



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Bojana KLEMENČIČ

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST RŽENEGA  
SLADA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Bojana KLEMENČIČ

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST RŽENEGA SLADA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

**ANTIOXIDANT EFFICIENCY OF RYE MALT**

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2017

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

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

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentorica:

Recenzentka:

Datum zagovora:

Bojana Klemenčič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 663.4:633.14:66.094.3.097.8(043)=163.6
- KG rž/*Secale cereale* L./rženi slad/fenolne spojine/antioksidativna učinkovitost/metoda DPPH•/metanol/etanol
- AV KLEMENČIČ, Bojana
- SA TERPINC, Petra (mentorica)/POGAČNIK, Lea (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2017
- IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST RŽENEGA SLADA
- TD Diplomski seminar (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
- OP IX, 24 str., 2 pregl., 7 sl., 32 vir.
- IJ sl
- Jl sl
- AI V diplomskem delu smo želeli proučiti vpliv pogojev slajenja na antioksidativno učinkovitost (AU) rženega (*Secale cereale* L.) slada. Kaljena zrna smo vzorčili vsakih 24 ur in jih sušili pri temperaturi 60 °C oz. 100 °C. Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo določili z metodo DPPH• in rezultate podali kot ekvivalent troloksa. Rezultati so pokazali, da namakanje zrn negativno vpliva na količino prisotnih antioksidantov. AU slada je pri etanolnih ekstraktih naraščala ves čas poskusa (96 ur), medtem ko smo pri metanolnih ekstraktih zadnji dan kaljenja zabeležili manjši upad, vendar samo, če smo slad sušili pri 100 °C. Ugotovili smo, da je učinkovitost antioksidantov v sladu, sušenem pri 100 °C boljša kot v sladu, sušenem pri 60 °C, ter da je AU spojin, ekstrahiranih z metanolom, višja od tistih, ki so ekstrahirane z etanolom, neodvisno od časa kaljenja in pogojev sušenja. Najvišjo AU smo določili v metanolnem ekstraktu slada, ki je bil podvržen 72-urni biološki aktivaciji in temperaturi sušenja 100 °C (0,89 mg troloks/g suhi vzorec), ko je prirast AU znašala 106 % v primerjavi z AU neslajene rži. Zaključimo lahko, da daljši čas kaljenja poveča AU rženega slada ter da temperatura sušenja in pogoji ekstrakcije znatno vplivajo na AU ekstraktov.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

- ND Du1
- DC UDC 663.4:633.14:66.094.3.097.8(043)=163.6
- CX rye/*Secale cereale* L./rye malt/phenolic compounds/antioxidative efficacy/method DPPH•/methanol/ethanol
- AU KLEMENČIČ, Bojana
- AA TERPINC, Petra (supervisor)/POGAČNIK, Lea (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2017
- TI ANTIOXIDANT EFFICIENCY OF RYE MALT
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition)
- NO IX, 24 p., 2 tab., 7 fig., 32 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB The purpose of the thesis was to examine the influence of malting on the antioxidant efficiency (AE) of rye (*Secale cereale* L.) malt. Germinated grains were sampled every 24 hours and kilned at a temperature of 60 °C and 100 °C. The free radical scavenging activity was determined by DPPH• method and the results were expressed as trolox equivalent. The results showed that steeping of the grain has a negative effect on the amount of antioxidants present. AE of ethanolic malt extracts increased throughout the experiment (96 hours), while in the case of methanolic extracts a smaller decrease on the last day of germination was observed, but only if the malt was kilned at 100 °C. The efficiency of antioxidants in malt dried at 100 °C was found to be better than those from malt dried at 60 °C. Furthermore AE of compounds extracted with methanol was found to be higher than those extracted with ethanol, regardless to the germination time and kilning conditions. The highest AE was observed for the methanolic extract of the malt that was subjected to 72-hour biological activation and kilning temperature of 100 °C (0.89 mg Trolox/g dw). When AE was increased for the 106 % compared to the AE of unmalted rye. It can be concluded that longer germination time increases the AE of rye malt and that the kilning temperature and extraction conditions significantly affect the AE of the extracts.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNI HIPOTEZI .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ZNAČILNOSTI RŽI .....	3
2.1.1 Zgodovinsko ozadje in območja pridelave .....	3
2.1.2 Zgradba žitnega zrna .....	3
2.1.3 Tehnološke lastnosti in potencialni zdravstveni učinki rži .....	4
2.1.4 Prehranska vrednost rži.....	4
2.2 RŽENI SLAD.....	5
2.3 PROSTI RADIKALI, OKSIDATIVNI STRES, ANTOKSIDANTI.....	5
2.3.1 Vloga in pomen prostih radikalov.....	5
2.3.2 Oksidativni stres in antioksidanti .....	5
2.4 FENOLNE SNOVI .....	7
2.4.1 Vloga in delitev fenolnih snovi.....	7
2.4.2 Fenolne snovi v rži .....	7
2.5 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST IN DPPH• METODA.....	8
2.6 VPLIV SLAJENJA NA ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST.....	8
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>9</b>
3.1 MATERIALI.....	9
3.2 PRIPRAVA RŽENEGA SLADA .....	10
3.2.1 Priprava etanolnih in metanolnih ekstraktov .....	10
3.3 DOLOČITEV ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH• .....	10
METODO.....	10
3.3.1 Priprava 0,2 mM raztopine DPPH• .....	10
3.3.2 Priprava umeritvene krivulje .....	10
3.3.3 Priprava slepega vzorca, referenčne raztopine in vzorcev .....	11

3.3.4	Izračuni za izdelavo umeritvene krivulje .....	11
3.3.5	Izračuni za vzorce metanolnih in etanolnih ekstraktov .....	12
3.4	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	13
4	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>14</b>
4.1	VPLIV POGOJEV SLAJENJA NA ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST V METANOLNIH EKSTRAKTIH .....	16
4.1.1	Vpliv časa kaljenja na antioksidativno učinkovitost rženega slada.....	16
4.1.2	Vpliv temperature sušenja slada na antioksidativno učinkovitost .....	16
4.2	VPLIV POGOJEV SLAJENJA NA ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST V ETANOLNIH EKSTRAKTIH.....	17
4.2.1	Vpliv časa kaljenja na antioksidativno učinkovitost rženega slada.....	17
4.2.2	Vpliv temperature sušenja slada na antioksidativno učinkovitost.....	17
4.2.3	Primerjava med topiloma: metanol in etanol .....	18
4.3	RAZPRAVA .....	18
5	<b>SKLEPI .....</b>	<b>20</b>
6	<b>POVZETEK.....</b>	<b>21</b>
7	<b>VIRI .....</b>	<b>22</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Volumen troloksa ( $V_{\text{troloks}}$ ), volumen metanola ( $V_{\text{MetOH}}$ ) oz. etanola ( $V_{\text{EtOH}}$ ) ter volumen DPPH• raztopine ( $V_{\text{DPPH}\bullet}$ ) za pripravo umeritvene krivulje (vzorci 1 do 8).....	11
<b>Preglednica 2:</b> Povprečne vrednosti antioksidativne učinkovitosti ter deleži suhe snovi v metanolnih in etanolnih ekstraktih rženega slada. ....	15



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zgradba žitnega zrna (Nabim, 2017).....	3
<b>Slika 2:</b> Razvrstitev antioksidantov (Bunaciu in sod., 2012: 247).....	6
<b>Slika 3:</b> Princip delovanja DPPH• metode (Bologion in sod., 2014: 518) .....	8
<b>Slika 4:</b> Umeritvena krivulja troloksa za metodo DPPH• pri uporabi metanola kot topila	12
<b>Slika 5:</b> Umeritvena krivulja troloksa za metodo DPPH• pri uporabi etanola kot topila ...	12
<b>Slika 6:</b> Vpliv priprave rženega slada na antioksidativno učinkovitost spojin pridobljenih z metanolom. ....	16
<b>Slika 7:</b> Vpliv priprave rženega slada na antioksidativno učinkovitost spojin pridobljenih z etanolom. ....	17

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AU	antioksidativna učinkovitost
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
SD	standardna deviacija
T	temperatura
UV	ultravijolično sevanje

## 1 UVOD

Ljudje si že od nekdaj prizadevamo uživati hrano, ki pripomore k izboljšanju zdravja in počutja. Skozi različna obdobja se zaradi novih znanj trendi spreminjajo in tako namesto po beli moki vse bolj posegamo po polnozrnatih živilih. Na naših jedilnikih žita predstavljajo glavni vir ogljikovih hidratov, pomembna pa so tudi zaradi prehranskih vlaknin, vitaminov, mineralov in drugih bioaktivnih komponent, ki jih vsebujejo (Arendt in Zannini, 2013). Mednje uvrščamo tudi spojine, ki s svojim antioksidativnim delovanjem pozitivno vplivajo na zdravje.

Slad je odličen vir antioksidantov (Do in sod., 2015). Spojine z antioksidativnim delovanjem so sposobne loviti proste radikale, ki v telesu nastajajo v procesu metabolizma ali pa njihovo nastajanje sprožijo zunanji vplivi (UV-sevanje, kajenje, alkohol, itd.) (Korošec, 2000). V diplomski nalogi smo se osredotočili na rž (*Secale cereale* L.), ki se v obliki kruha najbolj pogosto uživa v Severni in Zahodni Evropi. Spada med žita iz družine trav in vsebuje prehransko pomembne snovi, ki pozitivno učinkujejo v organizmu, predvsem na vnetne procese, nivo holesterola, metabolizem glukoze in inzulina ter zmanjšujejo tveganje za nastanek bolezni, kot so rak ter bolezni srca in ožilja (Arendt in Zannini, 2013).

