciji 0,14 mg/ml.

Na grafu 5 imajo najvišji AOP kuhane acai jagode, takoj za njimi kuhana jetra, surovi kvasni kosmiči, surove alge, surova goveja jetra, surov fižol in kuhan fižol. Najnižji AOP je pri kuhanem govejem mesu. Približno enake vrednosti AOP imajo piščančje meso in divjačina, kuhan in surov tofu ter kuhan in surov losos. Rastlinska beljakovinska živila imajo v večini višji AOP kot živalski vzorci hrane, razen govejih jeter, ki imajo poleg acai jagod najvišje vrednosti AOP. Surovi vzorci imajo večinoma višji AOP kot vsi kuhani izbrani vzorci beljakovinskih živil.

5 RAZPRAVA

Cilj raziskave je bil določiti in primerjati antioksidativni potencial beljakovinskih živil rastlinske in živalske hrane. Antioksidanti so pomembni za zdravje, saj preprečujejo oksidacijo prostih radikalov in tako ščitijo naše telo pred srčnimi in rakavimi obolenji. Za primerjavo smo si izbrali dvanajst različnih živil, surove in kuhane priprave, ki so se nam na podlagi literature zdela najbolj zanimiva in naj bi se najbolj pogosto uporabljala v veganskih in keto dietah. To so tofu, kvasni kosmiči, alge Wakame, fižol, čičerika, acai jagode, piščančje, goveje in svinjsko meso, losos, divjačina ter goveja jetra.

Poleg zanimanja za ugotavljanje antioksidativnih potencialov živil, smo se za nalogo odločili, da bi spoznali metodo določanja vrednosti AOP, s katero se v preteklosti še nismo seznanili. Metodo smo najprej teoretično dobro preučili in jo nato uporabili v raziskovalni nalogi.

Za pridobitev rezultatov smo uporabili metode ekstrakcije s 3% metafosforno kislino, mikrofiltracije, centrifugiranja in spektrofotometrije. Pri pripravi 3% metafosforne kisline smo kislino v kristalih mešali na magnetnem mešalu, vendar brez segrevanja. Vzorce smo najprej zmleli na čim manjše delce v terilnici, kar nam je pri surovem fižolu, čičeriki, piščančjem mesu in kuhanih algah povzročalo malo težav. Živila smo težko dobro zdrobili, zaradi njihove strukture. Vzorce v epruvetah smo shranjevali v zmrzovalniku na –20 °C. Imeli smo nekaj težav z odmrzovanjem vzorcev, ko nam je pri odmrzovanju s toplo (ne vročo) vodo počila epruveta tofuja, zaradi prevelike temperaturne razlike. Vzorce smo nato prelili v epice in jih centrifugirali ter mikrofiltrirali s pomočjo brizge, ki se pritrdi na filter. Pri pripravi DPPH• v metanolu smo raztopino mešali ročno, saj nismo imeli prave ultrazvočne kopeli. To nam ni predstavljalo posebnega problema, saj se je radikal zelo dobro topil. Ves material in reagente smo med delom shranjevali v digestoriju. Pred spektrofotometrijo smo temeljito preučili navodila za uporabo spektrofotometra. Pri merjenju absorbance s spektofotometrom smo imeli največ težav z oborino, ki se je v kivetah pojavila pri algah, acai jagodah, lososu, piščancu in kvasnih kosmičih. Oborine smo se znebili s ponovnim centrifugiranjem. Pri vzorcu surovih acai jagod smo naleteli na težavo, saj se njihova močna rdeča barva pri reakciji z raztopino DPPH• ni razbarvala in so bile absorbance zelo visoke. Težavo bi pri nadaljnjih raziskovanjih verjetno lahko odpravili z dodatnimi postopki in metodami ločevanja.

