

# Određivanje elektrokinetičkog potencijala polifenola iz jabuke, beta-glukana i modela polifenol - beta-glukan

---

Trputac, Eva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:512398>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**PREHRAMBENO - TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Eva Trputac

**ODREĐIVANJE ELEKTROKINETIČKOG POTENCIJALA POLIFENOLA IZ  
JABUKE,  $\beta$ - GLUKANA I MODELA POLIFENOL- $\beta$ - GLUKAN**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, srpanj 2020.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju  
Katedra za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

## Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Fizikalna kemija

**Tema rada** je prihvaćena na IV. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 30. siječnja 2020.

**Mentor:** dr. sc. *Ivana Tomac, znan. sur.*

**Komentor:** prof. dr. sc. *Lidija Jakobek Barron*

## Određivanje elektrokinetičkog potencijala polifenola iz jabuke, $\beta$ -glukana i modela polifenol- $\beta$ -glukan

*Eva Trputac, 0113142332*

### Sažetak:

Elektrokinetički potencijal odnosno zeta-potencijal je fizikalno svojstvo izraženo na površini makromolekule ili materijala. Poznavanje zeta-potencijala može predvidjeti dugoročno najstabilnije ponašanja neke makromolekule. Potencijal na udaljenosti plohe smicanja naziva se elektrokinetički zeta-potencijal. O zeta-potencijalu i naboju na površini makromolekule ovisi njezina stabilnost. Stoga je zadatak ovog diplomskog rada odrediti zeta-potencijal polifenola iz mesa i kore jabuke, otopine  $\beta$ -glukana i modela polifenola iz mesa jabuke i  $\beta$ -glukana te modela polifenola iz kore jabuke i  $\beta$ -glukana kroz različiti koncentracijski raspon, a s ciljem određivanja najstabilnijeg ponašanja modela polifenola iz mesa jabuke i  $\beta$ -glukana te modela polifenola iz kore jabuke i  $\beta$ -glukana pri različitim pH vrijednostima.

**Ključne riječi:** elektrokinetički potencijal, apsorpcijski spektar, jabuka, polifenoli,  $\beta$ -glukan

**Rad sadrži:** 42 stranice  
27 slika  
1 tablicu  
40 literaturne reference

**Jezik izvornika:** Hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. doc. dr. sc. <i>Valentina Bušić</i>        | predsjednik   |
| 2. dr. sc. <i>Ivana Tomac, znan. sur.</i>     | član-mentor   |
| 3. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i> | član-komentor |
| 4. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>         | zamjena člana |

**Datum obrane:** 17. srpanj 2020.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Applied Chemistry and Ecology  
Subdepartment of Applied Chemistry and Instrumental Methods  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Physical Chemistry

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 4 held on January 30, 2020).

**Mentor:** *Ivana Tomac*, PhD

**Co-mentor:** *Lidija Jakobek Barron*, PhD, prof.

### Determination of Electrokinetic Potential of Apple Polyphenols, $\beta$ -Glucan and Polyphenol - $\beta$ -Glucan Model

*Eva Trputac, 0113142332*

#### Summary:

Electrokinetic potential or zeta potential is a physical property expressed on the surface of a macromolecule or material. Knowledge of the zeta potential can predict the long-term stable behaviour of a macromolecule. The potential at the shear plane distance is called the electrokinetic zeta potential. The zeta potential and the charge on the surface of a macromolecule depend on its stability. Therefore, the aim of this work was to determine the zeta potential of apple peel and meat polyphenols,  $\beta$ -glucan solution and apple peel polyphenols and  $\beta$ -glucan model, and apple meat polyphenols and  $\beta$ -glucan model through different concentration ranges, with the aim of determining the most stable behaviours of apple polyphenols and  $\beta$ -glucan model at different pH values.

**Key words:** electrokinetic potential, absorption spectra, apple, polyphenol,  $\beta$ -glucan

**Thesis contains:** 42 pages  
27 figures  
1 table  
40 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Valentina Bušić</i> , PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. <i>Ivana Tomac</i> , PhD                      | supervisor   |
| 3. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, prof.     | member       |
| 4. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof.             | stand-in     |

**Defense date:** July 17<sup>th</sup>, 2020

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

*Zahvaljujem najviše mojim roditeljima Branki i Darku te sestri Ivi na ljubavi i podršci koju su mi pružili tijekom mog studiranja. Hvala Vam na svakoj riječi potpore i na svemu što ste učinili kako bi mi omogućili završetak studija!*

*Nadalje, zahvaljujem mojoj mentorici dr.sc. Ivani Tomac na razumijevanju, strpljenju, pomoći, prenesenom znanju i vještinama tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama, posebno prijateljici Antoneli, jer su vjerovali u mene, bili mi podrška i uljepšali mi ove godine studiranja.*

*Također, hvala svim zaposlenicima Prehrambeno – tehnološkog fakulteta na pomoći i prenesenom znanju tijekom studiranja.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Jabuka .....	4
2.2. Polifenoli .....	4
2.3. Prehrambena vlakna i $\beta$ -glukan .....	7
2.4. Elektrokinetičke pojave .....	9
2.5. Zeta potencijal .....	11
2.6. UV-Vis spektroskopija .....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
3.1. Zadatak rada .....	19
3.2. Materijali i metode .....	19
3.2.1. Kemikalije .....	19
3.2.2. Priprema uzorka .....	19
3.2.3. Ekstrakcija polifenola iz jabuka potpomognuta ultrazvukom .....	19
3.2.4. Primjena spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode za određivanje ukupnih polifenola .....	20
3.2.5. UV-Vis apsorpcijski spektar .....	20
3.2.6. Zeta potencijal .....	20
4. REZULTATI .....	22
4.1. Spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda određivanja ukupnih polifenola .....	23
4.2. UV-Vis apsorpcijski spektri .....	24
4.2.1. UV-Vis apsorpcijski spektri polifenola kore i mesa jabuke .....	24
4.2.2. UV-Vis apsorpcijski spektri modela polifenola kore jabuke i $\beta$ – glukana .....	25
4.2.3. UV-Vis apsorpcijski spektri modela polifenola mesa jabuke i $\beta$ – glukana .....	27
4.3. Zeta potencijal polifenola iz kore i mesa jabuke i modela polifenola jabuke i $\beta$ -glukana .....	30

4.3.1. Zeta potencijal polifenola kore i mesa jabuke o različitom pH pufera .....	30
4.3.2. Zeta potencijal modela polifenola kore jabuke i $\beta$ – glukana o različitom pH pufera u vremenu	31
4.3.3. Zeta potencijal modela polifenola mesa jabuke i $\beta$ – glukana o različitom pH pufera u vremenu	32
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČAK.....	37
7. LITERATURA .....	39

Ovaj diplomski rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost  
projektom IP-2016-06-6777.



## Popis oznaka, kratica i simbola

$I$  – intezitet svjetla koji je prošao kroz uzorak

$I_0$  – intezitet upadnog svjetla

$\lambda$  – valna duljina (nm)

$R^2$  – koeficijent determinacije

$\zeta$  – elektrokinetički (zeta) potencijal (mV)

UV – ultraljubičasto zračenje (eng. *ultraviolet spectroscopy*)

Vis – vidljiv dio spektra (eng. *visible spectroscopy*)

IR – infracrveno zračenje (eng. *infrared spectroscopy*)

## **1. UVOD**

Polifenoli su jedna od najvećih skupina fitokemikalija i najzastupljeniji su u biljkama. Unosom hrane bogatom polifenolnim spojevima uočen je mogući pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi kao što je antiupalni utjecaj i utjecaj na prevenciju bolesti krvožilnog sustava (Quiros – Saucedo i sur., 2014). Do danas, poznato je više od 8000 različitih spojeva, a dijele se na hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavonoide, stilbene i lignine.

Jabuka je višegodišnja biljka iz porodice ruža, koja sadrži ugljikohidrate (glukozu i fruktozu), vodu, bjelančevine i biljna vlakna, organske kiseline (limunsku i jabučnu kiselinu), vitamine B skupine, vitamin C, vitamin E, karotenoide, aromatične i mineralne tvari (kalcij, kalij, magnezij, željezo i fosfor). Polifenoli iz jabuka imaju važnu ulogu u nutritivnim, organoleptičkim i prodajnim svojstvima voćke i proizvodima. Odgovorni su za gorčinu, aromu i oporost ploda.

Prehrambena vlakna su vlakna koja se u probavnom sustavu pomoću probavnih enzima ne mogu u potpunosti razgraditi. Razlikuju se topljiva i netopljiva prehrambena vlakna. Poznato je da prehrambena vlakna mogu poboljšati funkciju stanice, djeluju kao imunostimulansi te imaju značajan zaštitni utjecaj na ljudski organizam (El Khoury i sur., 2011).  $\beta$ -glukan je polisaharid koji pripada skupini topljivih prehrambenih vlakana. Izvor  $\beta$ -glukana su pšenica, zob, ječam i stanična stjenka kvasaca, gljiva, algi i nekih bakterija.

Posljednjih nekoliko godina razvijene su različite metode za karakterizaciju polifenola iz namirnica kao što su spektroskopske, kromatografske, elektrokemijske metode i slično. Ultraljubičasta (UV) i vidljiva (Vis) spektroskopija temelji se na pobuđivanju molekula iz osnovnog u pobuđeno stanje. Područje mjerenja spektrofotometra za ultraljubičasto zračenje je od 200 nm do 380 nm, a za vidljiv dio spektra područje mjerenja je od 380 nm do 780 nm (Pavia i sur., 2001).

Elektrokinetički ili zeta potencijal je jedan od glavnih svojstava složenih sustava, a definira se kao razlika potencijala koja se javlja kao posljedica relativnog gibanja jednog sloja makromolekule prema drugome (Salopek i sur., 1992).

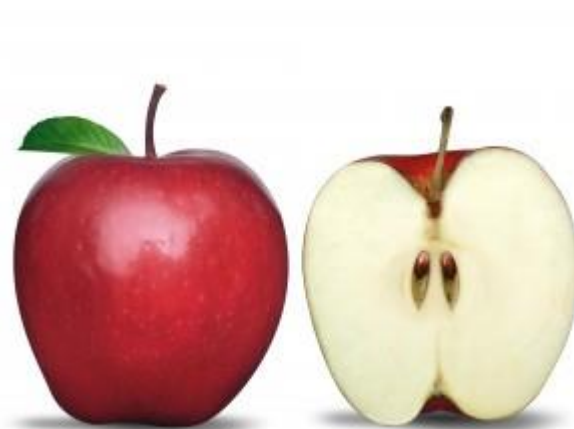
Stoga je zadatak ovog diplomskog rada odrediti zeta-potencijal polifenola iz mesa i kore jabuke, otopine  $\beta$ -glukana i modela polifenola iz mesa jabuke i  $\beta$ -glukana te modela polifenola iz kore jabuke i  $\beta$ -glukana kroz različiti koncentracijski raspon, a s ciljem određivanja najstabilnijeg ponašanja modela polifenola iz mesa jabuke i  $\beta$ -glukana te modela polifenola iz kore jabuke i  $\beta$ -glukana pri različitim pH vrijednostima.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Jabuka

Jabuka je višegodišnja biljka iz porodice ruža (*Malus domestica* Borkh.). Stablo jabuke čini korijen, deblo i krošnja. Iz pupova jabuke razvijaju se pojedini biljni organi. Razlikuju se vegetativni pupovi iz kojih se razviju korijen, lišće i mladice te generativni pupovi iz kojih se razvija cvijet i cvat.

List je vegetativni organu kojem se odvija fotosinteza, transpiracija i disanje. Smatra se da je list osnovni organ gdje se stvara organska tvar te je važan za kvalitetu plodova i plodnost. Plodovi se razlikuju prema obliku, boji, veličini, teksturi, vremenu sazrijevanja, nutritivnom sastavu. Građa ploda jabuke sastoji se od peteljke, kore, mesnog usplođa, sjemene lože, sjemenke i čaške (Lončarić, 2014). Na **Slici 1** prikazan je presjek ploda jabuke.



**Slika 1** Presjek ploda jabuke

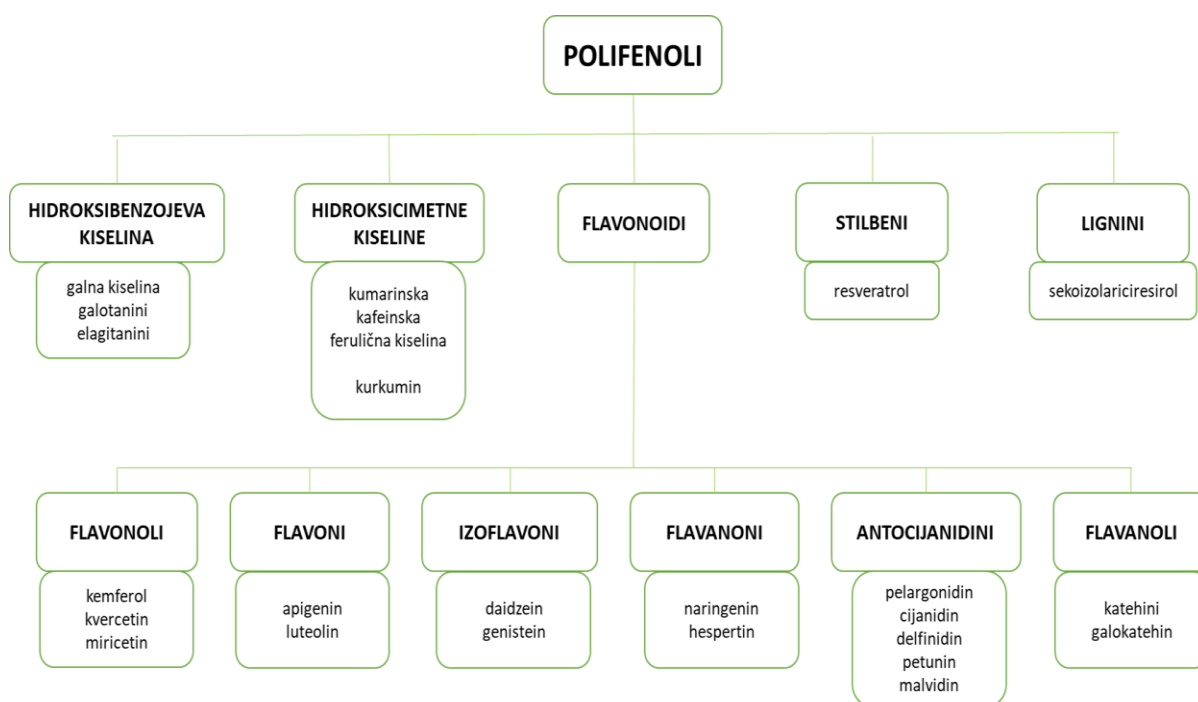
(WEB 1)

Plod jabuke sadrži oko 14% ugljikohidrata (glukoze i fruktoze), oko 85% vode, 0,26% bjelančevina i biljnih vlakana oko 2,4%. Zatim sadrži organske kiseline (limunsku i jabučnu kiselinu), vitamine B skupine, vitamin C, vitamin E, karotenoide te aromatične tvari. Mineralne tvari prisutne u plodu jabuke su kalcij, kalij, magnezij, željezo i fosfor (Ljubisavljević, 1989).