Biokemijski procesi, ki potekajo med kaljenjem zrn, lahko generirajo vitamin C, vitamine skupine B,  $\beta$ -karoten, tokoferole in fenolne spojine ter hkrati pripomorejo k boljši biološki razpoložljivosti teh spojin (Yang in sod., 2001; Moongngarm in Satung, 2010; Wang in sod., 2014). V literaturi zasledimo, da se lahko antioksidativna učinkovitost (AU) rži med procesom kaljenja znatno poveča, k čemur prispevata predvsem sinteza encimov in modifikacija jedra (Ti in sod., 2014). Poleg tega lahko kaljenje zaradi povečane vsebnosti prostih aminokislin in reducirajočih sladkorjev spodbuja Maillardovo reakcijo (Abderrahim in sod., 2012).

Žita ali sestavine žit lahko v funkcionalnih živilih uporabimo: kot fermentabilne substrate za rast probiotičnih mikroorganizmov, kot prehranske vlaknine, ki spodbujajo več koristnih fizioloških učinkov, in kot prebiotike zaradi njihove vsebnosti določenih neprebavljivih ogljikovih hidratov. Škrob lahko uporabljamo tudi kot enkapsulacijski material za povečanje stabilnosti probiotikov pri prehodu skozi neugodne razmere v prebavnem traktu (Charalampopoulos in sod., 2002). Hkrati se že nekaj let kaže potreba po intenzivni študiji vpliva različnih pogojev namakanja, kaljenja in sušenja na funkcionalne bioaktivne komponente žit z namenom razvoja funkcionalnih živil in pijač, ki bi zaradi večje vsebnosti antioksidativnih komponent dodatno pripomogle k zdravju potrošnikov (Hassani in sod., 2016).

## 1.1 NAMEN DELA

Cilj diplomskega dela je ugotoviti, kako pogoji slajenja vplivajo na AU rženega slada ter določiti, kateri način je z vidika antioksidantov najbolj priporočljiv. Za določanje AU rženega slada smo uporabili metodo DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Kaljena zrna smo vzorčili vsakih 24 ur in jih podvrgli procesu sušenja pri dveh temperaturah (60 °C in 100 °C). Hkrati so nas zanimale razlike v AU rženega slada, če smo vzorce pridobili s pomočjo ekstrakcije v metanolu oz. etanolu.

## 1.2 DELOVNI HIPOTEZI

- Daljši čas kaljenja pozitivno vpliva na AU fenolnih snovi.
- Temperatura sušenja in pogoji ekstrakcije znatno vplivajo na AU ekstraktov.

## 2 PREGLED OBJAV

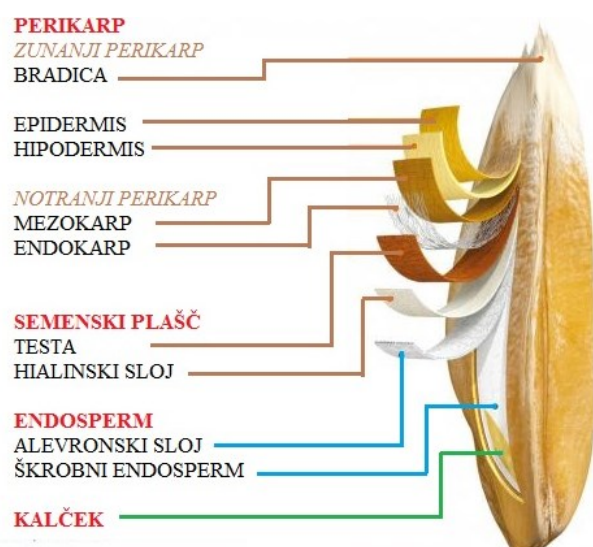
### 2.1 ZNAČILNOSTI RŽI

#### 2.1.1 Zgodovinsko ozadje in območja pridelave

Navadna rž (*Secale cereale* L.) je žito, ki spada v družino trav (*Gramineae*). V pisnih virih so jo prvi omenili Rimljani. Iz Azije so rž prenesli v Evropo kot plevel, skupaj z pšenico in ječmenom. Že v obdobju od 800 do 500 pr. n.š. so jo pridelovali v severni Nemčiji. Sejanje rži se je razširilo tudi med Kelte, Slovane in nato med Germane. Skozi večtisočletno zgodovino je rž postala žito hladnejših podnebij (Kocjan Ačko, 1999). Predstavlja le 1- % celotne svetovne proizvodnje žit, kjer je njena pridelava pretežno osredotočena na Poljsko, Nemčijo, zahodno Rusijo in Ukrajino (Arendt in Zannini, 2013). V Sloveniji so najprimernejša območja za pridelovanje rži na peščenih tleh v severovzhodni Sloveniji, v višje ležečih njivah na Koroškem in Gorenjskem ter na gričevnatih območjih Dolenjske in Kočevskega (Kocjan Ačko, 1999).

#### 2.1.2 Zgradba žitnega zrna

Slika 1 prikazuje različne plasti žitnega zrna. Testa je semenski plašč, ki skupaj s celično steno tvori perikarp. Alevronski sloj je pri rži prisoten kot ena plast celic, ki vsebuje veliko beljakovin (alevron), vlaknin, mineralov, encimov in vitaminov. Jedro ali meljak vsebuje endosperm, ki ga sestavljajo škrobna zrna prepletena z verigami beljakovin. Vsebuje največ lepka in manj mineralov. Luska (perikarp) je sestavljena iz številnih plasti in vsebuje veliko mineralov in vlaknin. Kalček je del zrna, ki je bogat z maščobami, encimi, topnimi beljakovinami in je namenjen klitju nove rastline. Otrobi predstavljajo skupek luske in alevronske plasti, ki se med meljavo odstranijo (Arendt in Zannini, 2013).



Slika 1: Zgradba žitnega zrna (Nabim, 2017)

### 2.1.3 Tehnološke lastnosti in potencialni zdravilni učinki rži

Zrno rži lahko uporabljamo za različne namene. Zmleta zrna so primerna za izdelavo rženega kruha. Njegove prednosti so, da vsebuje več hranilnih snovi, ostane dlje časa svež ter da je zaradi manjše vsebnosti škroba primeren tudi za sladkorne bolnike. Med manj zelene lastnosti sodi njegova slabša prebavljivost in nekoliko zbita struktura zaradi porozne sredice in manjšega volumna kruha (Kocjan Ačko, 1999). Slad in ekstrakti slada se uporabljajo pri izdelavi različnih živil in pijač, vključno z žitnimi izdelki za zajtrk, piškoti, pekovskimi izdelki in mlečnimi pijačami. Zaradi vsebnosti fermentabilnih sladkorjev se slad najpogosteje uporablja za pripravo alkoholnih pijač, predvsem za pivo in viski (Samaras in sod., 2005).

Komponente prehranskih vlaknin (arabinoksilani,  $\beta$ -glukan, lignani) imajo skupaj z ostalimi bioaktivnimi komponentami številne pozitivne učinke na človekovo zdravje. Vlaknine povečajo volumen blata, pri tem zmanjšajo čas prehoda skozi črevesje, preprečijo zaprtje in tako spodbujajo pravilno delovanje črevesja. Prehranske vlaknine v rži imajo ugodne učinke tudi na nivo holesterola in na metabolizem inzulina in glukoze. Nekatere epidemiološke študije navajajo, da ima rž lahko vlogo pri preprečevanju obolenja za rakom (Arendt in Zannini, 2013). Pozitivne učinke ima tudi na vnetja (Pihlava in sod., 2014).

### 2.1.4 Prehranska vrednost rži

Rženo zrno vsebuje pomembna makro in mikrohranila, katerih vsebnost je odvisna od pogojev rasti. Žitno zrno rži v največji meri predstavljajo ogljikovi hidrati (70 %). Rž vsebuje visok nivo hemiceluloz, ki preprečujejo agregacijo beljakovin v gluten. Ta je pri pekovskih izdelkih nujen za razvoj viskozo-elastičnih lastnosti testa pri pšeničnem kruhu. Pentozani vplivajo na funkcionalne lastnosti ržene moke pri peki kruha. Prehranske vlaknine predstavljajo 17 % celotnega zrna, od tega je približno 4 % topnih vlaknin (pentozani,  $\beta$ -glukan, lignin, celuloza in arabinoksilani). Proteini gradijo od 6,5 % do 14,5 % zrna rži, odvisno od rastnih pogojev in od genotipa žita. S prehranskega vidika imajo proteini v rži ustrežnejše ravnotežje esencialnih aminokislin predvsem zaradi večje vsebnosti lizina. Gluten v rži pa prav tako kot pri pšenici, predstavlja problem za ljudi s celiakijo. Lipidov je v rži na suho maso prisotnih od 1,5 % do 2,0 %. V nasprotju z ostalimi žiti imajo lipidi v rži nekoliko večji delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin (55,6 % - C18:2). Rž je zato bolj dovzetna za oksidativno žarkost. Rženo zrno vsebuje 2,1 % pepela, kar je primerljivo s pšenico. Vir fosforja predstavlja fitinska kislina, prisotni so tudi kalij, kalcij, železo, baker in mangan. Rž je poznana kot dober vir vitaminov A, B, D in E. Od vitaminov skupine B prevladujejo tiamin, riboflavin, nikotinska kislina, pantotenska kislina, piridoksin in tokoferol (Arendt in Zannini, 2013).