Z dobljenimi rezultati smo živilom izračunali vrednosti AOP, ki nam pove skupno koncentracijo antioksidantov v živilu. Ti so zelo pomembni za zdravje, zato smo iskali živila, ki jih v veganski in keto dieti največ uživamo. Z grafičnih prikazov lahko razberemo, da imajo kuhane acai jagode najvišji AOP med vsemi vzorci, z vrednostjo 2,23 $mmol_{DPPH}/L$. Če želimo v svojo

prehrano vključiti več izdelkov živalskega izvora, na podlagi rezultatov priporočamo piščančje meso, ali pa še bolje, goveja jetra z najvišjo vrednostjo med živalskimi vzorci, tj. 1,55 $mmol_{DPPH}$/L. Med rastlinskimi vzorci so poleg kuhanih acai jagod izstopali rezultati surovih kvasnih kosmičev, alg in fižola. Po tem lahko sklepamo, da rastlinski beljakovinski vzorci po termični obdelavi v večini primerov izgubijo vsebnost antioksidantov. Na podlagi te ugotovitve lahko izpostavimo, da vsako živilo ni primerno ali potrebno pred uživanjem toplotno obdelati, če si želimo da ohrani čim več zdravilnih lastnosti.

Za vzorec acai jagod smo se odločili tekom raziskovanja, saj so zadnje čase zelo priljubljeno živilo med vegansko prehrano in na splošno zdravim načinom življenja. V literaturi smo prebrali da imajo izredne vrednosti antioksidantov, kot so antocianini ki se nahajajo v močnem rdečem barvilu živila. Prisoten je tudi antioksidant resveratrol, ki ga največ vsebuje grozdje in drugo jagodičevje. Acai jagode smo si jih želeli podrobneje raziskati, kljub temu, da vsebujejo najmanj beljakovin izmed zbranih vzorcev (9,1 g/ 100 g). Zanimivo nam je bilo, da vsebujejo tudi kar več kot 30% maščobnih kislin (https://www.futunatura.si/acai-jagode-clanek, 27. 3. 2024).

Pri eksperimentalnem delu smo skušali biti čimbolj natančni, tako pri meritvah kot pipetiranju. Pri izbiri vzorcev je potrebno paziti na nastajanje oborine, ki se je po naših izkušnjah najlažje znebimo s centrifugiranjem.

6 ZAKLJUČEK

V raziskovalni nalogi smo primerjali antioksidativni potencial rastlinske beljakovinske in živalske beljakovinske hrane. Raziskave, ki smo jih opravili so pokazale, da se AOP razlikuje med obema vrstama prehrane, ter prav tako med surovo in kuhano hrano istega testiranega vzorca. V večini primerov je pokazalo, da imajo rastlinski beljakovinski vzorci živil višjo vsebnost antioksidantov. Vzorci, ki so izstopali v posamezni prehrani so bili kuhane acai jagode, surovi kvasni kosmiči ter surov in kuhan fižol pri rastlinski. Pri živalskih beljakovinskih vzorcih živil pa še posebej kuhana in surova goveja jetra, malo manj pa surov piščanec, ki ga sicer kljub visoki vrednosti AOP ne moremo uživati brez predhodne termične obdelave, zaradi morebitne okužbe s salmonelo. Toplotna obdelava vzorcev (kuhanje v majhni količini vode) je zvišala oziroma znižala AOP določenih vzorcev. Primeri, v katerih se je AOP zvišal, so goveja jetra (1,55 $mmol_{DPPH}$/ L) , svinjina (0,69 $mmol_{DPPH}$/ L) in acai jagode (2,23 $mmol_{DPPH}$/ L) . Znižal pa se je pri piščančjem in govejem mesu, lososu, divjačini, tofuju, kvasnih kosmičih, algah, fižolu in čičeriki. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je rastlinska prehrana bolj bogata z antioksidanti in da toplotna obdelava v večini primerov izbranih vzorcev negativno vpliva na količino antioksidantov v živilu.

Pred raziskovanjem smo si na podlagi prebrane literature postavili nekaj delovnih hipotez. Domeno, da ima rastlinska beljakovinska hrana višje vsebnosti antioksidantov kot živalska, lahko potrdimo. Po pričakovanjih ima rastlinska beljakovinska hrana večinoma večji AOP kot beljakovinska hrana živalskega izvora. To lahko potrdijo rastlinski vzorci surovih alg, kuhanih acai jagod, fižola in surovih kvasnih kosmičev, ki imajo visoke vrednosti v primerjavi z živalskimi vzorci, kjer izstopajo le goveja jetra.