## 2.2. Polifenoli

Polifenolni spojevi su široko rasprostranjena skupina spojeva u biljkama. Predstavljaju sekundarne metabolite biljaka. Do danas, poznato je više od 8000 različitih spojeva. Polifenolni spojevi podijeljeni su na hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavonoide,

stilbene i lignine. Nadalje, flavonoidi se dijele na flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocijane i flavanole (**Slika 2**) (Jakobek, 2007; Hardman, 2014).



**Slika 2** Klasifikacijapolifenola i primjeri polifenola pojedinih grupa

(Hardman, 2014; Vermerris i Nicholson, 2006)

Polifenoli su građeni od aromatskog prstena koji na sebi nosi jednu ili više hidroksilnih skupina te imaju sposobnost povezivanja s različitim organskim molekulama (ugljikohidrati, lipidi, organske kiseline) i s komponentama stanične stjenke (celuloza, hemiceluloza). Prisutni su u svim dijelovima biljaka te imaju važnu ulogu u fiziologiji biljke i zaštite biljke od patogena. Namirnice bogate polifenolnim spojevima su voće, žitarice, orašasti plodovi te vino, čaj, pivo i slično. Hrana bogata fenolnim spojevima ima vjerojatno pozitivne učinke na zdravlje ljudi (sprječavanje upalnih procesa i nekih kroničnih bolesti) te moguća snažna antioksidativna svojstva i sposobnost vezanja slobodnih radikala koji štite protiv oksidativnog oštećenja važnih molekula u ljudskom organizmu (Quiros – Saucedo i sur., 2014).

Polifenoli iz jabuke imaju važnu ulogu u hranjivim, organoleptičkim i prodajnim svojstvima ploda. Također, zaslužni su za aromu, gorčinu i oporost ploda jabuke, dok u proizvodima od jabuke kao što je sok, uključeni su u nastanak mutnoće i taloga te nastanak boje pri reakcijama posmeđivanja (Alonso-Salces i sur., 2004).

Najznačajnije grupe polifenola prisutne po sadržaju u jabukama su flavanoli (katehini) i procijanidini, dihidrokalkoni (floretinlukozidi), hidroksicimetne kiseline i antocijanini (cijanidinglukozidi) (Alonso-Salces i sur., 2004; Jakobek i sur., 2020).

Hidroksicimetna kiselina je najviše prisutna u vanjskim dijelovima zrelog voća te je češće prisutna u prirodi od hidroksibenzojeve kiseline. Koncentracija im opada tijekom dozrijevanja voća, a povećava se s veličinom ploda. Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u biljkama su *p* – kumarinska, kafeinska, ferulična i sinapična kiselina, a prisutne su kao esteri (Jakobek, 2007).

Hidroksibenzojeva kiselina ima strukturu koja potječe direktno od benzojeve kiseline ( $C_6 - C_1$ ). Prisutne su kao konjugirane kiseline sa šećerima i organskim kiselinama, a samo u nekim vrstama voća mogu se javiti u slobodnom obliku. Najviše se oslobađaju tijekom procesiranja voća i povrća. Najznačajnije hidroksibenzojeve kiseline su *p* – hidroksibenzojeva, siringinska, vinilinska, protokatehinska, elaginska i galna kiselina (Jakobek, 2007).

Dihidroksikalkon ima otvorenu strukturu i različit broj ugljičnih skeleta (Tomas-Barberan i sur., 2000) te je po sadržaju najviše prisutan u mesu jabuke. Autori Masumoto i suradnici(2009) i Kobori i suradnici(2012) u svojim istraživanjima ispitali su pozitivan učinak dihidroksikalkona na dijabetes i smanjenje razine glukoze u krvi.

Smatra se da su flavonoidi najveća skupina polifenolnih spojeva, oko 5000 različitih vrsta, a građeni su od tri fenolna prstena. U prirodi su najviše zastupljeni u obliku glikozida odnosno imaju povezane strukture šećera što doprinosi njihovoj raznolikosti i velikom broju spojeva. Najčešće vezani šećer je glukoza, zatim galaktoza, arabinoza, ramnoza i slično. Vezanjem šećera dolazi do povećanja polarnosti molekule flavonoida što je potrebno za pohranjivanje tih spojeva u vakuolama stanica biljaka. Mogu se naći u svim dijelovima biljke, ali prema količini su različito raspodijeljeni u biljnom organu. Raznovrsnost ovisi o zrelosti biljke, klimi, načinu uzgoja, genetici same biljke (Belitz i sur., 2009; Jakobek, 2007).

Flavanoli su polifenolni spojevi koji pripadaju skupini flavanoida te ih karakterizira flavonoidna struktura  $C_6 - C_3 - C_6$ . Jedinice flavanola mogu se povezati u polimerne jedinice te tako tvoriti proantocijanidine i tanine. Najpoznatiji flavanoli su katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin te esteri galne kiseline: epikatehingalat i epigalokatehingalat (Jakobek, 2007). Osnovna struktura flavanola je  $C_6 - C_3 - C_6$ , a u stanicama se isključivo pojavljuju kao glikozidi gdje se šećer veže na C-3 atom, a rijetko na C-7 atom (Belitz i sur., 2009). Najčešće vezani šećer

je glukoza, zatim arabinoza, ramnoza, galaktoza i ksilioza. Pojavljuju se u nadzemnim dijelovima biljaka, a najčešći flavonoli su kvercetin, miricetin, kemferol. Ovi flavonoli daju žutu boju i slabo su topljivi u vodi (Jakobek, 2007).

Antocijanini su spojevi koji pripadaju skupini flavonoida s karakterističnom formulom  $C_6 - C_3 - C_6$ . Topljivi su u vodi, a voću, povrću i cvijeću daju crvenu, plavu i purpurnu boju koja ovisi o pH otopine u kojoj se nalaze (Belitz i sur., 2009). Antocijanini nastaju vezanjem šećera (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza) na antocijanidine. Antocijanini mogu biti acilirani s različitim hidroksicimetnim i alifatskim kiselinama (oksalna, octena, jabučna). Antocijanini kao nositelji pigmenata, u prehrambenoj industriji se upotrebljavaju kao boja u različitim prehrambenim proizvodima (Jakobek, 2007).

### 2.3. Prehrambena vlakna i $\beta$ -glukan

Prehrambena vlakna ubrajaju se u skupinu makronutrijenata uz ugljikohidrate, proteine, masti, masne kiseline, aminokiseline, kolesterol i slično (Vranešić - Bender i sur., 2008).

Prema Američkom društvu za kliničku kemiju (AACC) i DeVries i suradnicima (1999), prehrambena vlakna definiraju se kao ostatci jestivih dijelova biljaka i određenih vrsta ugljikohidrata koji su otporni na probavu i apsorpciju u tankome crijevu čovjeka te s potpunom ili djelomičnom fermentacijom u debelome crijevu. Polisaharidi, izuzevši škrob, smatraju se glavnim vlaknima te se mogu klasificirati u dvije skupine prema topljivosti:

- topljiva vlakna ( $\beta$ -glukan, gume, pektini i sl.) i
- netopljiva vlakna (lignin, celuloza i hemiceluloza) (Quiros- Saucedo i sur., 2014).

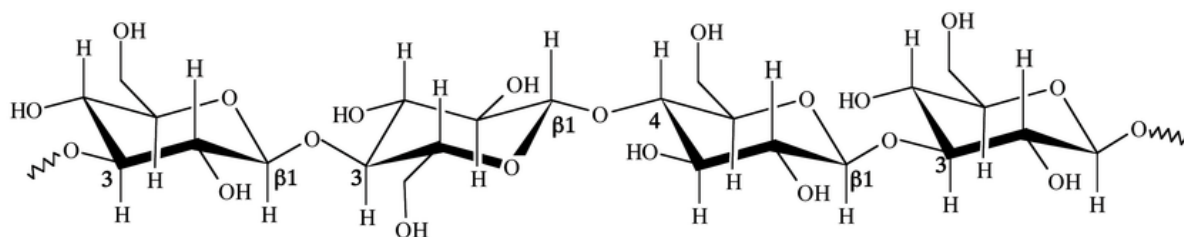
Smatra se da prehrana bogata složenim ugljikohidratima i prehrambenim vlaknima smanjuje pretilost kod ljudi te iz toga proizlazi da povećanjem unosa prehrambenih vlakana i kontroliranim unosom energije dolazi do značajnog osjećaja sitosti nakon obroka (Vranešić - Bender i sur., 2008).

Stoga su vlakna važna u ljudskoj prehrani jer mogu sudjelovati u gastrointestinalnoj pokretljivosti, uključujući metabolizam lipida i glukoze te mogu poticati probavu. Imaju pozitivne učinke na kardiovaskularno zdravlje, dijabetes, imunološki sustavi slično (Guillon i sur., 2011).

$\beta$  - glukan je polisaharid koji pripada skupini topljivih vlakana. Sastavljen je od jedinica D - glukoze povezane  $\beta$  - (1 - 3) glikozidnom vezom, a na mjestima grananja moguće je povezivanje i s  $\beta$  - (1 - 6) glikozidnim vezama (**Slika3**).  $\beta$  - glukan se može nalaziti u



alueronskom sloju i endospermu nekih žitarica (pšenica, zob, ječam) te u staničnim stjenkama kvasaca, gljivica, algi i nekih bakterija (El Khoury i sur., 2011; Jakobek i sur., 2017).



**Slika 3** Strukturna formula  $\beta$ -glukana (WEB 2)

Studije su pokazale da  $\beta$  – glukana može poboljšati funkcije i reakcije stanica, djeluje kao imunostimulans. Smatra se da kod dijabetičara poboljšava osjetljivost na inzulin te smanjuje postprandijalni odgovor (El Khoury i sur., 2011).

$\beta$  – glukana ima pozitivan utjecaj u sprječavanju kardiovaskularnih bolesti jer smanjuje količinu ukupnog i LDL – kolesterola u krvi (Reiner, 2008). Prehrana bogata vlaknima utječe na smanjenje pretilosti kod ljudi, jer osobe koje konzumiraju hranu bogatu prehranbenim vlaknima unose smanjenu količinu energije i takva prehrana izaziva osjećaj sitosti, jer topljiva prehranbena vlakna imaju mogućnost vezanja vode (El Khoury i sur., 2011).

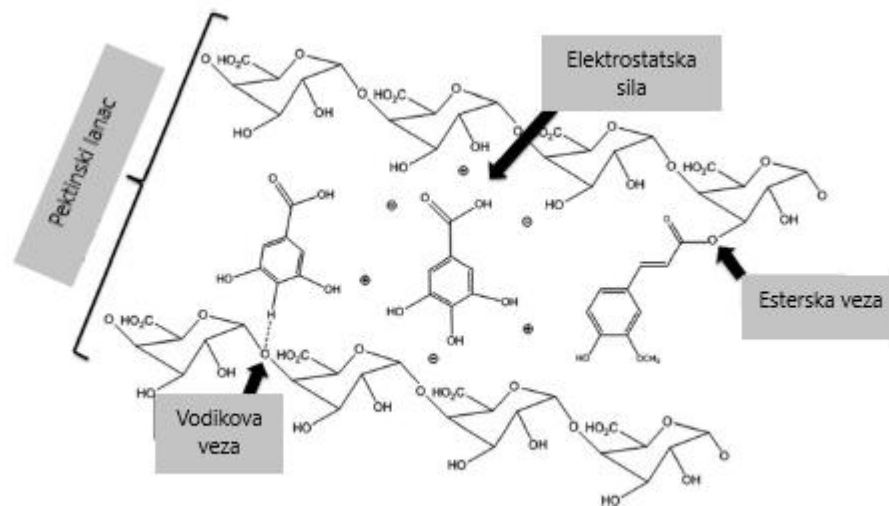
Weza između polifenolnih spojeva i  $\beta$ -glukana proučavala se odvojeno zbog njihove razlike u kemijskoj strukturi, metaboličkim putovima i biološkim svojstvima (Quiros – Saucedo i sur., 2014).

Povezivanje polifenolnih spojeva s prehranbenim vlaknima odvija se tijekom zrenja ploda, prerade hrane ili tijekom probavnih procesa. Ova spoznaja se može primijeniti u prehranbenoj industriji s ciljem proizvodnje hrane s poboljšanim bioaktivnim i tehnološkim svojstvima. Također, apsorpcija spojeva u probavnom traktu ovisi o prirodnom stanju hrane i mikrostrukturi prerađene hrane (Quiros – Saucedo i sur., 2014).

Za vezanje polifenola na vlakna, važna je kemijska struktura polifenola. Polifenolni spojevi u svojoj strukturi sadrže hidrofilne hidroksilne skupine (sudjeluju u stvaranju veza) i hidrofobni aromatski prsten. Između prehranbenih vlakana i polifenolnih tvari moguće su tri vrste veza, a prikazane su na **Slici 4**:

- kovalentna veza (esterska veza između polifenola i prehranbenog vlakna),

- ionske veze između negativno i pozitivno nabijenih skupina na polifenolima i prehrambenim vlaknima i
- vodikove veze koje se javljaju između parcijalno pozitivnog vodika jedne grupe i parcijalno negativnog kisika druge grupe (Quiros – Saucedo i sur., 2014).