## 2.2 RŽENI SLAD

Slajenje je proces kaljenja žita pod nadzorovanimi pogoji, katerega končni produkt je slad. Proizvodnja slada poteka v treh glavnih korakih: namakanje, kaljenje in sušenje (Boulton, 2013). Vsebnost vlage v zrnih je za optimalno kaljenje potrebno povečati iz 12 % na 40 % ali več, točna vrednost je odvisna od večih dejavnikov. Pri tem se volumen zrna poveča do 1,4-krat. Spremembe potekajo v videzu korenin ter v krhkosti zrna. Med namakanjem je potrebno nadzorovati temperaturo, oskrbo s kisikom, vegetacijski čas ter izmenjavo med suhim in mokrim obdobjem. V fazi kaljenja se sintetizirajo hidrolitični encimi, ki so potrebni za razgradnjo celičnih sten, škroba, beljakovin in drugih bioloških makromolekul v manjše molekule. Produkti razgradnje endosperma (sladkorji, aminokisliline) in snovi iz alevronske plasti (fosfat, kovinski ioni) služijo kot vir hrane za rast kalčka. Med kaljenjem je potrebno nadzorovati čas, temperaturo, razmerje med O<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub> ter maksimalno stopnjo namakanja. Po pridobitvi optimalne količine encimov proces kaljenja prekinemo s sušenjem, kjer je temperaturni režim odvisen od zelenega produkta. Cilj sušenja je prekiniti nadaljnjo modifikacijo zrna in ustaviti rast nove rastline, znižati vsebnost vlage za nadaljnje skladiščenje, ohraniti encime, ki so nastali med procesom kaljenja ter razviti značilno barvo in okus (Kreisz, 2009).

## 2.3 PROSTI RADIKALI, OKSIDATIVNI STRES, ANTOKSIDANTI

### 2.3.1 Vloga in pomen prostih radikalov

Prosti radikali so nestabilne molekule z enim neveznim elektronom. Ker želijo doseči maksimalno stabilnost, hitro reagirajo z esencialnimi molekulami človeškega organizma (DNA, maščobe in beljakovine). Zaradi cepitve kovalentnih vezi se jim spremeni kemijska struktura in na ta način pride do poškodb v celicah. Nastajanje radikalov med dihanjem v procesu metabolizma je povsem normalen proces. Problem predstavljajo prosti radikali, ki jih v telo vnašamo od zunaj. Mednje spadajo UV- in gama - žarki, toplota, kajenje, onesnaženo okolje, zdravila in alkohol. Ti vplivajo na staranje in pojav oz. poslabšanje številnih bolezni. Kisikovi prosti radikali imajo pomembno vlogo tudi pri zastrupitvah, fizičnih obremenitvah in pri prehrani, v kateri primanjkuje naravnih antioksidantov, aminokislin ter elementov v sledovih (Korošec, 2000).

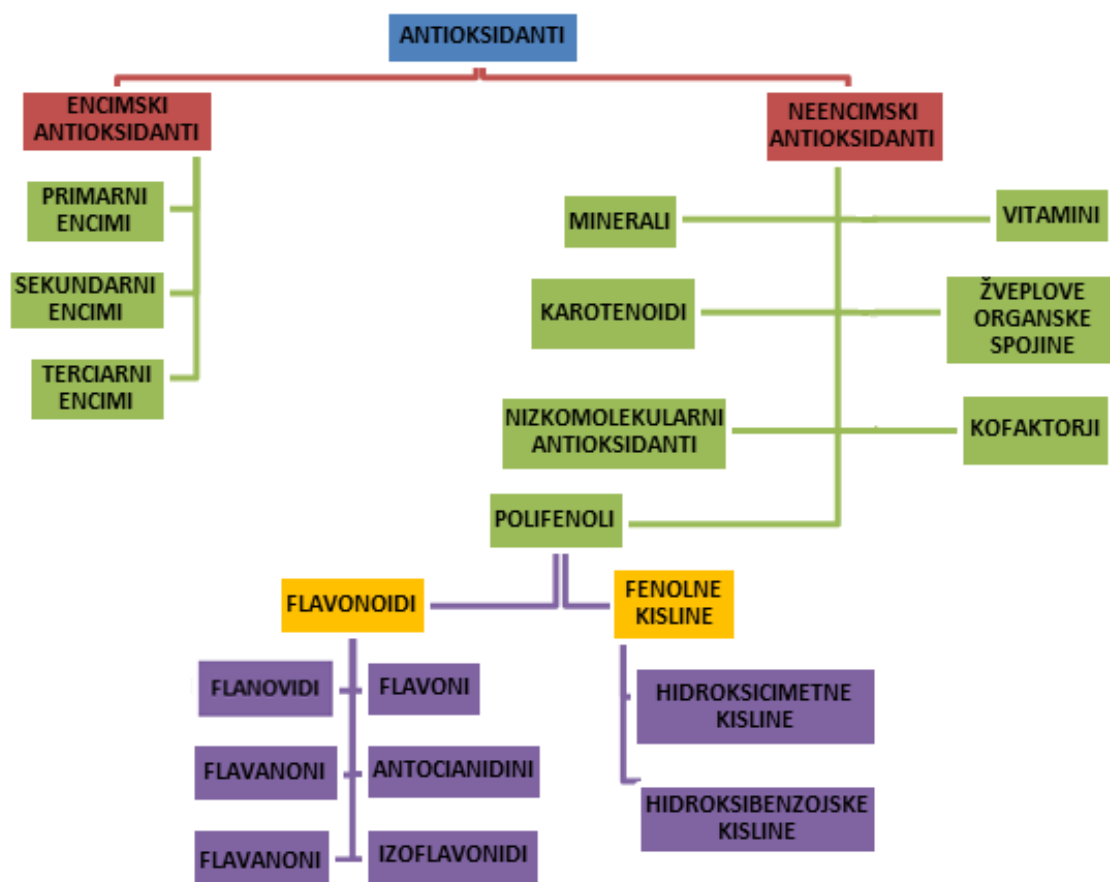
### 2.3.2 Oksidativni stres in antioksidanti

Ko nastane prevelika količina prostih radikalov, je ravnovesje med prostimi radikali in antioksidanti porušeno, kar imenujemo oksidativni stres. Na tem mestu je potrebno poškodovane biomolekule odstraniti ali popraviti (Kreft in Škrabanja, 2000).

To vlogo imajo antioksidanti, ki lovijo proste radikale ali kelirajo kovinske ione (Korošec, 2000). Antioksidanti so za telo bistvenega pomena, saj popravljajo mehanizme v poškodovanih celicah in s svojim delovanjem zmanjšujejo tveganje za mutacije in nastanek novih rakastih tvorbo (Kreft in Škrabanja, 2000).

Ob nezadostni količini antioksidantov, sintetiziranih v telesu (endogenih antioksidantov), je te potrebno v organizem vnesti s hrano. Eksogeni antioksidanti lahko izvirajo iz rastlinske hrane (vitamini, flavonoidi, antocianini, nekatere mineralne spojine) ali pa so pridobljeni sintetično (butilhidroksianizol, galati) (Litescu in sod., 2011). Antioksidante lahko razvrstimo tudi glede na način preprečevanja verižne reakcije avtooksidacije ali glede na mehanizem delovanja: prenos vodika (HAT način), prenos elektrona (način SET) (Liang in Kitts, 2007).

Razvrstitev antioksidantov poteka tudi glede na funkcijo, ki jo opravljajo v organizmu. Primarni antioksidanti so odgovorni za preprečevanje nastanka prostih radikalov. Sekundarni antioksidanti prostim radikalom preprečujejo oksidacijo in tvorbo novih prostih radikalov, tako da jih nevtralizirajo. Terciarni antioksidanti opravljajo funkcijo popravljanja poškodb, ki jih povzročajo prosti radikali v celični strukturi (Kovač in Raspor, 2000). Slika 2 prikazuje enega od načinov razvrstitve antioksidantov.



Slika 2: Razvrstitev antioksidantov (Bunaciu in sod., 2012: 247)



## 2.4 FENOLNE SNOVI

### 2.4.1 Vloga in delitev fenolnih snovi

Fenolne snovi so spojine z antioksidativnimi lastnostmi, ki imajo vsaj en aromatski obroč, na katerega je vezano večje število –OH skupin. Na njihovo antioksidativno delovanje vplivajo položaj in razporeditev hidroksilnih skupin. Fenolne snovi so sekundarni metaboliti rastlin, ki nastanejo iz fenilalanina ali iz šikimske kisline. V rastlinah se nahaja od 1 % do 2 % fenolnih spojin (v zrelih sadežih do 8,5 %), ki pripomorejo k odpornosti rastlin pred mehanskim stresom (mehanske poškodbe, infekcije z virusi, glivami, bakterijam, itd.). Sodelujejo tudi kot kemične signalne spojine pri cvetenju, oplojevanju in rastlinski simbiozi. Ob stresnih pogojih se nastajanje fenolnih snovi v rastlini poveča, kjer kot oksidacijski produkti nastanejo ortokinoni, ki imajo potencial antimikrobnega delovanja (Abram, 2000). Fenolne spojine blokirajo proces verižne reakcije s prostimi radikali in tako omogočajo normalo delovanje organizma (Ti in sod., 2014). Dnevno s hrano vnesemo okoli 1 g fenolnih snovi (Abram in Simčič, 1997).

