

Istraživanje zeta potencijala modela klorogenska kiselina - β -glukan

Prskalo, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:109:477398>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U
OSIJEKU**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Maja Prskalo

**Istraživanje zeta potencijala
modela klorogenska kiselina – β – glukan**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, lipanj 2021.

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, biokemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Inženjerska kemija

Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 27. svibnja 2021.

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Tomac

Komentor: prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron

Istraživanje zeta potencijala modela klorogenska kiselina — β – glukana

Maja Prskalo, 0113143686

Sažetak: Zeta potencijal ili elektrokinetički potencijal definira se kao potencijal na udaljenosti plohe smicanja te predstavlja fizikalno svojstvo na površini neke molekule. Na vrijednost zeta potencijala utječu pH, koncentracija i provodljivost. Poznavanje zeta potencijala omogućuje razumijevanje i kontrolu stabilnosti molekula, predviđanje najstabilnijeg oblika neke molekule. Stabilnost neke molekule ovisi o zeta potencijalu i naboju na površini te molekule. Zadatak ovog diplomskog rada je bio odrediti vrijednost zeta potencijala modela klorogenska kiselina — β -glukana, otopine klorogenske kiseline i otopine β -glukana i predvidjeti najstabilnije ponašanje modela klorogenske kiseline — β -glukana. Zeta potencijal modela i otopina pratio se u različitim pH vrijednostima i u različitim koncentracijama. Snimljeni UV/Vis spektri modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) — β -glukan (5 mg L^{-1}) pokazali su dva apsorpcijska maksimuma u rasponu valnih duljina od 326 do 362 nm te na valnoj duljini od 984 nm te se mogu pripisati prisustvu klorogenske kiseline i β -glukanu. Model klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) pokazao se najstabilniji u pH 10 ($\zeta = -28$ do -30 mV) i u drugom satu provođenja eksperimenta ($\zeta = -32,9 \text{ mV}$). Promjena pH vrijednosti, vrijeme ispitivanja i koncentracija modela klorogenska kiselina – β -glukan utječu na izgled UV/Vis spektara i iznos zeta potencijala.

Ključne riječi: klorogenska kiselina, zeta-potencijal, β -glukan, UV/Vis spektar

Rad sadrži: 33 stranica
25 slika
1 tablica
0 priloga
35 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 30. lipnja 2021.

Rad je tiskan i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnicu Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, 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, Biochemistry and Instrumental Methods
Franje Kuhača 18, HR-31000, Osijek, Croatia

Graduate program Process engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Engineering Chemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 8 held on May 27, 2021.

Supervisor: Ivana Tomac, PhD, assistant prof.

Co-supervisor: Lidija Jakobek Barron, PhD, prof.

Zeta Potential Investigation of Chlorogenic Acid — β – Glucan Model

Maja Prskalo, 0113143686

Summary: Zeta potential or electrokinetic potential is defined as the potential at the distance of the shear surface and represents a physical property on the surface of a molecule. The value of zeta potential is affected by pH, concentration and conductivity. Knowing the zeta potential allows understanding and controlling the stability of molecules, predicting the most stable form of a molecule. The stability of a molecule depends on the zeta potential and the charge on the surface of that molecule. The aim of this work was to determine the value of the zeta potential of the model of chlorogenic acid — β -glucan, chlorogenic acid solution and β -glucan solution and to predict the most stable behaviour of the model of chlorogenic acid — β -glucan. The zeta potential of the models and solutions were monitored at different pH values and in different concentrations. The recorded UV/Vis spectra of the chlorogenic acid (25 mg L⁻¹) — β -glucan (5 mg L⁻¹) model showed two absorption maxima in the wavelength range from 326 to 362 nm and at a wavelength of 984 nm and could be attributed to the presence of chlorogenic acid and β -glucan. The chlorogenic acid (25 mg L⁻¹) — β -glucan (5 mg L⁻¹) model proved to be the most stable at pH 10 (ζ = -28 to -30 mV) and in the second hour of the experiment (ζ = -32.9 mV). Changes in pH, different time, concentration affect the appearance of the UV/Vis spectrum and the value of zeta potential of the investigated model.

Keywords: chlorogenic acid, zeta potential, β -glucan, UV/Vis spectra

Thesis contains: 33 Pages
25 Figures
1 Table
0 Supplements
35 References

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: June 30, 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhačića 18, Osijek.