**Slika 4** Veze između prehrambenih vlakana i fenolnih kiselina

(Quiros – Saucedo i sur., 2014)

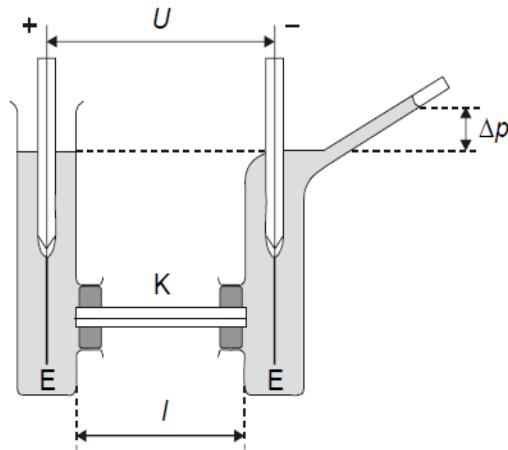
## 2.4. Elektrokinetičke pojave

Dodirivanjem dvaju električki nabijenih tijela i djelovanjem električnog polja okomito na površinu njihova kontakta moguće je da dođe do gibanja tih tijela. Pozitivno nabijeno tijelo će se gibati prema negativnom polu, a negativno nabijeno tijelo gibat će se prema pozitivnom polu električnog polja. Ova pojava se naziva elektrokinetička pojava (Metikoš – Huković, 2000).

### Elektroosmoza

Elektroosmoza je pojava gibanja tekućine kroz uske kapilare i porozne sredine pod djelovanjem električnog polja. Na **Slici 5** je prikazan uređaj za elektroosmozu, uređaj se sastoji od uske kapilare preko koje su spojene dvije posude i dvije elektrode od platine. Ulijevanjem čiste vode dolazi do izmjene naboja između stjenki kapilare i vode. Površina stakla se ionizira i hidratizira te otpušta  $H_3O^+$  ione u otopinu i postaje negativno nabijena. Kada se kroz elektrode pusti napon, pozitivno nabijena otopina gibat će se prema negativnom polu, odnosno doći će do prijelaza tekućine iz jedne posude u drugu. Tekućina će se kretati prema posudi s

negativnom elektrodom sve dok se razina tekućine ne podigne toliko da će ju hidrostatski tlak pogurati u suprotnom smjeru. Hidrostatski tlak koji zaustavlja elektroosmotski tok tekućine naziva se elektroosmotski tlak (Metikoš – Huković, 2000).



**Slika 5** Uređaj za elektroosmozu

(Metikoš – Huković, 2000)

### **Potencijal strujanja**

Potencijal strujanja je pojava suprotna elektroosmozi. Koristi se uređaj prikazan na **Slici 5**. Kroz elektrode ne propušta se napon i koristi se voltmetar. Tekućina se pomoću tlaka prisilno potiskuje kroz kapilaru iz jednog prostora u drugi. Primjenom tlaka u jednom prostoru na voltmetru se može očitati napon koji će odgovarati razlici električnih potencijala između dvaju elektroda te ta dobivena vrijednost je potencijal strujanja (Metikoš – Huković, 2000).

### **Elektroforeza**

Elektroforeza je tehnika za separaciju i analizu koloida na temelju njihovog gibanja pod utjecajem električnog polja. Pozitivne čestice će putovati prema negativnom polu, a negativne čestice prema pozitivnom polu elektrode. Brzina gibanja ovisi o osobinama čestica kao što su naboj čestice, veličina i oblik koloidne čestice te jakost električnog polja (Jakobek, 2020).

### **Dornov efekt**

U cilindru se nalazi suspenzija neke tvari dispergirane u vodi i ta suspenzija se istaloži, nakon uranjanja metalnih elektroda između vrha i dna stupca suspenzije voltmetar će pokazati razliku potencijala. Dornov efekt je suprotan od efekta elektroforeze, a nastaje zato što nabijene čestice prilikom kretanja pod utjecajem gravitacije za sobom ostavljaju solvatacijsku

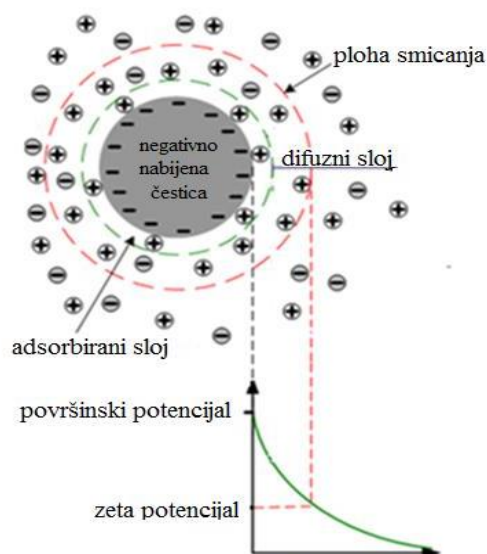
sferu suprotnog naboja od naboja suspendirane čestice i na taj način se naboji odjeljuju te se ostvaruje razlika potencijala i odgovarajuće električno polje (Metikoš – Huković, 2000).

## 2.5. Zeta potencijal

Zeta potencijal ( $\zeta$ ) jedan je od glavnih svojstava složenih sustava, a definira se kao naboj koji se javlja na čestici makromolekule. Zeta potencijal (**Slika 6**), predstavlja razliku potencijala koja se javlja kao posljedica relativnog gibanja jednog sloja makromolekule prema drugom (Salopek i sur., 1992).

Većina makromolekula u vodenim otopinama nosi električni naboj te povećanjem koncentracije suprotno nabijenih iona blizu površine rezultira formiranjem električnog dvosloja. Dvosloj se sastoji od unutrašnjeg (Sternov sloj) i vanjskog dijela (difuzni sloj). Za unutrašnji dio sloja ioni su čvrsto vezani dok za vanjski dio su slabije vezani. Unutar vanjskog sloja postoji zamišljena granica na kojoj su ioni i čestice formirali stabilan oblik. Pomicanjem čestice makromolekule zbog utjecaja elektroforeze dolazi i do pomicanja iona unutar granice. Potencijal na toj granici odnosno na površini hidrodinamičkog smicanja naziva se zeta potencijal (Piljac, 2006; Kaszuba i sur., 2010).

Opća granica između stabilnog i nestabilnog sustava je ili +30 mV ili -30 mV. Čestice s zeta potencijalom većim od +30 mV ili manjim -30 mV smatraju se stabilnima jer imaju naboj. Međutim, ako se vrijednost zeta potencijala kreće od 0 mV do +5 mV smatra se da je čestica neutralna te zbog toga je podložna destabilizaciji (Hunter, 1981; Cano-Sarmiento i sur., 2018).



**Slika 6** Zeta potencijal (WEB 3)

### **Utjecaj pH na zeta potencijal**

Zeta potencijal varira ovisno o pH i postaje više negativan, odnosno pozitivan. Ako je zeta potencijal negativan i takvoj molekuli se doda lužina, zeta potencijal će se povećavati odnosno bit će još negativniji. Zatim, ako se takvoj molekuli doda kiselina, zeta potencijal će se smanjivati, odnosno približavati izoelektričnoj točki u kojem je molekula neutralna, nestabilna i podložna koagulaciji (Bhattacharjee, 2016).

### **Utjecaj ionske snage na zeta potencijal**

Povećanjem ionske snage električni dvosloj postaje komprimiraniji, a time se i zeta potencijal smanjuje, i obrnuto. Zeta potencijal isto tako ovisi i o valenciji iona, tako kod iona s većim valencijama ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) dolazi do većeg komprimiranja dvostrukog sloja, a s time i do smanjenja zeta potencijala (Bhattacharjee, 2016).

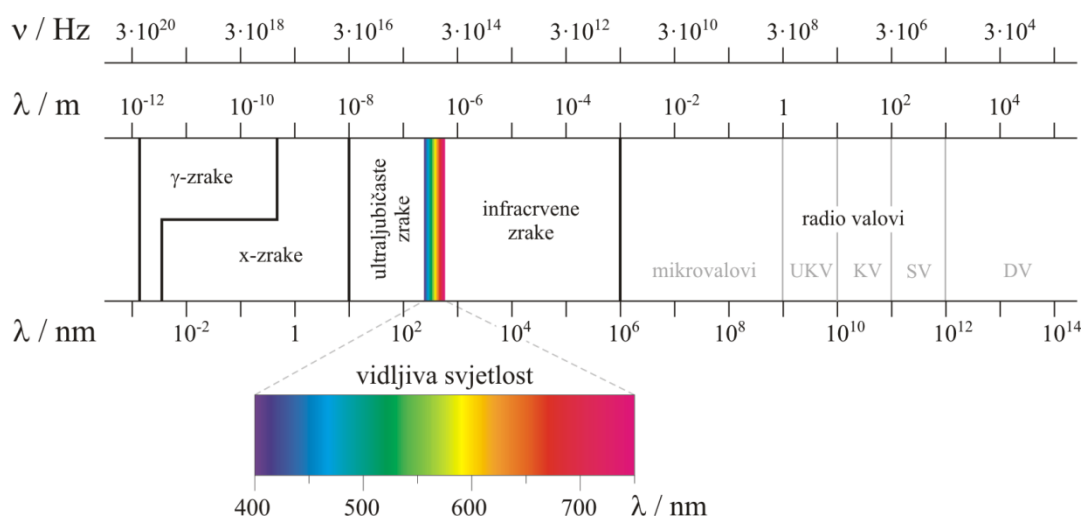
### **Utjecaj koncentracije na zeta potencijal**

Uzorci za mjerenje zeta potencijala moraju biti optički jasni, što znači da pri višim koncentracijama otopina dolazi do njihova zamućenja što dovodi do smanjena prijenosa svjetlosti i daje nepouzdan rezultate. Maksimalna koncentracija pri kojoj se može mjeriti zeta potencijal ovisi o veličini čestica i optičkim svojstvima (Kaszuba i sur., 2010). U otopinama u kojima je prisutna mala koncentracija otopljene tvari, smatra se da dominira površinska adsorpcija i da povećanjem koncentracije dolazi do povećanja i zeta potencijala (Bhattacharjee, 2016).

## **2.6. UV-Vis spektroskopija**

Spektroskopija je grana znanosti koja se bavi svjetlošću. Temelji se na proizvodnji, mjerenju i interpretaciji spektra koji nastaje zbog interakcije između elektromagnetskog zračenja s materijalom. Spektroskopske metode primjenjuju se u analizi hrane za kvantitativnu i kvalitativnu analizu. Spektroskopija se bavi proučavanjem elektromagnetskih zračenja kao što su ultraljubičasto (UV), vidljiv dio spektra (Vis), infracrveno (IR), mikrovalno, radio frekvencijsko zračenje i X – zrake (Skoog i sur., 1999; Penner, 2010). Na **Slici 7** prikazan je spektar elektromagnetskog zračenja.

Djelovanjem energija UV/Vis spektroskopije dolazi do pobuđivanja molekula iz osnovnog u pobuđeno stanje, odnosno dolazi do elektronskog prijelaza. Područje mjerenja UV/Vis spektrofotometra za ultraljubičasto zračenje (UV) je od 200 nm do 380 nm, dok za vidljiv dio spektra (Vis) područje mjerenja je od 380 nm do 780 nm (Pavia i sur., 2001).



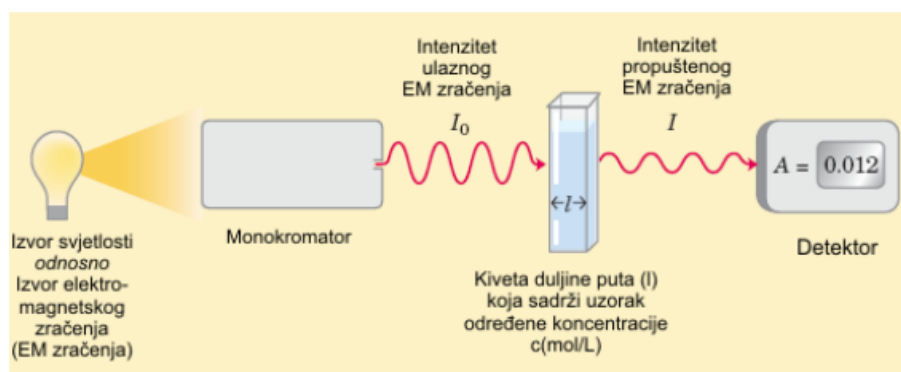
**Slika 7** Spektar elektromagnetskog zračenja

(WEB 4)

Uređaj za mjerenje apsorpcije zračenja naziva se apsorpcijski spektrofotometar. Uređaj se sastoji od izvora zračenja, monokromatora, spremnika za uzorak i detektora. Izvori zračenja mogu biti kontinuirani (emitiraju zračenje svih valnih duljina) i diskontinuirani (linijski). Za UV dio spektra, kao izvor svjetlosti najčešće se koristi deuterijeva lampa, dok kod Vis djela spektra volframova lampa. Monokromator je kontinuirani selektor valnih duljina, koji proizvodi snop zračenja velike spektralne čistoće s mogućnošću mijenjanja valne duljine po želji. Spremnik za uzorak kod određivanja vidljivog djela spektra je izrađen od silikatnog stakla, dok kod ultraljubičastog zračenja koriste se kvarcne kivete. Detektor pretvara kemijsku ili fizikalnu veličinu (pH, intezitet svjetlosti, temperatura, masa) u električni signal (napon, naboj, struju) koja se pretvara u broj i očitava. Najčešće primjenjiv detektor za UV i Vis spektroskopiju je fotonski detektor (Skoog i sur., 1999; Pavia i sur., 2001).

Spektrofotometri mogu biti jednosnopni i dvosnopni. Kod jednosnopnih instrumenata, jedinice su poredane prema nizu i zračenje putuje od jedne jedinice prema drugoj. Princip rada spektrofotometra prikazan je na **Slici 8**. Ukratko, kod dvosnopnih instrumenata tok zračenja pri prolazu kroz monokromator se dijeli. Razdvajanje snopa svjetlosti provodi se pomoću djelitelja snopa ili čopera (sektorsko polukružno zrcalo) koji omogućuje da jedan snop svjetlosti prolazi kroz slijepi uzorak, dok drugi snop svjetlosti prolazi kroz nepoznati uzorak te

tako omogućuje istovremenu usporedbu podataka. Izlazni signali se pojačavaju i mjere (Skoog i sur., 1999; Pavia i sur., 2001).