### 2.4.2 Fenolne snovi v rži

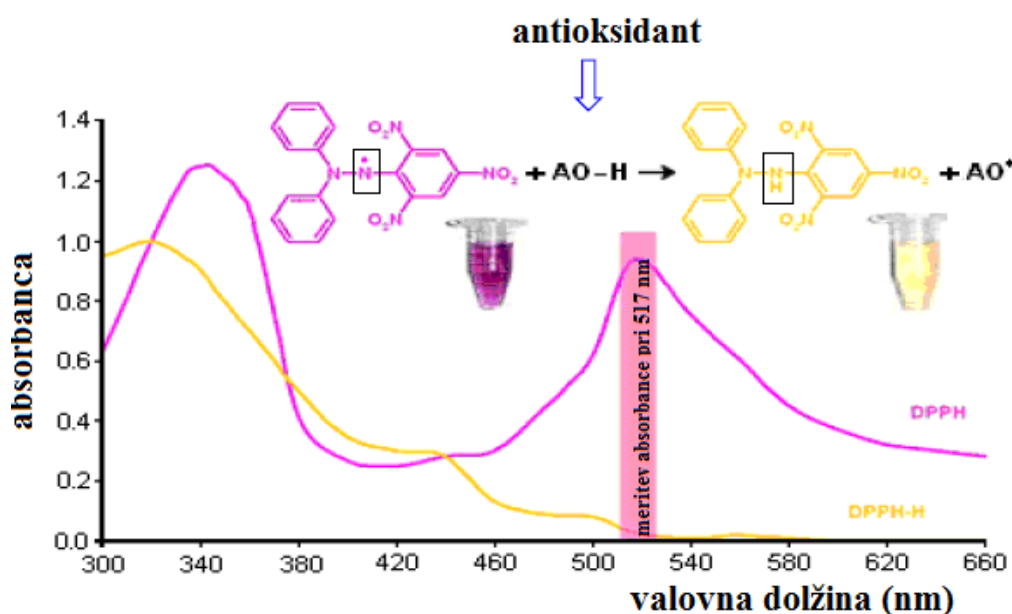
Glavne fenolne komponente v rži so fenolne kisline (od 103 do 300 mg/100 g), lignani (2 mg/100 g) in alkilresorcinoli (od 103 do 300 mg/100 g zrn) (Bondia-Pons in sod., 2009). Prisotni so tudi benzoksazini (16 mg/100g) ter flavonoidi (3 mg/100g). Med fenolnimi kisljinami je največ ferulne kisline, ki spada med hidroksicimetne kisline. Sledita ji sinapinska kislina in p-kumarna kislina. V manjših količinah so prisotni derivati benzojske kisline. Ločimo v organskem topilu topne in netopne fenolne kisline. Topne se nahajajo v prosti ali glikolizirani obliki. V hrani prispevajo h okusu in k AU. Fenolne kisline, ki so netopne v organskih topilih, pa so z estrskimi vezmi povezane s polisaharidi (arbinoksilani,  $\beta$ -glukani) ali z etrskimi vezmi z lignani (Pihlava in sod., 2014).

Lignani so po strukturi podobni estradiolom, zato jih uvrščamo med fitoestrogene. Več kot 80 % skupnih lignanov predstavlja siringarezinol. Alkilresorcinoli so derivati 1,3-dihidroksibenzena, z neparnim številom alkilnih verig na položaju 5 benzenovega obroča. Njihov glavni vir predstavljajo zunanji deli rženih zrn (alevron, perikarp). V zadnjih desetih letih so vzbudili posebno zanimanje zaradi protimikrobnih, antiparazitskih, protitumorskih in antioksidativnih učinkov (Bondia-Pons in sod., 2009).

Glavni benzoksazini v rži so mono- in di- heksozni konjugati ciklične hidroksamske kisline 2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on (DIBOA) ter ciklični amid 2-hidroksi-1,4-benzoksazin-3-on (HBOA). Prehranske benzoksazine ljudje absorbiramo in presnavljamo. Rž izmed flavonoidov, prisotnih predvsem v otrobih, vsebuje flavone (luteonin), flavonole (kvercentin) in flavanone. Največja vsebnost flavonoidov je v otrobih, najmanjša pa v endospermu (Pihlava in sod., 2014).

## 2.5 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST IN METODA DPPH•

AU pove, v kolikšni meri so antioksidanti v analiziranem vzorcu sposobni zmanjšati delovanje prostih radikalov. DPPH• je stabilen prost radikal, ki se uporablja za določanje AU spojin. V raztopini metanola je DPPH• vijolične barve in ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 517 nm. Kot je prikazano na sliki 3, DPPH• v stiku z drugim radikalom oz. donorjem vodika (antioksidantom) izgubi svoje lastnosti kot prosti radikal. Raztopina spremeni barvo v svetlo rumeno, absorbanca raztopine pa se pri tem posledično zmanjša (Pisoschi in Negulescu, 2011; Brand-Williams in sod., 1995). Ta metoda je poceni, enostavna za razumevanje in uporabna za pregledovanje in primerjanje velikega števila vzorcev pri vrednotenju različnih vzorcev (Ondrejovič in sod., 2014).



Slika 3: Princip delovanja DPPH• metode (Boligion in sod., 2014: 518)

## 2.6 VPLIV SLAJENJA NA ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST

Slajenje žit je učinkovita metoda za povečanje vsebnosti antioksidantov. Znano je, da postopek kaljenja na splošno izboljša prehransko kakovost žitnih zrn, ne le z zmanjšanjem antinutritivnih spojin (npr. fitinske kisline), temveč tudi z zvišanjem ravni hranil in fiziološko aktivnih snovi. V procesu kaljenja poteka sinteza encimov in modifikacija jedra, kar lahko privede do sproščanja fenolnih spojin in povečanja AU (Ti in sod., 2014).

V študiji na kvinoji je kaljenje povečalo tako vsebnost fenolnih spojin kot ostalih antioksidantov. Hkrati so raziskovalci določili prirast reducirajočih sladkorjev, ki med sušenjem zrn vodijo k večjemu nastanku produktov Maillardove reakcije. Slednji so prav tako znani po svojem antioksidativnem delovanju (Abderrahim in sod., 2012).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 Pribor:**

- tehtič in pokrovček
- falkonke (10 ml)
- epice (2 ml)
- alufolija
- kapalka
- stojalo za epice
- kivete
- čaša
- žlica
- spatula

##### **3.1.2 Naprave:**

- mlinček (IKA, A11 basic, Nemčija)
- analitska tehtnica (Mettler Toledo, ABS04-S, Švica)
- stresalnik (Tehtnica Železniki, EV-403, Slovenija)
- avtomatske pipete (1  $\mu$ l, 5 ml in 10 ml) (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga (Beckman Coulter, Avanti JXN-26, Združene države Amerike)
- centrifuga (Eppendorf, 5415D, Nemčija)
- vrtinčnik
- sonifikator
- UV-VIS spektrofotometer (Cecil, CE 2021, Anglija)

##### **3.1.3 Reagenti:**

- tekoči dušik ( $N_2$ )
- etanol (96%, denaturiran)
- $C_2H_5OH$  (Merck – Darmstadt, Nemčija)
- metanol (99%) –  $CH_3OH$  (Merck – Darmstadt, Nemčija)
- DPPH• reagent (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) –  $C_{18}H_{12}N_5O_6$  (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemčija)
- troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina), (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemčija)

## 3.2 PRIPRAVA RŽENEGA SLADA

Diplomsko delo je bilo zasnovano v okviru obsežnejše raziskave. Priprava rženega slada je bila naloga druge študentke. Natehtala je 200 g zrn rži in jih 8 ur namakala v vodi s temperaturo 20 °C. Nato je zrna osušila ter jih pustila v komori 16 ur. Sledilo je ponovno namakanje za dodatnih 8 ur, zrna so ob koncu namakanja vsebovala približno 45 % vode. Sledilo je kaljenje, ki je potekalo pri temperaturi 20 °C v kalilni komori. Vzorčenje je potekalo po 0, 24, 48, 72 in 96 urah biološke aktivacije zrn. S sušenjem pri temperaturi 60 °C in 100 °C smo rženi slad stabilizirali in prekinili proces kaljenja. Za kontrolni vzorec smo uporabili nekaljena zrna rži.

### 3.2.1 Priprava etanolnih in metanolnih ekstraktov

Posamezen vzorec smo pripravili tako, da smo nekaljena in slajena zrna prelili s tekočim dušikom in jih homogenizirali s pomočjo mlina za semena. Za izvedbo ekstrakcije smo v falkonko natehtali približno 1 g zmeltega vzorca. Dodali smo 9 ml metanola pri pripravi metanolnih ekstraktov oz. etanola pri pripravi etanolnih ekstraktov. Vsebino smo nato premešali. Zaradi občutljivosti antioksidantov na svetlobo smo falkonke zaščitili z aluminijasto folijo in jih stresali na stresalniku dve uri pri hitrosti 200 obr/min. S pomočjo centrifugiranja, ki je potekalo v dveh korakih (10 min pri 8000 obr/min in 3 min pri hitrosti 12300 obr/min), smo ločili sediment od supernatanta. Supernatant smo prenesli v nove epice ter ga uporabili za nadaljnjo analizo.

## 3.3 DOLOČITEV ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z METODO DPPH•

### 3.3.1 Priprava 0,2 mM raztopine DPPH•

V 10 ml bučko smo natehtali 3,91 mg DPPH• reagenta ter jo z metanolom dopolnili do oznake. Izhodno raztopino DPPH• reagenta smo razredčili z metanolom v razmerju 1:4. Vsak dan smo pripravili svež reagent, saj se s časoma koncentracija radikalov DPPH• v pripravljene raztopini zmanjšuje.

### 3.3.2 Priprava umeritvene krivulje

V naši raziskavi smo določali AU različno pripravljenega rženega slada in jo primerjali z AU troloksa. Najprej smo zatehtali 12,5 mg troloksa v 10 ml bučko, jo dopolnili z metanolom do oznake, raztopino premešali in 10-krat razredčili z metanolom. Koncentracija tako pripravljene raztopine troloksa je znašala 0,5 mM. Priprava vzorcev za umeritveno krivuljo je prikazana v preglednici 1. Vsebine epic smo premešali na vrtinčniku in jih inkubirali v temi 60 min. Nato smo raztopine prenesli v kivete in raztopinam izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm.