Na podlagi meritev in izračunov moramo zavreči hipotezo, da bo imel vzorec surovih alg Wakame približno enak AOP kot vzorec surovih acai jagod. Vzorec surovih alg se je uvrstil med živila z visokim AOP z vrednostjo 1,39 $mmol_{DPPH}$/L, medtem ko je vzorec surovih acai jagod zaradi pomanjkljivih metod ločevanja dosegel nizko vrednost 0,27 $mmol_{DPPH}$/L. Menimo, da bi vzorec surovih acai jagod pri boljšem ločevanju in razbarvanju dosegel višje vrednosti kot vzorec surovih alg, torej podobne ali celo višje kot vzorec kuhanih acai jagod.

Zavreči moramo hipotezo, da bo imel surov losos najvišji AOP med analiziranimi beljakovinskimi živili živalskega izvora. Ta ugotovitev nas je presenetila, saj v literaturi večkrat zasledimo pomembnost lososa in na splošno morske hrane v prehrani. Zdaj torej lahko sklepamo, da vsebujejo nekatere druge telesu pomembne hranilne snovi. Vzorcu surovega

lososa smo izmerili vrednost AOP 0,52 $mmol_{DPPH}$/ L. Najvišji AOP med živili živalskega izvora so imela kuhana goveja jetra z vrednostjo 1,55 mmolDPPH/L. V literaturi smo kasneje prebrali, da jetra vsebujejo veliko presnovnega produkta bilirubina, ki nastaja ob razpadu hemoglobina. Nekoč je veljal le za pokazatelja odpovedi jeter, danes pa je odkrito tudi njegovo močno antioksidativno, protivnetno in protitumorsko delovanje (https://www.rtvslo.si/rtv365/arhiv/174640194?s=tv, 27. 3. 2024).

Hipotezo, da termična obdelava zniža antioksidativni potencial lahko delno potrdimo. Tako se je izkazalo le pri rastlinskih beljakovinskih živilih če izvzamemo napako pri surovih acai jagodah. Vzorec surovih acai jagod je na spektrofotometru pokazal zelo visoke vrednosti absorbanc, kar posledično pomeni nižje vrednosti AOP, kot smo pričakovali. Težava se je pojavila zaradi preveč močne rdeče barve živila. Žarki svetlobe v spektrofotometru so zaradi pretemne obarvanosti težje prehajali skozi vzorec. Pri nadaljnjih raziskovanjih bi nepravilnosti lahko rešili z dodatnimi metodami ločevanja, tako da bi se vzorec razbarval in omogočil pravilno merjenje absorbance. Menimo, da bi imel vzorec surovih acai jagod v tem primeru podoben AOP, kot kuhan vzorec, verjetno celo višji. Pri živilih živalskega izvora lahko hipotezo ovržeta primera govejih jeter in svinjine, kjer sta kuhana vzorca presegla vrednosti surovih.

Domnevo, da mesna hrana nima antioksidantov lahko ovržemo. Pri vseh vzorcih živalskega izvora smo izmerili določeno količino antioksidantov oz. vrednosti AOP. V višjih vrednostih so najbolj izstopala goveja jetra, ki so presegla tudi večino rastlinskih vzorcev, takoj za njimi pa vzorca divjačine in piščančjega mesa.

Z raziskavo smo želeli dobiti boljšo predstavo o vsebnosti antioksidantov v nekaterih živilih, s tem pa smo tudi ugotovili katera živila je najbolj vredno vključiti v redno prehrano. Med delom v laboratoriju smo se izpopolnili v novih kemijskih in kemijsko- instrumentalnih metodah določanja vrednosti AOP, kar je bil prav tako naš cilj. Hkrati smo nalogo opremili s svojimi fotografijami za lažje razumevanje celega postopka eksperimentalnega dela našega raziskovanja.

Pri nadaljnjem raziskovanju bi med analizna živila lahko vključili tudi različne glive, npr. šampinjone, za katere smo prebrali, da so zelo dober nadomestek mesa v veganski prehrani. Primerjali bi lahko AOP umetno pridelanih in pa naravno gojenih gob.

Naloga je lahko za naprej tudi podlaga nadaljnjim raziskavam. Zanimivo bi bilo raziskati, ali se pri višji temperaturi obdelave vzorcev živil, kot je 100 °C (cvrtje, pečenje) še dodatno spreminja

AOP in ali se razlikuje pri svežih in ne svežih živilih. Spraševali bi se lahko tudi, ali na AOP vpliva kvaliteta živila npr. meso divjih živali, meso ekološko gojenih živali, meso različno starih živali, rastline ekološke pridelave in drugo.