**Slika 8** Slikovni prikaz principa rada spektrofotometra

(WEB 5)

Prolaskom svjetlosti kroz ispitivanu otopinu, molekule dio zračenja apsorbiraju dok spektrofotometar mjeri neapsorbirano ili propušteno zračenje. Spektrofotometar mjeri intenzitet svjetla koji je prošao kroz uzorak ( $I$ ) te ga uspoređuje s intenzitetom upadnog svjetla ( $I_0$ ). Što je veći broj molekula koje apsorbiraju svjetlo i što molekula učinkovitije apsorbira svjetlo na određenoj valnoj duljini to je apsorpcija veća (Skoog i sur., 1999; Pavia i sur., 2001). UV-Vis spektroskopija je pogodna instrumentalna tehnika za procjenu svojstava i sadržaja polifenolnih spojeva. Mogućnost polifenolnog prstena da apsorbira UV svjetlost i činjenica da su neki polifenolni spojevi obojani, pokazuju apsorpcijske značajke u vidljivom području spektra što omogućuje njihovu karakterizaciju (Aleixandre-Tudo i Wessel du Toit, 2017). Većina derivata benzojeve kiseline pokazuje apsorpcijski maksimum na 246-262 nm, osim galne i siringične kiseline, koje pokazuju apsorpcijske maksimume na 271 i 275 nm. Hidroksicimetne kiseline pokazuju apsorpcijske maksimume u rasponu valnih duljina od 225 do 235 nm i od 290 do 330 nm (Goleniowski i sur., 2013).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### **3.1. Zadatak rada**

Zadatak ovog diplomskog rada je:

- ekstrahirati polifenole iz kore i mesa jabuke,
- odrediti sadržaj ukupnih polifenola spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom u uzorku jabuka,
- snimiti apsorpcijski spektar polifenola iz jabuke u različitim pH vrijednostima i modela polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana,
- odrediti zeta potencijal polifenola iz mesa i kore jabuke, otopine  $\beta$ -glukana i modela polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana kroz različite pH vrijednosti i
- odrediti najstabilnije ponašanje modela polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana pri različitim pH vrijednostima

### **3.2. Materijali i metode**

#### **3.2.1. Kemikalije**

Kemikalije upotrijebljene za istraživanje u ovom diplomskom radu su metanol (HPLC čistoće), demineralizirana voda, galna kiselina, natrijev karbonat, Folin – Ciocalteuov reagens,  $\beta$  – glukon koncentracije  $190 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl/KCl pH 1,5;  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatni pufer pH 5,5 i pH 7,5 te  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  karbonatni pufer pH 10.

#### **3.2.2. Priprema uzorka**

Uzorci korišteni u ovome radu su jabuke kupljene u lokalnom supermarketu. Prije analize jabuke se oguljene, razrezane na dijelove te očišćene od koštica i peteljke. Kora i meso jabuke, zasebno, su usitnjeni pomoću štapnog miksera i čuvani na temperaturi od  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  do analize.

#### **3.2.3. Ekstrakcija polifenola iz jabuka potpomognuta ultrazvukom**

Odvagano je oko 1 g kore odnosno oko 1 g mesa jabuke. Uzorcima je dodan 80% metanol da bi se ekstrahirali polifenoli. Ovako pripremljeni uzorci su se podvrgli na 15 minuta djelovanju ultrazvuka u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin Sonorex RK 100, Njemačka) te su se centrifugirali 10 minuta u centrifugi pri 10 000 okretaja. Nakon centrifugiranja, ekstrakti polifenola su se izdvojili od ostatka. Ekstrakcija je provedena u tri probe. Skupljeni ekstrakti polifenola iz mesa i kore jabuke su se uparili na rotavaporu (IKA RV 10, Njemačka) do volumena oko 25 mL. Za potrebe snimanja UV-Vis apsorpcijskih spektara i mjerenja zeta potencijala određeni volumen

polifenolnog ekstrakta se razrijedio s pufer otopinama do ukupnog volumena uzorka od 10 mL.

### **3.2.4. Primjena spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode za određivanje ukupnih polifenola**

Za određivanje ukupnih polifenola u uzorcima kore i mesa jabuke slijedila se procedura prema Waterhouse (2002). Pripravile su se različite masene koncentracije galne kiseline u rasponu od 20 do 1000 mgL<sup>-1</sup>. Otpipetiralo se 20 µL pripremljenih masenih koncentracija galne kiseline, 1580 µL destilirane vode, 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 300 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Ovako pripremljene otopine inkubirale su se na 30 °C kroz 40 minuta. Apsorbancija se očitala pri valnoj duljini od 765 nm. Za pojedinu masenu koncentraciju napravljene su tri paralele. Isti postupak je primijenjen na uzorke kore i mesa jabuke, a s ciljem kvantifikacije sadržaja ukupnih polifenola za snimanje apsorpcijskog spektra i određivanja stabilnosti modela polifenola jabuke i β-glukana.

### **3.2.5. UV-Vis apsorpcijski spektar**

Za snimanje UV-Vis apsorpcijskog spektara korišten je UV – 1280 UV-Vis spektrofotometar tvrtke Shimadzu.

Snimanje UV-Vis apsorpcijskog spektra polifenola iz kore i mesa jabuke i modela polifenola jabuke i β-glukana provedeno je u rasponu valnih duljina od 200-700 nm pri različitim pH vrijednostima i vremenskom periodu od 0, 1, 2, 5 i 16h.

### **3.2.6. Zeta potencijal**

Mjerenje zeta potencijala polifenola iz kore i mesa jabuke i modela polifenola jabuke i β-glukana provedeno je na uređaju Zetasizer 2000 tvrtke Malvern Instruments Ltd. (Velika Britanija) u standardnoj kapilarnoj ćeliji kontrolirano kompjuterskim sustavom IBM PC – AT Compatible (**Slika 9**).



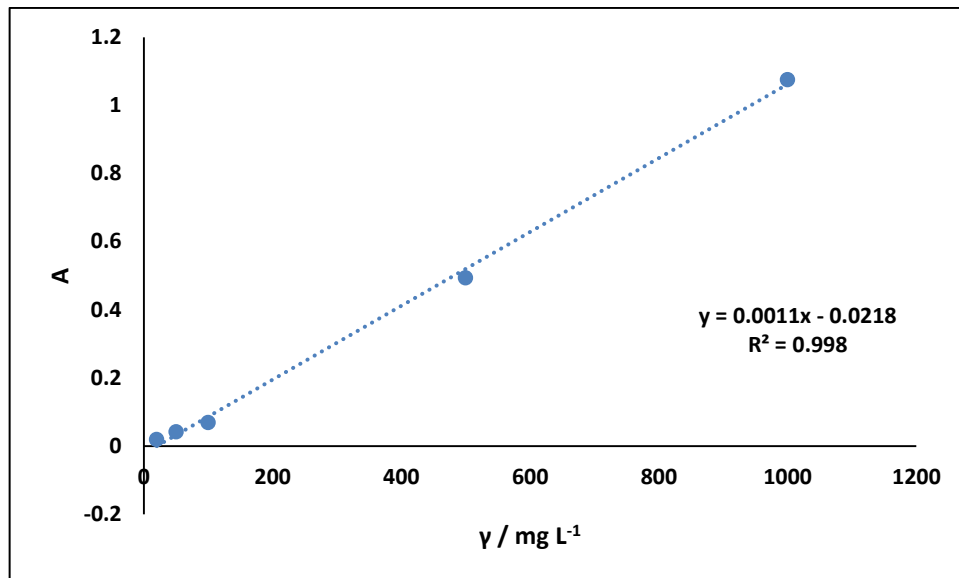
**Slika 9** Instrument za mjerenje zeta potencijala Malvern Zetasizer 2000

Instrument Malvern Zetasizer 2000 za mjerenje zeta potencijala koristi sofisticiranu lasersku interferometrijsku M3-PALS (fazna analiza rasipanja svjetlosti) tehniku.

Uzorci za analizu injektirani su sa špricom u količini najmanje od 3mL otopine u uređaj za mjerenje zeta potencijala (Malvern, Zetasizer 2000, Velika Britanija). Softver uređaja Malvern Zetasizer 2000 prikazuje nekoliko vrijednosti zeta potencijala čije se prosječne vrijednosti uzimaju kao konačni rezultat.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda određivanja ukupnih polifenola



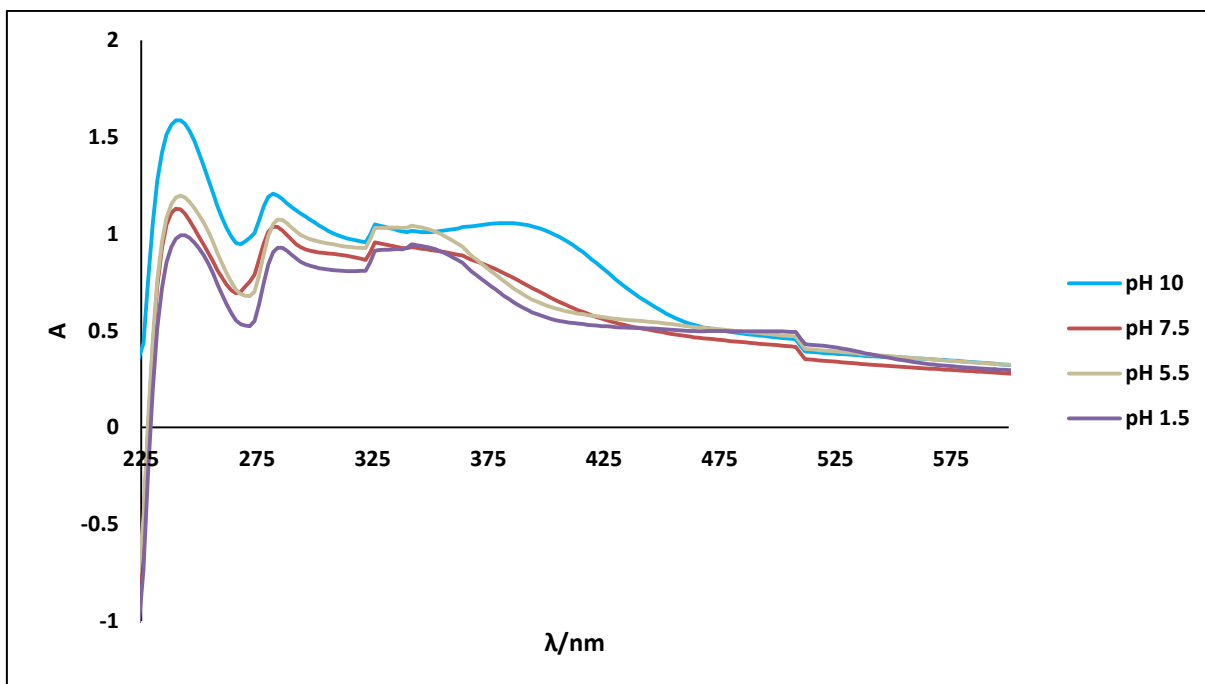
**Slika 10** Kalibracijska krivulja galne kiseline dobivena primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode određivanja ukupnih polifenola

**Tablica 1** Sadržaj ukupnih polifenola ekstrakata mesa i kore jabuke primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode

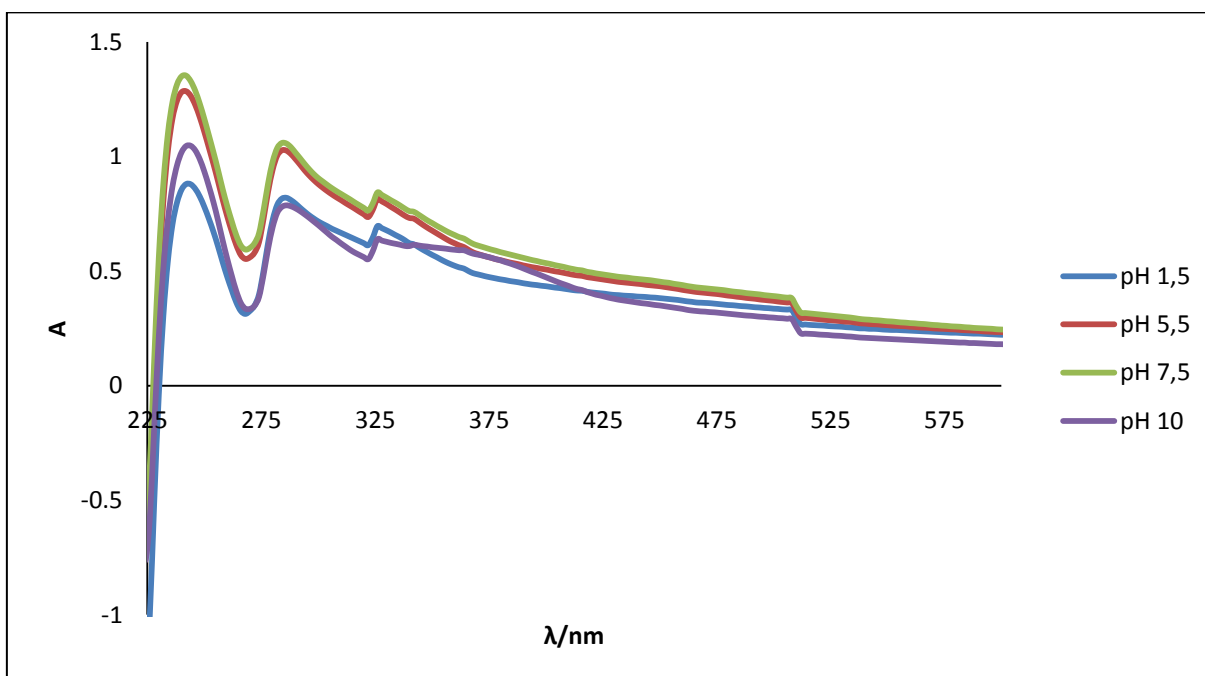
Uzorak jabuke	$\gamma$ (ukupnih polifenola) (mg/L)
Kora	371,64 - 431,18
Meso	57,09-168,9