Po enakem postopku smo pripravili umeritveno krivuljo za etanolne ekstrakte rženega slada, le da smo kot topilo pri pripravi standardne raztopine troloksa in njihovi analizi uporabili etanol.

Preglednica 1: Volumen troloksa ( $V_{\text{troloks}}$ ), volumen metanola ( $V_{\text{MetOH}}$ ) oz. etanola ( $V_{\text{EtOH}}$ ) ter volumen DPPH• raztopine ( $V_{\text{DPPH}\bullet}$ ) za pripravo umeritvene krivulje (vzorci 1 do 8)

oznaka vzorcev	1	2	3	4	5	6	7	8
$V_{\text{troloks}}$ ( $\mu\text{l}$ )	25	50	75	100	125	150	175	200
$V_{\text{MetOH}} /$ $V_{\text{EtOH}}$ ( $\mu\text{l}$ )	975	950	925	900	875	850	825	800
$V_{\text{DPPH}\bullet}$ ( $\mu\text{l}$ )	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

### 3.3.3 Priprava slepega vzorca, referenčne raztopine in vzorcev

Za slepi vzorec smo v epico odpipetirali 200  $\mu\text{l}$  vzorca in 1800  $\mu\text{l}$  metanola. Meritev absorbance slepega vzorca, ki ne vsebuje DPPH• radikalov, je bila potrebna, da smo umerili spektrofotometer na vrednost absorbance 0. Za referenčno raztopino smo uporabili 1 ml metanola in 1 ml metanolne raztopine DPPH•. Ta je zaradi odsotnosti antioksidantov predstavljala maksimalno koncentracijo prostih radikalov in posledično tudi najvišjo pomerjeno absorbanco. Od vrednosti absorbance referenčne raztopine smo v nadaljevanju odšteli absorbanco analiziranega vzorca in na ta način pridobili rezultate o njegovi AU. Za pripravo vzorcev smo v epico odpipetirali 200  $\mu\text{l}$  vzorca, 800  $\mu\text{l}$  metanola (etanola) ter 1 ml metanolne raztopine DPPH•. Za čimbolj reprezentativne rezultate smo vsako analizo vzorcev izvajali v dveh paralelkah. Po 60 minutah smo izmerili absorbanco s pomočjo UV-VIS spektrofotometra pri valovni dolžini 517 nm.

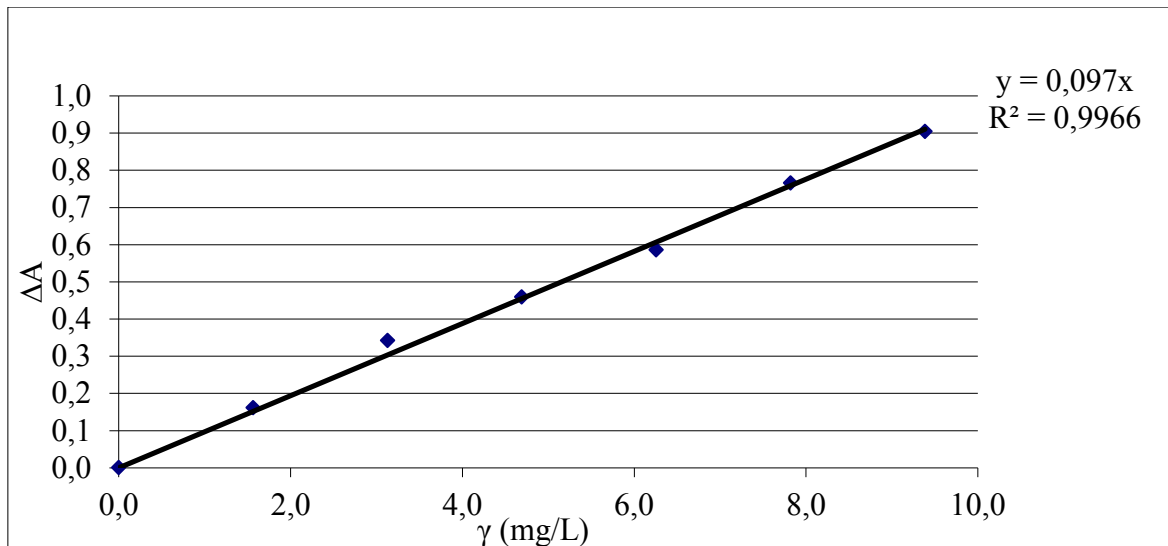
### 3.3.4 Izračuni za izdelavo umeritvene krivulje

Umeritveno krivuljo smo uporabili za določanje koncentracije antioksidantov v reakcijski mešanici, za kar smo uporabili troloks kot ekvivalent. Pripravljenim raztopinam (preglednica 1) smo pomerili absorbanco, ki je linearno odvisna od padca koncentracije DPPH• radikala, ta pa od koncentracije prisotnega antioksidanta.

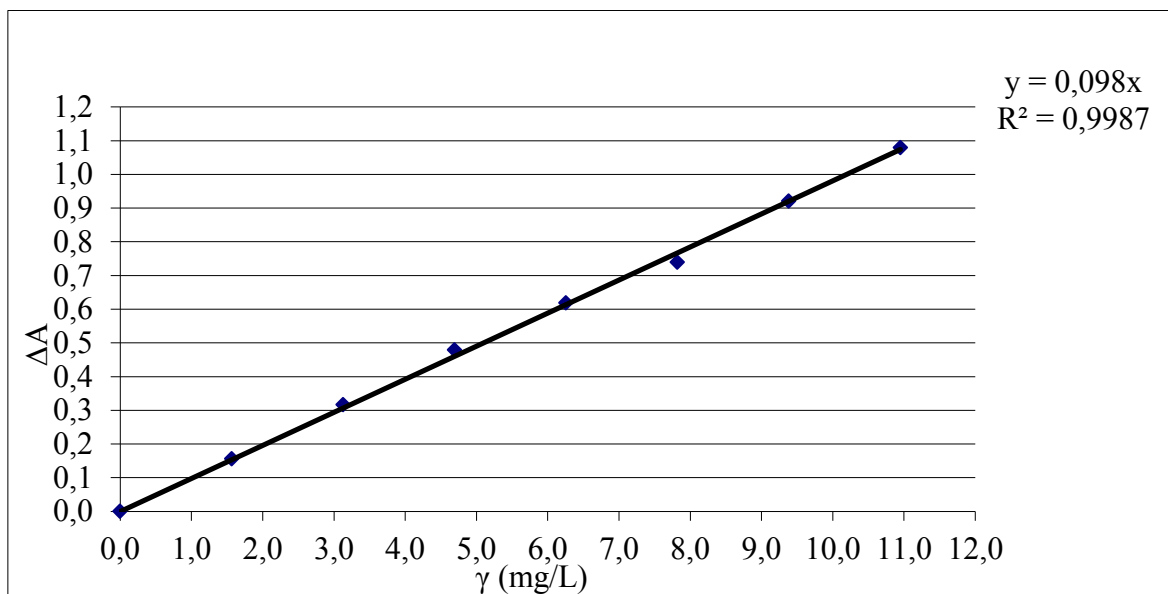
Od povprečne absorbance referenčne raztopine smo odšteli povprečno vrednost absorbance obeh paralelk standardnega vzorca in tako dobili podatek o spremembi absorbance ( $\Delta A$ ) kot funkcije koncentracije troloksa, raztopljenega v metanolu (slika 4) oz. etanolu (slika 5).

Iz enačbe premice smo dobili podatek za naklon premice ( $k$ ). Vrednost  $k$  smo nadalje uporabili za izračun AU vzorcev rženega slada.

$$AU = \Delta A / k \quad \dots (1)$$



Slika 4: Umeritvena krivulja troloksa za metodo DPPH• pri uporabi metanola kot topila



Slika 5: Umeritvena krivulja troloksa za metodo DPPH• pri uporabi etanola kot topila

### 3.3.5 Izračuni za vzorce metanolnih in etanolnih ekstraktov

Spremembo absorbance, ki jo je povzročil dodatek vzorca k raztopini DPPH•, smo delili z vrednostjo  $k$  (0,097 za metanolne ekstrakte in 0,098 za etanolne ekstrakte) in tako izračunali masno koncentracijo troloksa v reakcijski mešanici ( $\gamma_{RM}$ ):

$$\gamma_{RM} = \frac{\Delta A}{k} \quad \dots (2)$$

Za izračun mase troloksa v reakcijski mešanici ( $m_{RM}$ ) smo masno koncentracijo ( $\gamma_{RM}$ ) ( $\mu\text{g/ml}$ ) pomnožili z volumnom reakcijske mešanice ( $V_{RM}$ ):

$$m_{RM(=epica)} = \gamma_{RM} \times V_{RM} \quad \dots (3)$$

Količino analiziranih antioksidativnih snovi smo želeli izraziti glede na zatehto vzorca, zato smo izračunali masno koncentracijo troloksa v celotnem vzorcu ( $\gamma_{cel}$ ). To vrednost smo potrebovali za izračun mase troloksa v celotnem vzorcu, ko smo  $\gamma_{cel}$  pomnožili z volumnom celotnega vzorca ( $V_{cel}$ ):

$$\gamma_{cel} = \left( \frac{m_{RM}}{V_{pip.}} \right) \times R \quad \dots (4)$$

$$m_{cel.} = \gamma_{cel.} \times V_{cel.} \quad \dots (5)$$

Količino antioksidantov smo delili z zatehto vzorca, da smo pridobili podatek kolikšna masa (v mg) troloksa je v 1 g svežega vzorca. Za izračun AU, ki jo ima 1 g suhega vzorca, smo upoštevali še delež suhe snovi v posameznem vzorcu. To smo ugotavljali tako, da smo od celotne mase vzorcev odšteli deleže vsebnosti vode, ki jih je s sušenjem vzorcev določala druga študentka.

$$\text{mg troloks/g sv. vz.} = \frac{m_{cel.}}{m_{vz.}} \quad \dots (6)$$

$$\text{mg troloks/g suh. vz.} = \frac{\text{mg troloks/g sv.vz.}}{\% \text{ suha snov}} \quad \dots (7)$$

### 3.4 OBDELAVA PODATKOV

Poskus priprave in analize rženega slada je potekal v 2 ponovitvah, vsako ponovitev kaljenja in sušenja pa smo vzorčili v 2 paralelkah. Analizo določanja AU metanolnih in etanolnih ekstraktov smo izvedli v 2 paralelkah za vsak vzorec.