7 VIRI IN LITERATURA

7.1 KNJIŽNI VIRI

Abramovič, H. (2011). *Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živil.

Goldacre, B. (2011). *Slaba znanost*. 1. izd. Ljubljana: Mladinska knjiga.

Kač M. in Vidrih R. (2000). *Analitika antioksidantov*. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101–114.

Kočevar Glavač, N. (2013). *Antioksidanti: Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo.

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.

Merljak, M. in Koman, M. (2008). *Zdravje je naša odločitev*. 1. izd. Ljubljana: Prešernova družba.

Veberič, R. (2010). *Bioactive compounds in fruit plants*. Ljubljana: Narodna univerzitetna knjižnica.

7.2 SPLETNI VIRI

ABC antioksidantov. (5. 12. 2015). Na *ABC zdravja*. Pridobljeno 15. 1. 2024 s: https://www.abczdravja.si/hrana/abc-antioksidantov/.

Butler, N. (2023). *What are the health benefits of acai berries?*. Na Medical News Today. Pridobljeno 18. 2. 2024 s: https://www.medicalnewstoday.com/articles/305576.

Camargo Neves, L., Carvalho da Silva, P. M., Roberto, S. R., Rocha Leão, P. M., Carvalho, L. B., da Silva, B., C., L., Cisneros-Zevallos, L. (2022) *Physiological maturity and wound-based orchard practices influence the antioxidant content and metabolic activity of two*

species of açai fruit at harvest and during storage. Na Science Direct. Pridobljeno 3. 3. 2024 s: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814622002400.

Grzetič, T. (2011). *Antioksidativni potencial plodov žlahtne češnje (Prunus avium L.)*. Pridobljeno: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/du1_grzetic_tina.pdf.

Guo, Y., Wang, Y., Liu, Z., Guo, X., Deng, Y., Ouyang, Q., Liu, H., Hu, S., Hu, B., Li, L., He, H., Xia, L., Zhang, R., Wang, J. (2021). *Effects of rearing systems on production performance, antioxidant capacity and immune status of meat ducks at different ages*. Na Science Direct. Pridobljeno 25. 2. 2024 s: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751731121000410.

Kastelic Švab, M. (2016). *Prehranska vrednost čipsa rdeče pese in korenja, pripravljenega z različnimi postopki sušenja*. Pridobljeno: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/zivilstvo/md_kastelic_svab_marjetka.pdf.

Kreft, S. in Krasnova, D. (2019). *Vitamin D in sončenje gob*. Na Lačna Bučka. Pridobljeno 10. 3. 2024 s: https://lacna-bucka.com/post/vitamin-d-in-soncenje-gob/.

Li, T., Shi, T., Zhou, C., Sun, X., Ang, Y., Dong, X. (2020). *Purification and characterization of novel antioxidant peptides from duck breast protein*. Na Science Direct. Pridobljeno 28. 2. 2024 s: hydrolysateshttps://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643820302036.

Schoss K. in Mravljak J. (2023). A*ntioksidativni potencial rastlinskih izvlečkov, pridobljenih s subkritično vodo*. Pridobljeno: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: https://www.sfd.si/wp-content/uploads/2023/02/fv-1-2023_4.pdf.

Žvokelj, M. (2009). *Obstojnost vitaminov in skupni antioksidativni potencial v sadno-žitni rezini*. Pridobljeno: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_zvokelj_matej.pdf.

Wen, C., Zhang J., Zhang, H., Duan Y., Ma, H. (2020). *Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review*. Na Science Direct. Pridobljeno 28. 2. 2024 s: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224420306099.

Pregelj, T. (2009). *Določanje antioksidantov v zdravilnih zeliščih*. Pridobljeno: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=133542.

Antioksidanti in radikali. (26. 9. 2019). *Na Ugriznimo znanost*. Pridobljeno 27. 3. 2024 s: https://www.rtvslo.si/rtv365/arhiv/174640194?s=tv.

Acai jagode eden najmočnejših antioksidantov. (b. d.). Na FutuNatura. Pridobljeno 27. 3. 2024 s: https://www.futunatura.si/acai-jagode-clanek.