## 4.2. UV-Vis apsorpcijski spektri

### 4.2.1. UV-Vis apsorpcijski spektri polifenola kore i mesa jabuke

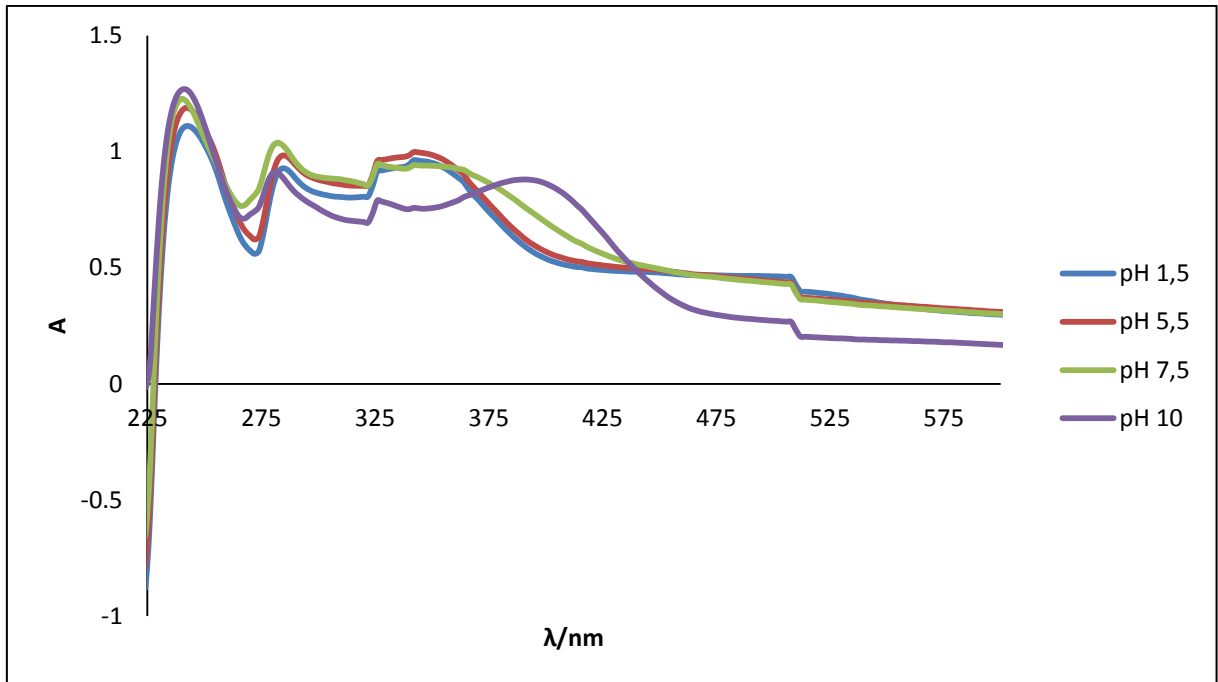


**Slika 11** UV-Vis apsorpcijski spektar polifenola kore jabuke u ovisnosti o različitim pH vrijednostima

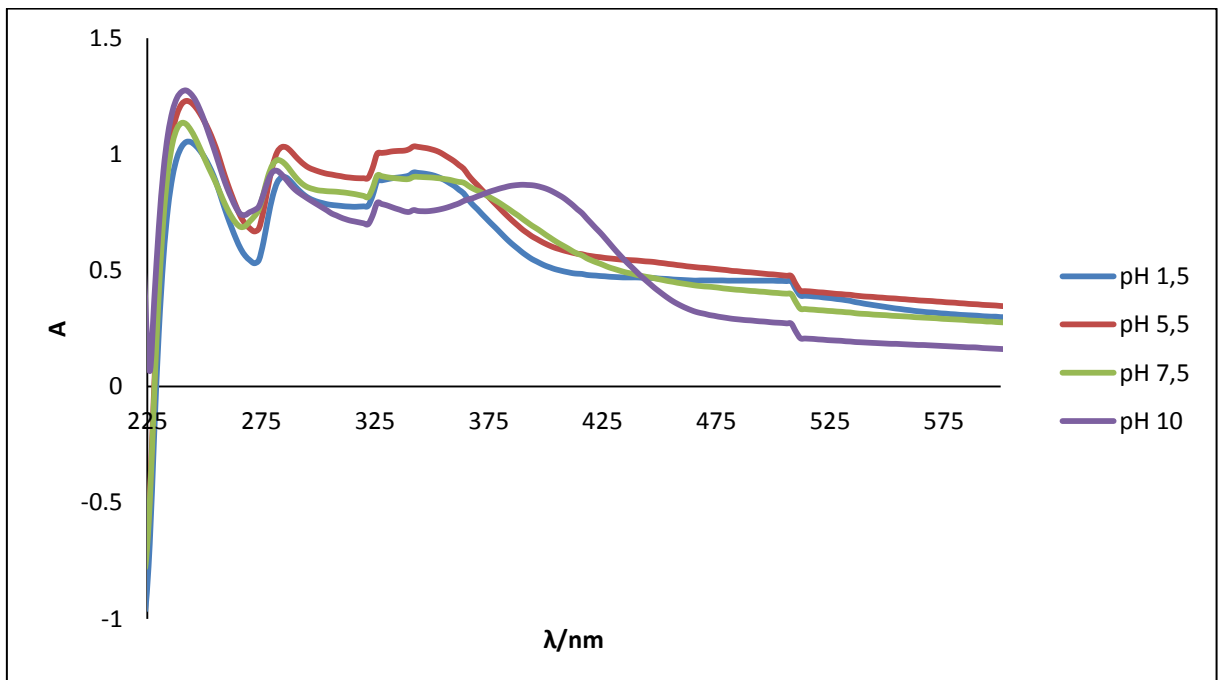


**Slika 12** UV-Vis apsorpcijski spektar polifenola mesa jabuke u ovisnosti o različitim pH vrijednostima

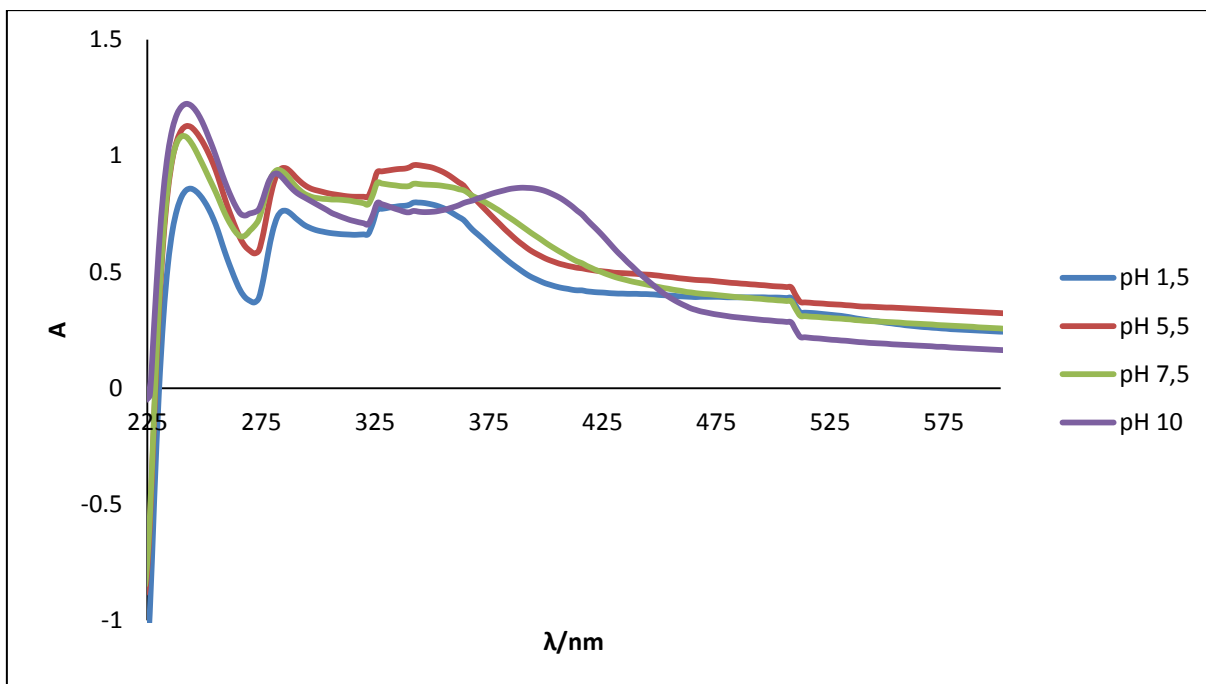
#### 4.2.2. UV-Vis apsorpcijski spektri modela polifenola kore jabuke i $\beta$ – glukana



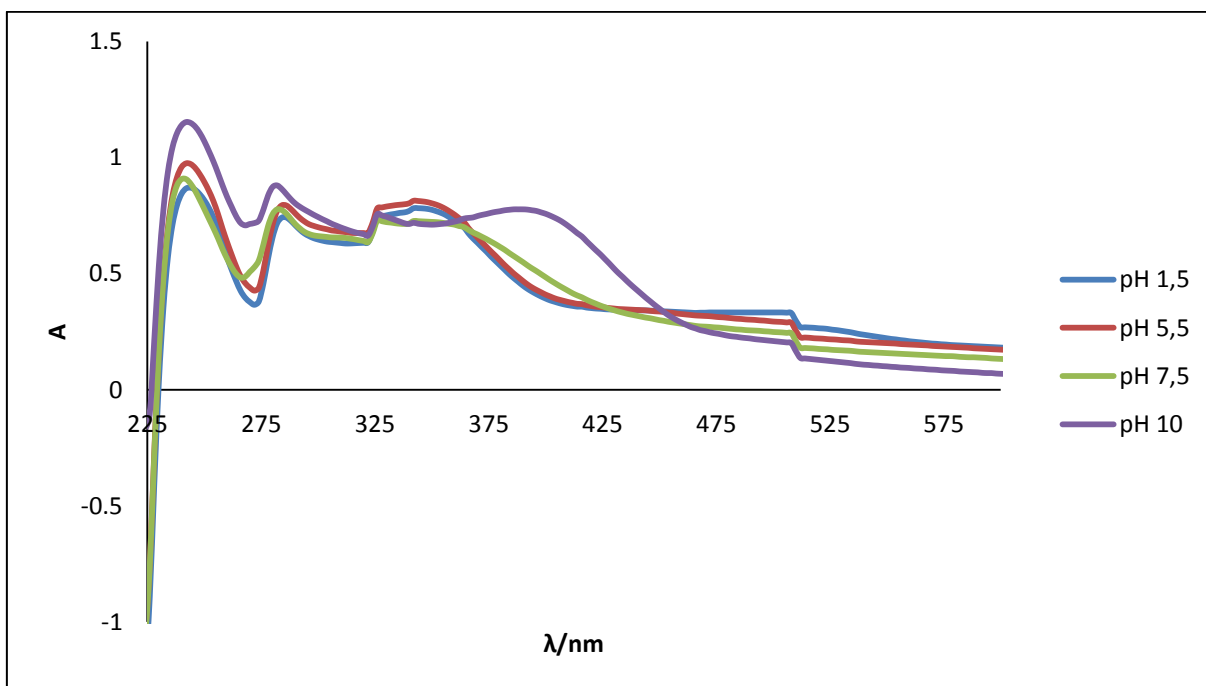
**Slika 13** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola kore jabuke i  $\beta$  – glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) u ovisnosti o različitoj vrijednosti pH pufera(0h)



**Slika 14** UV-Vis apsorpcijski spektar polifenola kore jabuke i  $\beta$ –glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) u ovisnosti o različitoj vrijednosti pH pufera (1h)

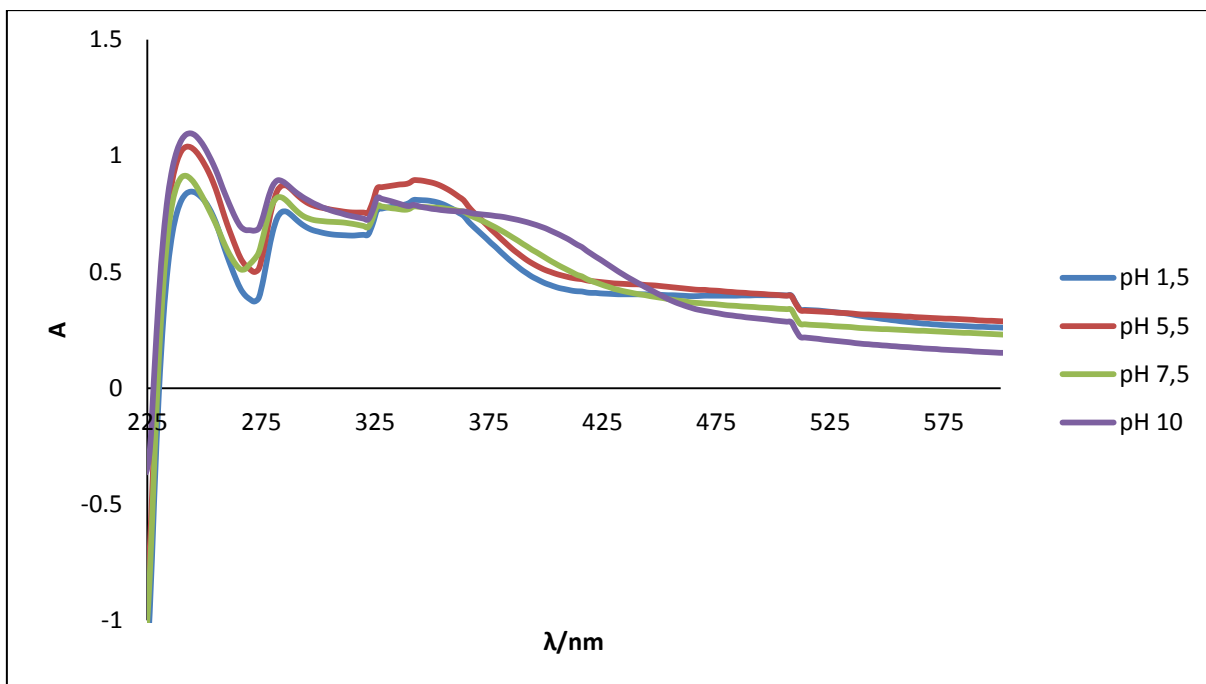


**Slika 15** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola kore jabuke i  $\beta$ -glukana (5 mg L<sup>-1</sup>) u ovisnosti o različitoj pH vrijednosti pufera (2h)