S pomočjo računalniškega programa Excell smo rezultate analiziranih vzorcev podali kot povprečje dveh ponovitev  $\pm$  standardna deviacija (SD).

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Pri metodi DPPH• se obarvanost reakcijske mešanice ob prisotnosti antioksidantov zaradi nižje koncentracije radikalov zmanjša. Na principu merjenja absorbance ugotavljamo intenzivnost barve reakcijske mešanice in na ta način posredno določamo vsebnost antioksidantov v vzorcih. Nižja absorbanca reakcijske zmesi pomeni večjo aktivnost odstranjevanja prostih radikalov (Fogarasi in sod., 2015).

Primerjava rezultatov v preglednici 2 nam pove, kakšen bi bil doprinos k AU, če bi namesto neslajenih zrn zaužili slajena zrna rži (rezultati so podani na svežo maso vzorca). Spojine, ki smo jih pridobili iz enake količine rženega slada po prvem dnevu poskusa, so ne glede na ekstrakcijsko topilo izražale slabšo AU v primerjavi s spojinami iz netretirane rži. Negativen vpliv na učinkovitost antioksidantov v rženem sladu lahko po prvem dnevu opazimo pri obeh temperaturnih režimih sušenja.

Čeprav se je v naslednjih 24 urah AU rženega slada, pripravljenega pod milejšimi pogoji izboljšala za tretjino, je sušenje pri višjih temperaturah vodilo v kar 106 % povečanje aktivnosti antioksidantov, če smo ekstrakcijo izvedli z metanolom. Pri uporabi etanola je bila razlika v AU med zrnji sušenimi pri različnih temperaturah še vedno precejšnja (do 53 %), vendar manjša kot pri metanolu (do 43,5 %).

Po 72 urah poskusa se je količina antioksidantov glede na predhodni dan pri metanolnih ekstraktih povečala za 45,6 %, če smo zrna sušili pri temperaturi 60 °C oz. za 34,8 % pri sušenju na 100 °C. Spojine, ki smo jih pridobili s pomočjo etanola, so izražale za 60 % oz. 71 % večjo AU, če smo zrna sušili pri 60°C oz. 100 °C .

Po štirih dneh je pri uporabi metanola AU slada, sušenega pri 60 °C, še vedno naraščala in dosegla 26 % prirast, sušenje pri 100 °C pa je povzročilo 8 % zmanjšanje AU v zadnjih 24 urah. Etanolni ekstrakti so pri nižji temperaturi sušenja dosegli 43 %, pri višji pa 12 % povečanje AU.

Pri uporabi metanola kot topila se je po dveh in treh dneh biološke aktivacije zrn, temperatura 100 °C izkazala za bolj učinkovito glede vsebnosti antioksidantov kot 60 °C, medtem, ko se vrednosti za prvi in četrti dan niso bistveno razlikovale. Pri etanolnih ekstraktih pa opaznih razlik zaradi različnih temperatur sušenja ni bilo opaziti prvi dan, preostale tri dni pa je temperatura 100 °C pripomogla k povečani AU zrn v primerjavi z nižjo temperaturo sušenja.



Preglednica 2: Povprečne vrednosti antioksidativne učinkovitosti in deleži suhe snovi v metanolnih in etanolnih ekstraktih rženega slada

oznaka vzorca	AU (mg troloks/g sveži vzorec)	suha snov (%)
<b>M 0</b>	0,37 ± 0,03	87,0 ± 0,4
<b>M 24/60</b>	0,33 ± 0,01	94,7 ± 0,8
<b>M 24/100</b>	0,31 ± 0,00	97,0 ± 0,1
<b>M 48/60</b>	0,44 ± 0,03	93,9 ± 0,3
<b>M 48/100</b>	0,64 ± 0,05	97,2 ± 0,1
<b>M 72/60</b>	0,61 ± 0,00	90,7 ± 1,1
<b>M 72/100</b>	0,86 ± 0,01	96,4 ± 0,2
<b>M 96/60</b>	0,77 ± 0,02	91,2 ± 0,6
<b>M 96/100</b>	0,79 ± 0,00	95,8 ± 0,9
<b>E 0</b>	0,30 ± 0,00	87,0 ± 0,4
<b>E 24/60</b>	0,17 ± 0,01	94,7 ± 0,8
<b>E 24/100</b>	0,19 ± 0,01	97,0 ± 0,1
<b>E 48/60</b>	0,25 ± 0,01	93,9 ± 0,3
<b>E 48/100</b>	0,38 ± 0,01	97,2 ± 0,1
<b>E 72/60</b>	0,40 ± 0,03	90,7 ± 1,1
<b>E 72/100</b>	0,65 ± 0,01	96,4 ± 0,2
<b>E 96/60</b>	0,57 ± 0,01	91,2 ± 0,6
<b>E 96/100</b>	0,73 ± 0,03	95,8 ± 0,9

Razlaga oznak vzorcev:

M – metanolni ekstrakt, E – etanolni ekstrakt

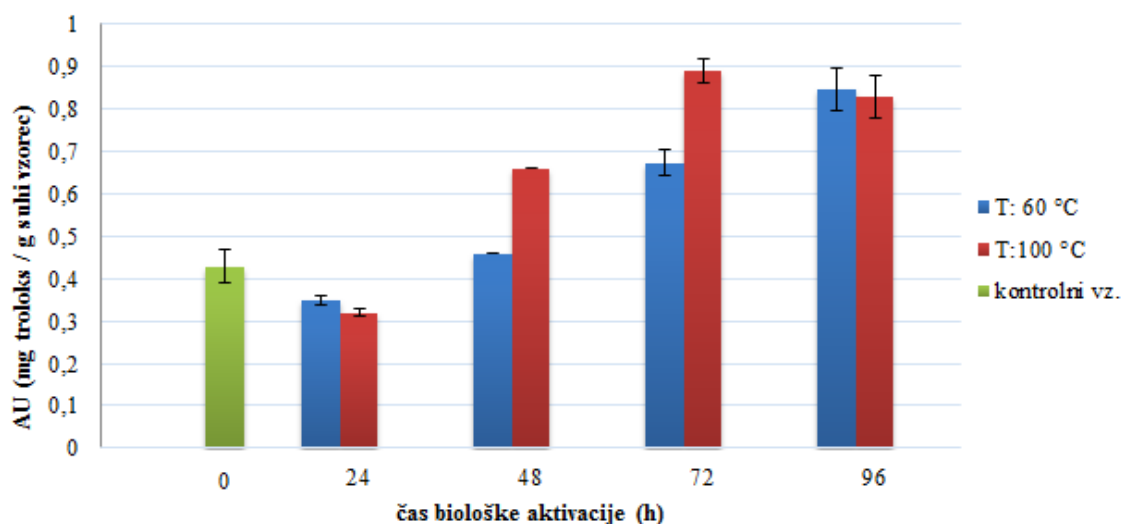
0, 24, 48, 72 – čas vzorčenja, 60 in 100 – temperatura sušenja (°C)

Iz podatkov v preglednici 2 lahko tudi razberemo, da bi dodatek enake količine neslajenih zrn in zrn slajenih pod različnimi pogoji bistveno vplival na AU. Ker se je pri prav vseh vzorčenjih izkazalo, da smo z metanolom uspeli pridobiti več antioksidantov, oz. je morebitna manjša količina ekstrahiranih antioksidantov izkazala boljše antioksidativno delovanje, lahko sklepamo, da k AU rženega slada prispevajo zlasti bolj polarne spojine, saj je metanol bolj polaren od etanola.

Določanje deleža suhe snovi v posameznih vzorcih je bilo delo druge študentke. Te smo uporabili za izračun AU podane na suho snov rženega slada. Tudi deleži suhe snovi v zrnih, slajenih pod različnimi pogoji, so zbrani v preglednici 2.

#### 4.1 VPLIV POGOJEV SLAJENJA NA ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST V METANOLNIH EKSTRAKTIH

Slika 6 prikazuje, kako se je spreminjala AU spojin, pridobljenih iz rženega slada s pomočjo metanola, v odvisnosti od časa biološke aktivacije in temperature sušenja.



Slika 6: Vpliv priprave rženega slada na antioksidativno učinkovitost spojin pridobljenih z metanolom.