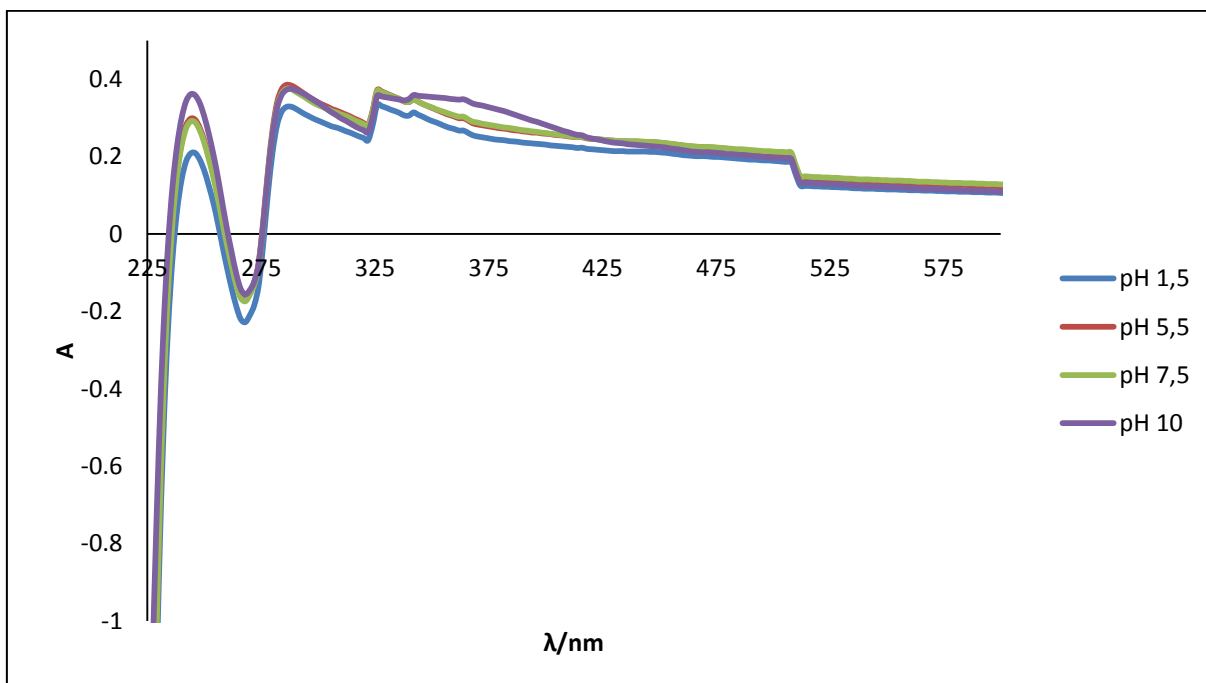
**Slika 16** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola kore jabuke i  $\beta$ -glukana (5 mg L<sup>-1</sup>) u ovisnosti o različitoj pH vrijednosti pufera (5h)



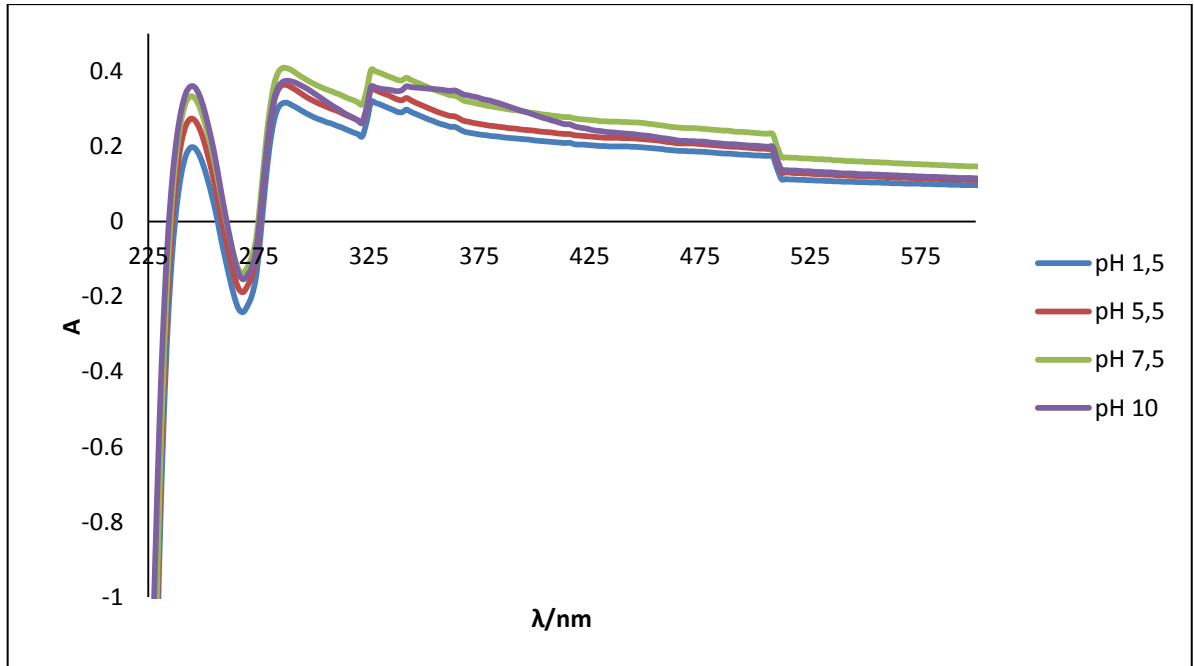


**Slika 17** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola kore jabuke i  $\beta$ -glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) u ovisnosti o različitoj pH vrijednosti pufera (16h)

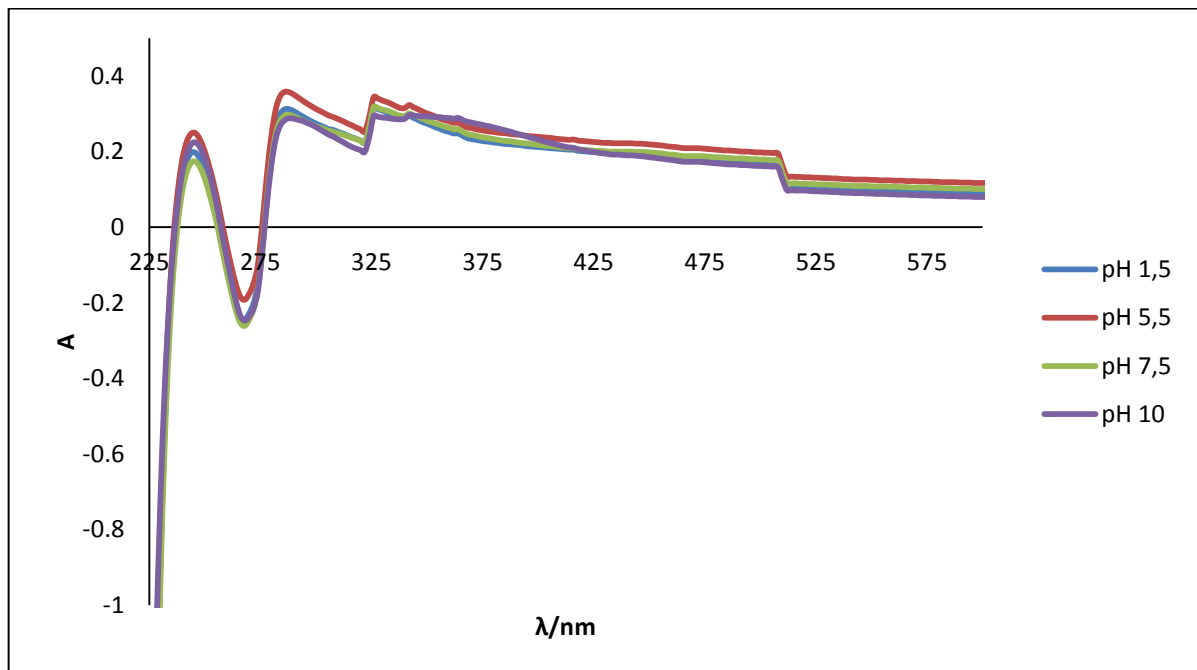
#### 4.2.3. UV-Vis apsorpcijski spektri modela polifenola mesa jabuke i $\beta$ – glukana



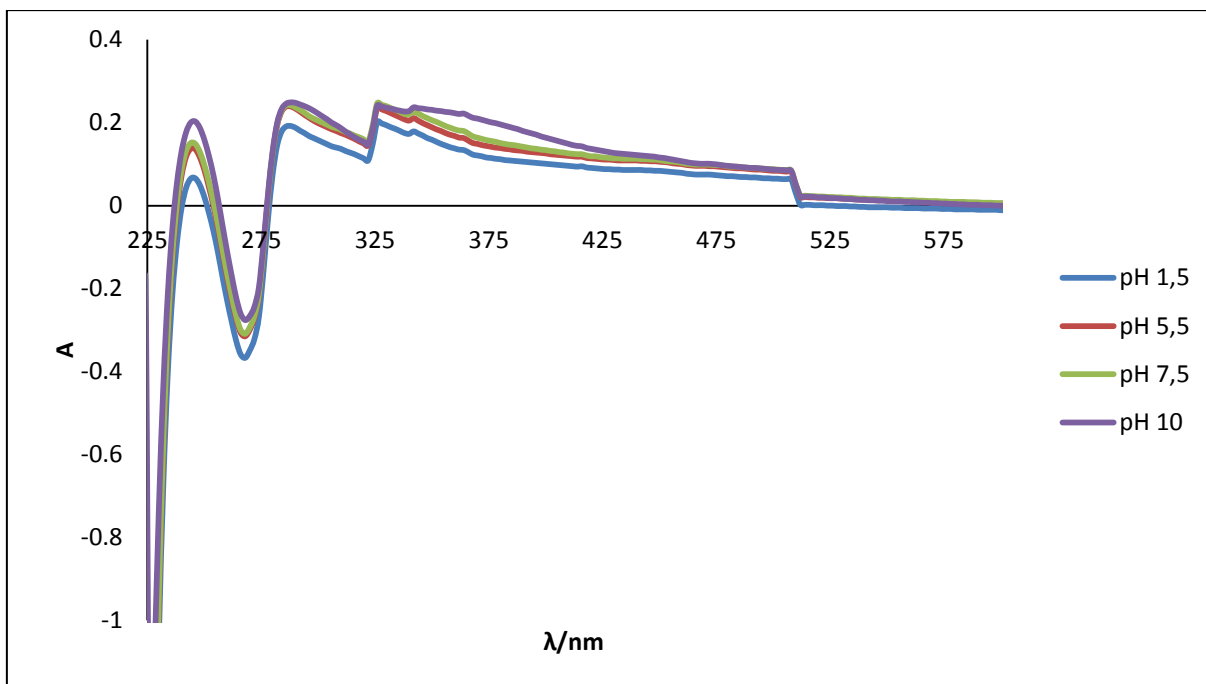
**Slika 18** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola mesa jabuke i  $\beta$ -glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) u ovisnosti o različitoj pH vrijednosti pufera (0h)



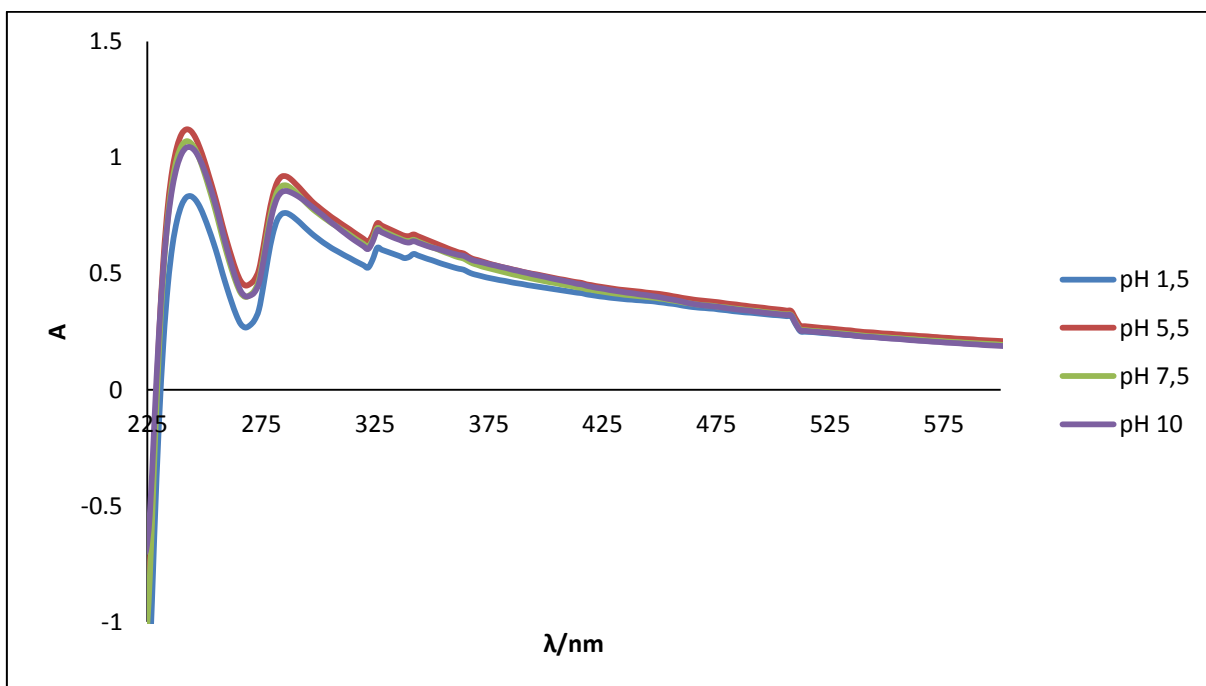
**Slika 19** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola mesa jabuke i  $\beta$ -glukana (5 mg L<sup>-1</sup>) u ovisnosti o različitoj pH vrijednosti pufera (1h)