##### 4.1.1 Vpliv časa kaljenja na antioksidativno učinkovitost rženega slada

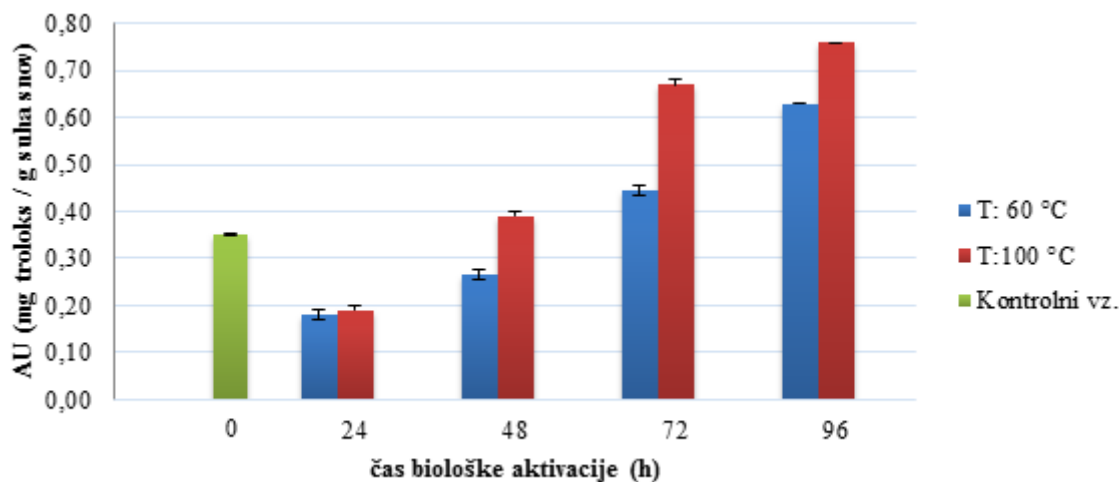
AU rženega slada je znašala od 0,32 do 0,89 mg troloks/g suha snov, odvisno od pogojev priprave. Čeprav je namakanje rženih zrn sprva negativno vplivalo na njihovo AU, smo ob naslednjem vzorčenju, ko smo zrna namočili še za 8 ur, nato pa zrna predstavili v kalilno komoro, že določili prvo povečanje vsebnosti antioksidantov. Po 72 urah od začetka eksperimenta je bila AU slada sušenega pri 100 °C za 106,9 % večja kot pred namakanjem. Medtem ko je AU rženih zrn sušenih pri 100 °C naraščala prvih 72 ur eksperimenta in se ob zadnjem vzorčenju zmanjšala za 6,7 %, smo pri milejših pogojih sušenja določili prirast AU skozi celoten potek poskusa (slika 6).

##### 4.1.2 Vpliv temperature sušenja slada na antioksidativno učinkovitost

Iz slike 6 razberemo, da so bile najmanjše razlike v AU slada glede na pogoje sušenja opazne po času 24 in 96 ur od začetka biološke aktivacije zrn. Pri tem so vzorci sušeni pri 60 °C, dosegli za 9,4 % (24 h) in za 2,4 % (96 h) višjo AU od tistih, ki so bili sušeni pri 100 °C. Po 48 urah je vsebnost antioksidantov pri temperaturi sušenja 60 °C narasla za 31,4 %, po 72 urah za 45,7 %, po 96 dneih pa za 26,9 %. Največjo AU smo izmerili v vzorcu, kjer smo kaljenje prekinili po 72 urah in zrna posušili pri 100 °C (0,89 mg troloks/g suhi vzorec).

## 4.2 VPLIV POGOJEV SLAJENJA NA ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST V ETANOLNIH EKSTRAKTIH

Slika 7 prikazuje, kako različni pogoji slajenja vplivajo na AU spojin, pridobljenih iz rženega slada s pomočjo etanola.



Slika 7: Vpliv priprave rženega slada na antioksidativno učinkovitost spojin pridobljenih z etanolom.

### 4.2.1 Vpliv časa kaljenja na antioksidativno učinkovitost rženega slada

Kontrolni vzorec je imel večjo AU v primerjavi z vzorcem po 24 urni biološki aktivaciji. Po 48 urah se je vsebnost antioksidantov začela povečevati in pri vzorcih, sušenih pri 100 °C, dosegla 11,4 % višjo vrednost od neslajenih zrn. Iz slike 7 opazimo, da je ne glede na pogoje sušenja vsebnost antioksidantov tekom štirih dni trajanja eksperimenta sorazmerno naraščala. Po treh dneh se je z razliko od začetka poizkusa, povečala za 25,7 % in po štirih dneh pa za 80,0 %, če smo kaljenje prekinili s temperaturo 60 °C. Višja temperatura sušenja (100 °C) je povzročila tvorbo še večje količine antioksidantov. Po treh dneh za 91,4 %, po štirih dneh pa za 117,1 % večjo AU v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

### 4.2.2 Vpliv temperature sušenja slada na antioksidativno učinkovitost

Vrednost AU vzorcev je obsegala vrednosti od 0,18 do 0,76 mg troloks/g suhi vzorec. Za vzorce sušene pri temperaturi 60 °C smo glede na ostale rezultate izmerili najnižje vrednosti AU (od 0,18 do 0,63 mg troloks/g suhi vzorec). Če med seboj primerjamo vrednosti med temperaturama sušenja, ugotovimo, da je bila AU po 48 urah kaljenja pri 100 °C za 44,4 % ter po 72 urah biološke aktivacije za 52,3 % večja kot pri temperaturi 60 °C (slika 7). V primerjavi z nekaljenimi semeni, se je AU zrn, ki smo jih kalili 72 ur in sušili pri 100 °C povečala za 91,4 %, kar predstavlja maksimalno doseženo vrednost za etanolne ekstrakte rženega slada.

### 4.2.3 Primerjava med topiloma: metanol in etanol

Kot je razvidno iz slik 6 in 7, je metanol bolj optimalen za ekstrakcijo fenolnih snovi iz rženega slada, kot če smo le-te pridobili s pomočjo etanola. Količine antioksidantov v metanolnih ekstraktih obsegajo vrednosti od 0,32 do 0,89 mg troloks/g suha snov. Za ekstrakcijo v etanolu pa so vrednosti nižje, in sicer od 0,18 do 0,76 mg troloks/g suha snov, vendar je pri tem pozitivno to, da vrednosti AU s časom sušenja naraščajo tekom vseh štirih dni.

### 4.3 RAZPRAVA

Pri metanolnih in etanolnih ekstraktih ima kontrolni vzorec večjo AU v primerjavi z enodnevnim (24 h) kaljenjem. To je lahko posledica namakanja zrn pred začetkom kaljenja. Predvidevamo lahko, da se je del fenolnih snovi raztopil v vodi, v kateri so se zrna namakala. Lahko je prišlo do polimerizacije fenolnih snovi z nižjo molekularno maso (Terpinc in sod., 2016). Do in sod. (2015) so poročali, da se lahko med namakanjem fenolne spojine, zlasti fenolne kisline, izločijo iz perikarpa in teste rži. Tvorijo so netopni kompleksi z beljakovinami, kar vpliva na njihovo ekstrakcijo. V pozni fazi kaljenja in /ali v zgodnji fazi sušenja se sintetizirajo encimi, ki spodbudijo sproščanje fenolnih spojin (fenolne kisline), ki so v zrnju vezane na lignin in arabinksilane. Avtorji omenjene raziskave navajajo tudi, da je AU slada nadalje odvisna od pogojev ekstrakcije, vključno z izbiro topila.

Prav tako kot so v študiji na ajdi (Terpinc in sod., 2016) in na rjavem rižu (Ti in sod., 2014) ugotovili, da proces slajenja oz. kaljenja vpliva na vsebnost fenolov in njihovo antioksidativno aktivnost, lahko na podlagi naših rezultatov enako trdimo za slajenje rži.

Raziskave, ki so jih izvajali Ondrejovič in sod. (2014) kažejo, da je izkoristek metanolnih ekstraktov višji pri sladu (od 3,3 do 10,7 %) kot pri žitih (pšenica, ječmen, oves), ki niso bila kaljena (od 2,3 do 7,6 %). Nasprotno pa postopek slajenja v študiji na koruzi ni vplival na povečanje vsebnosti antioksidantov (Foragasi in sod., 2015).

Ob kaljenju zrn nastajajo encimi, ki škrob razgradijo na enostavne sladkorje. Reducirani sladkorji imajo potencial za reakcijo z aminokislinami oz. za Maillardovo reakcijo. Kot produkti reakcije nastanejo melanoidi in reduktori, ki so prav tako znani po antioksidativnem delovanju (Do in sod., 2015). Zato ne preseneča, da smo tudi v naši raziskavi sladu, ki smo ga sušili pri višji temperaturi, določili višjo AU.

Vzrok za to, da se je v metanolnih ekstraktih vsebnost antioksidantov po štirih dneh (96 h) od začetka eksperimenta zmanjšala, je lahko tvorba bolj termolabilnih spojin, na katere je temperatura sušenja 100 °C vplivala negativno.

Kot optimalni čas biološke aktivacije zrn se je izkazal čas 72 ur, kar se ujema z raziskavo kaljenja kvinoje. Izboljšanje celotne količine antioksidantov je bilo v omenjeni raziskavi po 72 urah povezano s sočasnim povečanjem skupnih fenolnih spojin in flavonoidov ter s povečano količino produktov Maillardove reakcije (Abderrahim in sod., 2012).

Zavedati se je potrebno, da ni idealnega topila, ki bi bil v celoti zadovoljiv za ekstrakcijo skupnih antioksidantov, prisotnih v živilih, zlasti tistih, ki so povezani s kompleksnimi ogljikovimi hidrati in beljakovinami (Pérez-Jiménez in Saura-Calixto, 2008).