**Slika 20** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola mesa jabuke i  $\beta$ -glukana (5 mg L<sup>-1</sup>) u ovisnosti o različitoj pH vrijednosti pufera (2h)

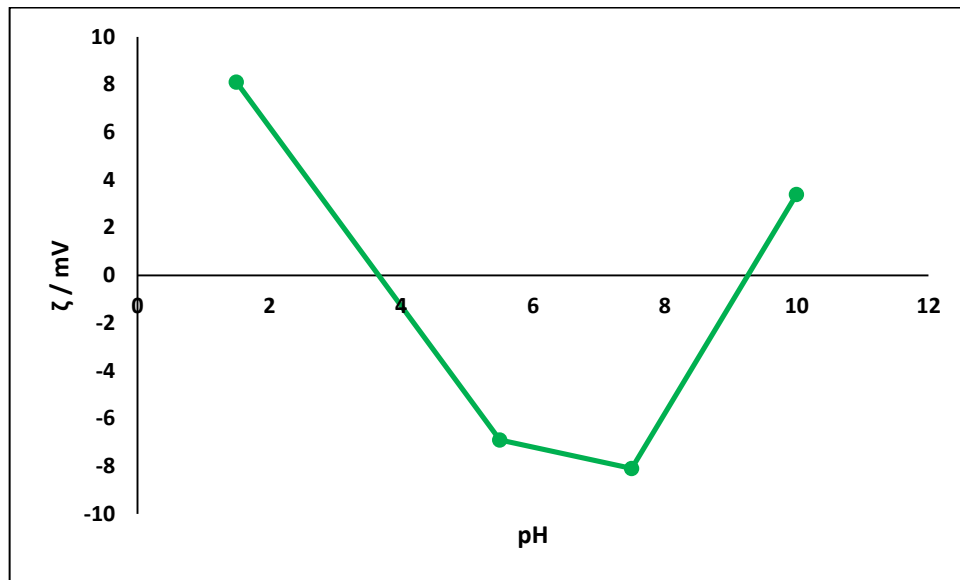


**Slika 21** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola mesa jabuke i  $\beta$ -glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) u ovisnosti o različitoj pH vrijednosti pufera (5h)



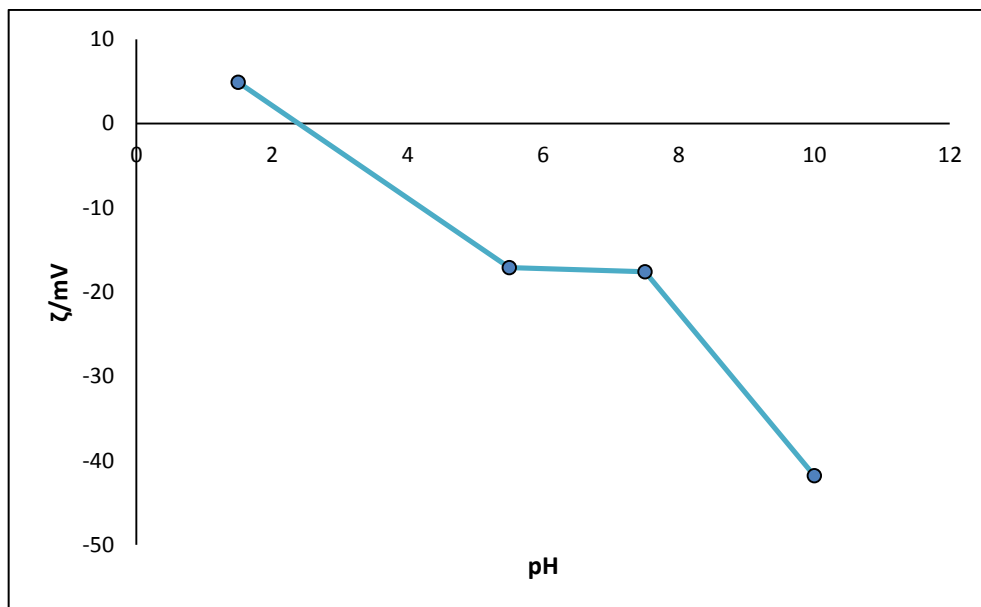
**Slika 22** UV-Vis apsorpcijski spektar modela polifenola mesa jabuke i  $\beta$ -glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) u ovisnosti o različitoj pH vrijednosti pufera (16h)

### 4.3. Zeta potencijal polifenola iz kore i mesa jabuke i modela polifenola jabuke i $\beta$ -glukana

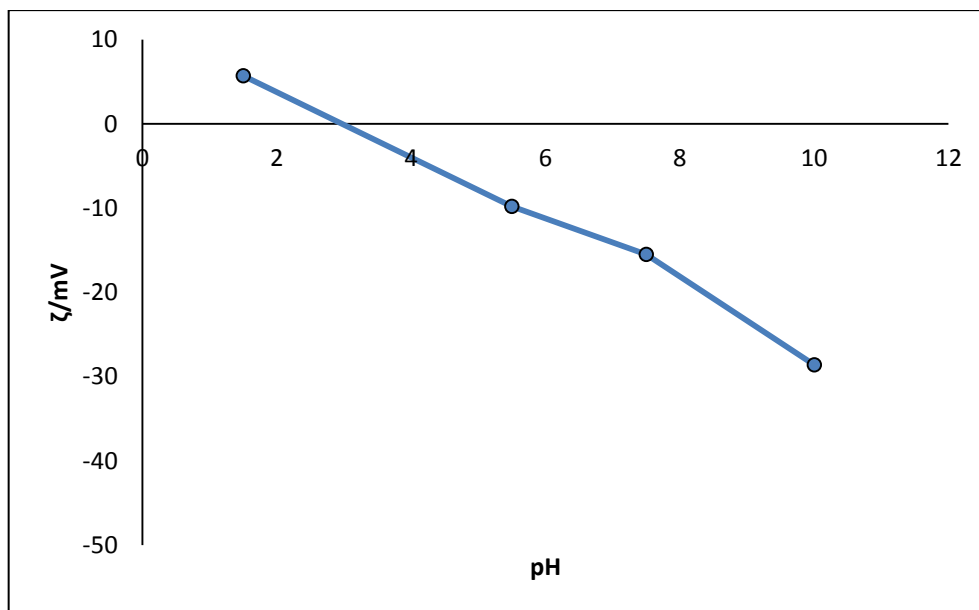


Slika 23 Ovisnost zeta potencijala  $\beta$ -glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) o promjeni pH vrijednosti pufera

#### 4.3.1. Zeta potencijal polifenola kore i mesa jabuke o različitoj pH pufera

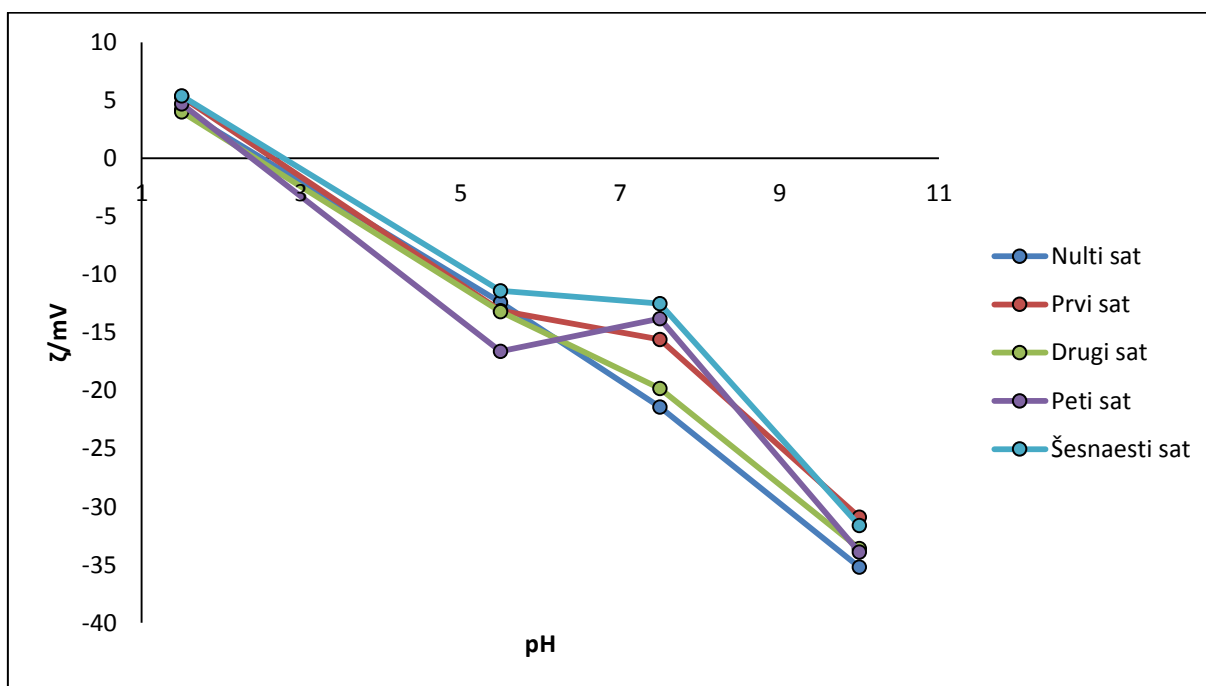


Slika 24 Ovisnost zeta potencijala polifenola kore jabuke o različitoj pH vrijednosti



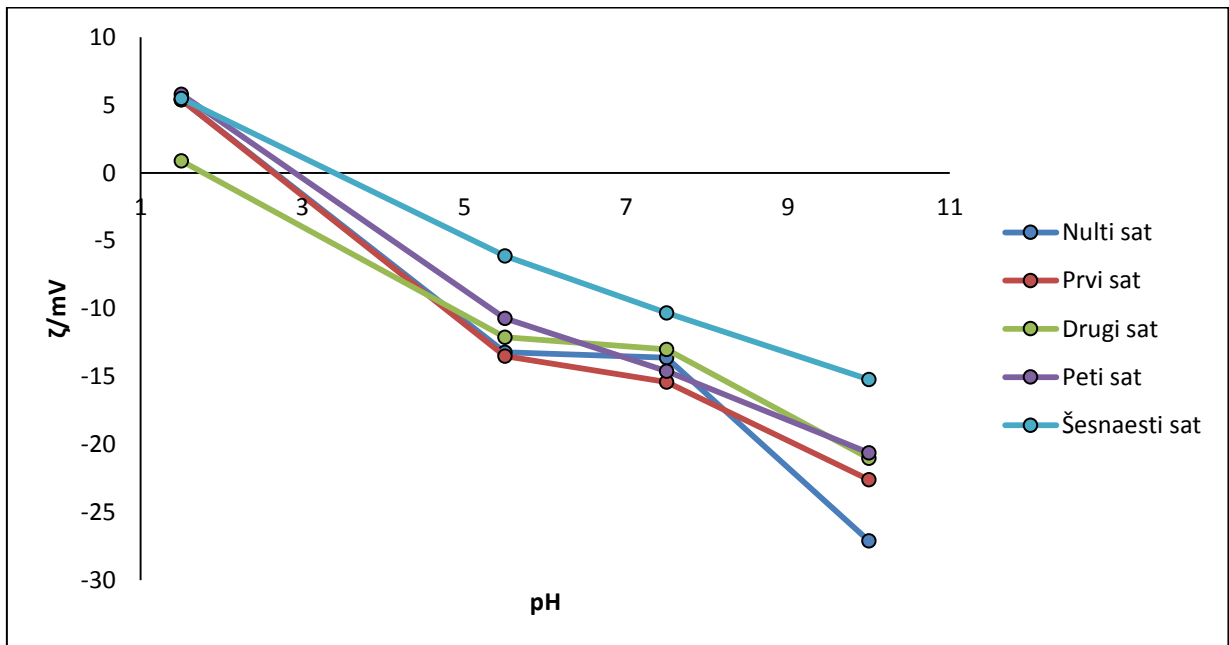
Slika 25 Ovisnost zeta potencijala polifenola mesa jabuke o različitoj pH vrijednosti

#### 4.3.2. Zeta potencijal modela polifenola kore jabuke i $\beta$ – glukana o različitom pH pufera u vremenu



Slika 26 Ovisnost zeta potencijala modela polifenola kore jabuke i  $\beta$ -glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) o različitoj pH vrijednosti u vremenskom periodu (0, 1, 2, 5, i 16h)

### 4.3.3. Zeta potencijal modela polifenola mesa jabuke i $\beta$ - glukana o različitom pH pufera u vremenu



**Slika 27** Ovisnost zeta potencijala modela polifenola mesa jabuke i  $\beta$  - glukana o različitoj pH vrijednosti u vremenskom periodu (0, 1, 2, 5, i 16h)

## **5. RASPRAVA**

U ovom diplomskom radu snimljeni su UV-Vis apsorpcijski spektri polifenola jabuke i modela polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana u području valnih duljina od 200 do 700 nm primjenom UV-Vis spektroskopije (**Slike 11-22**). Zatim, učinjena je ekstrakcija polifenola iz kore i mesa jabuke potpomognuta ultrazvukom, a sadržaj ukupnih polifenola kore i mesa jabuke dobiven je primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode za određivanje ukupnih polifenola. Na osnovi primijenjene spektrofotometrijske metode kreirana je kalibracijska krivulja galne kiseline u rasponu koncentracija od 20, 50, 100, 500, 1000 mg L<sup>-1</sup> te je dobivena jednadžba  $y=0,00118x-0,0218$  i  $R^2= 0,998$  prema kojoj je izračunat sadržaj ukupnih polifenola u kori i mesu jabuke (**Slika 10, Tablica 1**). Ovaj postupak je učinjen da bi se odredila potrebna količina ekstrakta polifenola za snimanje apsorpcijskih spektara i mjerenja zeta potencijala.