Ugotovitev glede boljše ekstrakcije fenolov v metanolu se sklada z raziskavo na ajdi (Sun T. in Ho C.-T., 2004), kjer je pri ocenjevanju z metodo DPPH• sicer najvišjo AU pokazal ekstrakt v acetonu, vendar se je za optimalno topilo za ekstrakcijo antioksidantov v ajdi izkazal metanol pri dveh od treh uporabljenih metodah za določanje AU. V nasprotju z rezultati naše raziskave, pa Liu O. in Yao H. (2007) v raziskavi na ječmenu ob uporabi metanola in etanola kot topila, nista ugotovila nobene bistvene razlike v izkoristku ekstrakcije.

Neposredne primerjave naših rezultatov z drugimi študijami niso popolnoma relevantne, saj smo uporabili drugačne pogoje slajenja ter metode za določanje AU. Prav tako en sam antioksidacijski test ne more ustrezno določiti aktivnosti vseh antioksidantov v kompleksnem sistemu žitnega zrna. Kot smo že omenili, obstajajo različni mehanizmi antioksidativnega delovanja, medtem, ko posamezen test običajno zajema samo enega.

## 5 SKLEPI

Na podlagi rezultatov eksperimentalnega dela lahko sklepamo sledeče:

- Slajena ržena zrna so bogat vir antioksidantov.
- Največjo AU ržena zrna dosežejo po 72 urah biološke aktivacije.
- Sušenje kaljenih zrn pri 100 °C je primernejše za tvorbo antioksidantov kot sušenje pri 60 °C.
- Metanol je bolj učinkovito topilo za ekstrakcijo antioksidantov iz rženega slada kot etanol.

Potrdili smo tudi obe hipotezi, da:

- daljši čas kaljenja pozitivno vpliva na AU, če smo ekstrakte pridobili s pomočjo etanola oz. le prvih 72 ur, če smo te pridobili s pomočjo metanola,
- AU rženega slada je močno odvisna od temperature sušenja in pogojev ekstrakcije.

V diplomskem delu smo ugotovili, da je slajenje rženih zrn primeren način povečanja vsebnosti antioksidantov. Z namenom vključevanja čim več koristnih bioaktivnih komponent v vsakdanja živila, lahko na podlagi naših raziskav zaključimo, da ima ržen slad potencial pri razvoju funkcionalnih živil. Pri tem je potrebno upoštevati optimalne pogoje, ki doprinesejo k dosegu največje AU.

## 6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo raziskovali vpliv različnih pogojev slajenja na AU rženega slada. Z uporabo spektrofotometrične metode DPPH• smo ugotavljali, kako so fenolne snovi v rži sposobne loviti proste radikale. Kot topilo za izluževanje teh snovi iz rastlinskega materiala, smo uporabili metanol in etanol ter primerjali njuno učinkovitost. Kot standard pri primerjavi rezultatov smo uporabili troloks in pripravili umeritveni krivulji za obe topili. Pri vseh vzorcih je kaljenje zrn pozitivno vplivalo na povečanje antioksidantov.

Vsebnost antioksidantov je bila večja pri vzorcih sušenih pri 100 °C, kot pri 60 °C. S časom biološke aktivacije zrn je AU slada sorazmerno naraščala, le ob zadnjem vzorčenju se je vsebnost antioksidantov zmanjšala, če smo te pridobili iz slada s pomočjo metanola. Z uporabo metanola se je iz zrn izlužilo več fenolnih snovi kot v etanolu. Največjo AU smo določili spojinam, ki smo jih iz rženega slada pridobili s pomočjo metanola, kjer smo zrna pred ekstrakcijo namakali in kalili 72 ur in jih sušili pri 100 °C (0,89 mg troloks/g suhi vzorec). Potrdili smo hipotezi, da daljši čas kaljenja poveča AU fenolnih snovi in da temperatura sušenja in pogoji ekstrakcije znatno vplivajo na AU ekstraktov.

Povzamemo lahko, da je pri slajenju slada pomembno zagotoviti in nadalje kontrolirati pogoje, ki omogočajo maksimalno tvorbo antioksidantov. S praktičnim delom smo ugotovili, da je z namenom povečanja AU bolj smiselno uporabiti slad, kot pa biološko neaktivirana ržena zrna. Ržen slad ima torej potencial, da se ga uporabi v živilih z namenom povečanja AU (npr. pri proizvodnji funkcionalnih živil v pekovski industriji).

## 7 VIRI

- Abderrahim F., Huanatico E., Repo-Carrasco-Valencia R., Arribas S. M., Gonzalez M. C., Condezo-Hoyos L. 2012. Effect of germination on total phenolic compounds, total antioxidant capacity, Maillard reaction products and oxidative stress markers in canihua (*Chenopodium pallidicaule*). *Journal of Cereal Science*, 56: 410-417
- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitičevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne snovi kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573-589
- Arendt E. K., Zannini E. 2013. *Cereal grains for the food and beverage industries*. Oxford, Woodhead Publishing: 485 str.
- Bondia-Pons I., Aura A.-M., Vuorela S., Kolehmainen M., Mykkänen H., Poutanen K. 2009. Rye phenolics in nutrition and health. *Journal of Cereal Science*, 49: 323-336
- Boulton C. 2013. *Encyclopaedia of brewing*. Chichester, John Wiley & Sons: 707 str.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30
- Bunaciu A. A., Aboul-Enein Y. H., Fleschin S. 2012. FTIR spectrophotometric methods used for antioxidant activity assay in medicinal plants. *Applied Spectroscopy Reviews*, 47, 4: 245-255
- Charalampopoulos D., Wang R., Pandiella S.S., Webb C. 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 131-141
- Do T. T. D., Cozzolino D., Muhlhausler B., Box A., Able A. J. 2015. Effect of malting on antioxidant capacity and vitamin E content in different barley genotypes. *Journal of Institut Brewing*, 121: 531-540
- Fogarasi A.-L., Kun S., Tankó G., Stefanovits-Bányai É., Hegyesné-Vecseri B. 2015. A comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts. *Food Chemistry*, 167: 1-6



- Hassani A., Procopio S., Becker T. 2016. Influence of malting and lactic acid fermentation on functional bioactive components in cereal-based raw materials: a review paper. *International Journal of Food Science and Technology*, 51: 14-22
- Kocjan Ačko D. 1999. Pozabljene poljščine. Ljubljana, Kmečki glas: 187 str.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitičevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-22
- Kovač B., Raspor P. 2000. Določanje antioksidativnega potenciala biomase filamentoznih gliv. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitičevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93-100
- Kreft I., Škrabanja V. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitičevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-37
- Kreis S. 2009. Malting. V: *Handbook of brewing: processes, technology, markets*. Eßlinger H. M. (ed.). Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 147-164
- Liang N., Kitts D. D., 2014. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19, 11: 19180-1920
- Litescu S.C., Eremia A.V.S., Diaconu M., Tache A., Radu G.L. 2011. Biosensors applications on assessment of reactive oxygen species and antioxidants. V: *Environmental biosensors*, Somerset V. (ed.). Rijeka, In Tech: 96-114
- Liu O., Yao H. 2007. Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry*, 102: 732-737
- Moongngarm A., Saetung N. 2010. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry*, 122: 782-788
- Nabim. 2017. Wheat structure. London, The Flour Milling Industry: 1 str.  
<http://www.nabim.org.uk/wheat-structure> (sep. 2017)

- Ondrejovič M., Chmelová D., Ivanišová E., Dráb Š., Psota V. 2014. Evaluation of antioxidant activities of cereals and their malts. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 13, 2: 172-181
- Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto. F. 2008. Antioxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. *International Journal of Food Science and Technology*, 43:185-191
- Pihlava J.-M., Nordlund E., Heiniö R.-L., Hietaniemi V., Lehtinen P., Poutanen K. 2014. Phenolic compounds in wholegrain rye and its fractions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38: 89-97
- Pisoschi A.M., Negulescu G.P. 2011. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 1: 106, doi: 10.4172/2161-1009.1000106: 10 str.
- Samaras T. S., Campurn 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
- Sun T., Ho C.-T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90: 743-749
- Terpine P., Cigić B., Polak T., Hribar J., Požrl T. 2016. LC-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. *Food Chemistry*, 210: 9-17
- Ti H., Zhang R., Zhang M., Li Q., Wei Z., Zhang Y., Tang X., Deng Y., Liu L., Ma Y. 2014. Dynamic changes in the free and bound phenolic compounds and antioxidant activity of brown rice at different germination stages. *Food Chemistry*, 161: 337–344
- Wang T., Hea F., Guibing Chena G. 2014. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7: 101-111
- Yang F., Basu T. K., Oraikul B. 2001. Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52: 319-330

## ZAHVALA

V prvi vrsti se zahvaljujem doc. dr. Petri Terpinc, da je sprejela vlogo mentorice. Z izkazano potrpežljivostjo in s spodbujanjem pri eksperimentalnem delu ter s kritičnimi popravki diplomskega dela, je prispevala k uspešnemu dokončanju zastavljenega cilja.

Hvala študentkam Ani Glibota, Tini Strahan, Suzani Filipič in Ivani Polak za pomoč in sodelovanje pri pripravi vzorcev in pri morebitnih potrebnih razlagah pri eksperimentalnem delu.

Zahvaljujem se tudi izr. Prof. dr. Lei Pogačnik za hitro recenzijo diplomskega dela.

Hvala sestri Mirjam za nasvete pri pisanju diplomskega dela ter za spodbudne besede, ki sem jih bila deležna ob ravno pravem času.

Hvala Ervinu, da mi je ves čas stal ob strani in verjel vame.

Zahvaljujem se staršema za njuno podporo in ker sta mi omogočila študij na fakulteti.