UV-Vis apsorpcijski spektri polifenola kore i mesa jabuke prikazani su na **Slikama 11 i 12**. UV-Vis apsorpcijski spektri kore i mesa jabuke u ovisnosti o pH vrijednosti pokazuju slične apsorpcijske maksimume na valnim duljinama od 230, 280, 325 i 520 nm. Međutim, prisutna je razlika u UV-Vis apsorpcijskom spektru polifenola kore jabuke od UV-Vis apsorpcijskog spektra polifenola mesa jabuke i to na apsorpcijskom maksimumu pri valnoj duljini od oko 380 nm u pH 10, koji se kod UV-Vis apsorpcijskih spektara polifenola mesa jabuke ne javlja pri ni jednoj ispitanoj pH vrijednosti. Jabuka je kompleksni realni sustav koji predstavlja jedan od značajnih polifenolnih izvora u ljudskoj prehrani, a ponajviše su zastupljeni flavanoli, fenolne kiseline, dihidrokalkoni i flavonoli (Kschonsek i sur., 2018). Stoga se apsorpcijski maksimumi polifenola kore i mesa jabuke pri valnoj duljini od 280 nm mogu pripisati flavanolima i dihidrokalkonima, pri 325 nm hidrosicimetnim kiselinama, pri 380 nm flavanolima i pri 520 nm antocijanima (Alonso-Salces i sur., 2004). Sličan izgled UV-Vis apsorpcijskih spektara prikazanih na **Slikama 13-22** uočen je i kod modela polifenola kore i mesa jabuke i  $\beta$ -glukana u ovisnosti o pH vrijednostima (1,5; 5,5; 7,5 i 10) i u ovisnosti o vremenskom periodu (0, 1, 2, 5 i 16h).

Nadalje, izmjerile su se vrijednosti zeta potencijala za ispitane polifenolne ekstrakte kore i mesa jabuke te modele polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana. Na **Slici 23** prikazana je ovisnost zeta potencijala otopine  $\beta$ -glukana (5 mg L<sup>-1</sup>) o promjeni pH vrijednosti te se uočavaju pozitivne vrijednosti u području pH 1,5 i pH 10, dok oko neutralnog i u neutralnom području zeta potencijal je negativne vrijednosti. Jacobasch i suradnici (1985) zaključili su u provedenom istraživanju mjerenja zeta potencijala različitih vlakana da relativno niska vrijednost zeta



potencijala topljivih vlakana, kao što je dobivena i u ovom radu (+8 do -8 mV) je rezultat kompetitivne adsorpcije vode što dovodi do pada potencijala na površinskom sloju odnosno naboj u tom sloju može potjecati od disocijacije adsorbirane vode i/ili disocijacije odgovarajućih molekulskih skupina.

Zeta potencijal polifenola kore jabuke u ovisnosti o promjeni pH vrijednosti prikazan je **Slikom 24** te se može uočiti da je izoelektrična točka prisutna u pH 2,5 do te vrijednosti zeta potencijal je pozitivne vrijednosti, nakon izoelektrične točke vrijednost zeta potencijala se ne mijenja do pH 10 kada postiže najveću negativnu vrijednost od oko -40 mV, što prema teorijskim kriterijima stabilnosti govori da je sustav pri pH 10 najstabilniji (Salopek i sur., 1992; Metikoš-Huković i Martinez, 2000; Cano-Sarmiento i sur., 2018). Slična pojava se uočava i kod mjerenja zeta potencijala polifenola mesa jabuke u ovisnosti o promjeni pH vrijednosti pufera (**Slika 25**). Neki polifenoli iz jabuke, prema distribucijskim dijagramima, su u obliku neutralne molekule do oko pH 3-4 kada povećanjem pH vrijednosti prelaze u anionske oblike što se vjerojatno može pripisati negativnom naboju molekule polifenola i negativnoj vrijednosti zeta potencijala. Nadalje, model polifenola kore i mesa jabuke i  $\beta$ -glukana u ovisnosti o pH rasponu od 1,5; 5,5; 7,5 i 10 kroz vremenski period od 0, 1, 2, 5 i 16h prikazan je na **Slikama 26 i 27**. Iz grafičkih prikaza na **Slikama 26 i 27** uočava se da vrijednost zeta potencijala opada od 0 do 16h što uspoređujući sa **Slikom 23** grafičkog prikaza ovisnosti  $\beta$ -glukana o rasponu pH od 1,5; 5,5; 7,5 i 10 se vjerojatno odnosi na vezivanje polifenola jabuke na  $\beta$ -glukan. Oba modela polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana pokazuju prisustvo izoelektrične točke od pH 2,5 do 3 kada zeta potencijal prelazi u negativne vrijednosti i u pH 10 pokazuje maksimalnu negativnu vrijednost zeta potencijala, što prema teorijskim kriterijima stabilnosti govori da je sustav najnestabilniji u pH 2,5-3, a najstabilniji u pH 10 kada su vrijednosti zeta potencijala oko -30 mV (Salopek i sur., 1992; Metikoš-Huković i Martinez, 2000, Cano-Sarmiento i sur., 2018).

Teorijski kriteriji stabilnost prema DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey i Overbeek), koji određuju da je granična vrijednost zeta potencijala od  $\pm 30$  mV nekog sustava stabilna, kod realnog sustava je ipak složenije odrediti stabilnost. Teorija stabilnosti sustava ovisi o zbroju van der Waalove privlačne sile i elektrostatske odbojne sile zbog električnog dvosloja. Zeta potencijal daje informacije o elektrostatskoj odbojnoj sili, ali ne i o uvidu u prirodu privlačnih van der Waalovih sila. Stoga, nije nemoguće pronaći takav realni sustav koji je stabilan pri niskoj

vrijednosti zeta potencijala. Također, prostorna usmjerenost molekule može pridonijeti stabilnosti sustava unatoč niskoj vrijednosti zeta potencijala (Bhattacharjee, 2016).

Zeta potencijal je važan parametar pri karakterizaciji površine makromolekule kao što su ispitani modeli polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana. Prema rezultatima istraživanja zeta potencijala modela polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana u ovom radu može se zaključiti da kemijska struktura ispitanog modela i promjena pH vrijednost kao i nastanak veza ispitanog modela utječu na iznos zeta potencijala, oblik modela i na njihovu stabilnost.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na osnovi rezultata ovog diplomskog rada mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Iz ukupne količine polifenola određenih spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom uočava se kako je jabuka bogat izvor polifenola i da je kora bogatija polifenolnim spojevima od mesa jabuke.
- Ispitani UV-Vis apsorpcijski spektri polifenola kore i mesa jabuke pri pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10 pokazuju apsorpcijske maksimume pri valnim duljinama od 230, 280, 325 i 520 nm te je uočena razlika u UV-Vis apsorpcijskom spektru polifenola kore jabuke na valnoj duljini od oko 380 nm u pH 10, što se može pripisati prisustvu flavonola.
- UV-Vis apsorpcijski spektri modela polifenola kore i  $\beta$ -glukana te modela polifenola mesa jabuke i  $\beta$ -glukana snimani pri pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10 i u vremenskom periodu od 0, 1, 2, 5 i 16 sati prema izgledu i apsorpcijskim maksimumima slični su UV-Vis apsorpcijskom spektru polifenola kore i mesa jabuke.
- UV-Vis apsorpcijski maksimumi pri valnoj duljini od 280 nm mogu se pripisati flavanolima i dihidrokalkonima, pri 325 nm hidrosicimetnim kiselinama, pri 380 nm flavanolima i pri 520 nm antocijanima.
- Kod ovisnosti vrijednosti zeta potencijala otopine  $\beta$ -glukana ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) o promjeni pH vrijednosti uočavaju se pozitivne vrijednosti u pH 1,5 i pH 10, dok oko neutralnog i u neutralnom području zeta potencijal je negativne vrijednosti.
- Kod zeta potencijala polifenola kore jabuke uočava se prisutnost izoelektrične točke u pH 2,5, dok je do te vrijednosti zeta potencijal pozitivne vrijednosti, zatim se vrijednost zeta potencijala ne mijenja do pH 10 kada postiže najveću negativnu vrijednost od oko -40 mV, što prema teorijskim kriterijima stabilnosti govori da je sustav pri pH 10 najstabilniji.
- Vrijednosti zeta potencijala polifenola mesa jabuke su slične vrijednostima zeta potencijala polifenola kore jabuke.
- Modeli polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana pokazuju prisustvo izoelektrične točke od pH 2,5 do 3 kada zeta potencijal prelazi u negativne vrijednosti i u pH 10 pokazuje maksimalnu negativnu vrijednost zeta potencijala, što prema teorijskim kriterijima stabilnosti govori da je sustav najnestabilniji u pH 2,5-3, a najstabilniji u pH 10 kada su vrijednosti zeta potencijala oko -30 mV.

- Na iznos zeta potencijala modela polifenola jabuke i  $\beta$ -glukana, oblik modela i na njihovu stabilnost utječu kemijska struktura ispitanog modela, promjena pH vrijednost i nastanak veza u ispitanom modelu.

## **7. LITERATURA**

- Aleixandre-Tudo WL, Buica A, Nieuwoudt H, Aleixandre JL, Wessel du Toit: Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds in Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:4009-4026, 2017.
- Alonso-Salces RM, Barranco A, Abad B, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F: Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2938–2952, 2004.
- American Association of Cereal Chemists (AACC): The definition of dietary fibre. *Cereal Foods World* 46:112-116, 2001.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P: *Food Chemistry (4th revised and extended)*. Springer, Berlin, 2009.
- Bhattacharjee S: DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* 235:337-351, 2016.
- Cano-Sarmiento C, Téllez-Medina I, Viveros-Contreras R, Cornejo-Mazón M, Figueroa-Hernández CY, García-Armenta E, Alamilla-Beltrán L, García HS, Gutiérrez-López GF: Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Reviews* 10:113–138, 2018.
- DeVries JW, Prosky L, Li B, Cho S: A historical perspective on defining dietary fiber. *Cereal Foods World* 44:367-369, 1999.
- El Khoury D, Cuda C, Luhovyy BL, Anderson GH: Beta Glucan: Health Benefits in Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012:1-28, 2011.
- Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J: Phenolic Acids. U *Natural Products*, str. 1951-1973. Springer, Berlin, 2013.
- Guillon F, Champ M, Thibault JF, Saulnier L: Dietary fibre functional products. U *Functional Foods (Second edition)*, str. 582 – 622. Woodhead publishing Limited, Engleska, 2011.
- Hardman WE: Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice* 8:233-240, 2014.
- Hunter RJ: *Zeta potential in Colloid Science*. Academic Press, NY, 1981.
- Jacobasch HJ, Bauböck G, Schurz J: Problems and results of zeta-potential measurements on fibers. *Colloid&Polymer Science* 263:3-24, 1985.
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

- Jakobek L: *Nastavni materijali iz kolegija Fizikalna kemija*. Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Jakobek L, Ištuk J, Buljeta I, Voća S, Šic Žlabur J, Skendrović – Babojelić M: Traditional, Indigenous Apple Varieties, a Fruit with Potential for Beneficial Effects: Their Quality Traits and Bioactive Polyphenol Contents. *Foods* 9:52, 2020.
- Kaszuba M, Corbett J, Watson FM, Jones A: High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical transactions of the royal society* 368: 4439-4451, 2010.
- Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H: Phloridzin reduces blood glucose levels and alters hepatic gene expression in normal BALB/c mice. *Food Chem. Toxicol* 50:2547-2553, 2012.
- Kschonsek J, Wolfram T, Stöckl A, Böhm V: Polyphenolic Compounds Analysis of Old and New Apple Cultivars and Contribution of Polyphenolic Profile to the In Vitro Antioxidant Capacity. *Antioxidants* 7:20, 2018.
- Lončarić A: Utjecaj dodatka šećera i praha kore jabuka na udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost kaša od jabuka. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Ljubisavljević M: *Voće, povrće, pečurke i prerađevine*. Niro „Privredni pregled“, Beograd, 1989.
- Masumoto S, Akimoto Y, Oike H, Bobori M: Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses Sglt1 expression in the small intestine in Streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 574:651-4656, 2009.
- Metikoš-Huković M: *Elektrokemija (Interni udžbenik)*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2000.
- Metikoš - Huković M, Martinez S: *Praktikum iz elektrokemije*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2000.
- Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR: *Introduction to Spectroscopy*. Western Washington University, Washington, 2001.
- Penner M. H: Basic Principles of Spectroscopy. U: *Food analysis*, str. 375-385. Springer Science, Business Media, SAD, 2010.
- Piljac I: *Elektroforeza*. Media Print, Zagreb, 2006.



- Quiros - Saucedo AE, Palafox-Carlos H, Sayago - Ayerdi SG, Ayala - Zavala JF, Bello - Perez LA, Alvarez - Parrilla E, LA de la Rosa, Gonzalez - Cordova AF, Gonzalez - Aguilar GA: Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food Function* 5:1063-1072, 2014.
- Reiner Ž: Uloga prehrane u prevenciji i terapiji kardiovaskularnih bolesti. *Medicus* 17:93-103, 2008.
- Salopek B, Krasić D, Filipović S: Measurement and application of zeta – potential. *Rudarsko – geološko – naftni zbornik* 4:147-151, 1992.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ: *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- Tomas-Barberan FA, Clifford MN: Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1073-1080, 2000.
- Vermerris W, Nicholson R: *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Science, West Lafayette, 2006.
- Vranešić -Bender D, Krstev S: Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. *Medicus* 17:19-25, 2008.
- Waterhouse A: *Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine*. Department of Viticulture & Enology, 2002. <https://waterhouse.ucdavis.edu/foolin-ciocalteu-micro-method-total-phenol-wine> (20.6.2020.)
- WEB 1: <http://kokos.net.au/page/3/> (3.2.2020.)
- WEB2:[https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-oat-beta-glucan-showing-the-beta-1-4-and-beta-1-3-glycosidically\\_fig2\\_227527409](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-oat-beta-glucan-showing-the-beta-1-4-and-beta-1-3-glycosidically_fig2_227527409)(7.7.2020.)
- WEB 3:<https://rudar.rgn.hr/~paorleko/kemija%20za%20rudare.pdf> (15.2.2020.)
- WEB 4:<https://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=elektromagnetski+spektar>(17.2.2020.)
- WEB 5:[https://bib.irb.hr/datoteka/432061.PRAKTIKUM\\_2009.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/432061.PRAKTIKUM_2009.pdf)(4.3.2020.)