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

Veliko hvala mojoj mentorici, doc.dr.sc. Ivani Tomac, na ogromnoj pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem na uloženom vremenu i podršci kao i na svakom korisnom savjetu i strpljenju prilikom provođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima što su mi nesebično pružali podršku i uvijek vjerovali u mene.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. ZETA POTENCIJAL	5
2.2. UV/Vis SPEKTROSKOPIJA	7
2.3. KLOROGENSKE KISELINE	8
2.4. PREHRAMBENA VLAKNA	9
2.4.1. β -glukan	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. ZADATAK RADA	12
3.2. MATERIJALI I METODE	12
3.2.1. Priprema otopina	12
3.2.2. UV/Vis spektar	12
3.2.3. Zeta potencijal	13
4. REZULTATI	14
4.1. UV/Vis SPEKTRI	15
4.1.1. UV/Vis spektri modela klorogenska kiselina – β -glukan	15
4.1.2. UV/Vis spektri otopine klorogenske kiseline	17
4.1.3. UV/Vis spektri otopine β -glukana	20
4.2. ZETA POTENCIJAL	20
4.2.1. Zeta potencijal otopine klorogenske kiseline	20
4.2.2. Zeta potencijal otopine β -glukana	21
4.2.3. Zeta potencijal modela klorogenska kiselina – β -glukan	21
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČAK	28
7. LITERATURA	30

1. UVOD

Zeta potencijal je fizikalno svojstvo koje posjeduje svaka čestica, molekula ili suspenzija kada se nalazi u tekućini. Čestice i molekule posjeduju zeta potencijal odnosno površinski naboj zbog svojih ionskih karakteristika (dipolarnih svojstava). Poznavanje zeta potencijala omogućuje optimiranje procesa nastanka suspenzija, emulzija, otopina proteina te predviđa interakcije s površinom molekula ili čestica. Stoga se zeta potencijal (ζ) može definirati kao potencijal preko granice faza svih čvrstih tijela i tekućina te je odgovoran za stabilnost molekula odnosno čestica, a naziva se još i elektrokinetički potencijal (Salopek i sur., 1992). Zeta potencijal direktno utječe na stabilnost i ponašanje sustava te se zbog toga mjerenje zeta potencijala može primijeniti u biomedicini, farmaciji, primijenjenoj kemiji, ekologiji i slično.

Spektrofotometrija objašnjava povezanost između tvari i elektromagnetskog zračenja, a daje informacije o građi i sastavu tvari. Ultraljubičasta (UV) i vidljiva (Vis) spektrofotometrija se temelji na apsorpciji UV/Vis zračenja, gdje dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje. Svjetlost koju emitira izvor prolazi kroz uzorak koji se nalazi u kiveti te dolazi do apsorpcije određene količine zračenja. Razlika između količine zračenja na izvoru i količine zračenja koja je prošla kroz uzorak očitava se na detektoru. Apsorbancija predstavlja logaritamski omjer količine ulazne i izlazne zrake svjetlosti (Schmid, 2001).

Klorogenska kiselina se ubraja u skupinu polifenola hidroksicimetnih kiselina te je ester kafeinske kiseline i kina kiseline (Vermeriss i Nicholson, 2006). Glavni izvor klorogenske kiseline je kava i u manjoj količini čaj i druge biljke (Farah i sur., 2013). U svrhu određivanja klorogenske kiseline razvile su se različite instrumentalne tehnike kao što su kromatografske (uz primjenu različitih detektora), spektrofotometrijske, elektrokemijske tehnike (ciklička, diferencijalna pulsna i pravokutnovalna voltametrij). Epidemiološka istraživanja pokazala su moguće pozitivne učinke unosa izvora klorogenske kiseline na ljudski organizam kao što je antiupalno djelovanje (Higdon i Frei, 2006).

β -glukani su polisaharidi koje mogu proizvesti mnogi prokariotski i eukariotski organizmi. Predstavljaju biopolimere glukoze, a različite vrste β -glukana su iz kvasaca, gljiva, algi, plijesni i žitarica. Od žitarica najčešći izvori su ječam, zob, pšenica. Sastoje se od jedinica β -D-glukopiranoze povezane u lance (1 $\rightarrow$ 4) i (1 $\rightarrow$ 3) glikozidnim vezama. Glukani dobiveni iz različitih izvora imaju sličnu strukturu, ali mala strukturalna razlika utječe na njihovu biološku aktivnost. Prehrambena vlakna su biljna tkiva koja se ne mogu razgraditi u probavnom sustavu te se β -glukan ubraja u skupinu topivih prehrambenih vlakana, a primjenjuje se u prehrambenoj industriji u svrhu zgušnjavanja i emulgiranja (Petravić-Tominac i sur., 2010). Također, svoju primjenu pronalaze u kozmetičkoj, farmaceutske i prehrambenoj industriji te u biomedicini i drugim područjima.

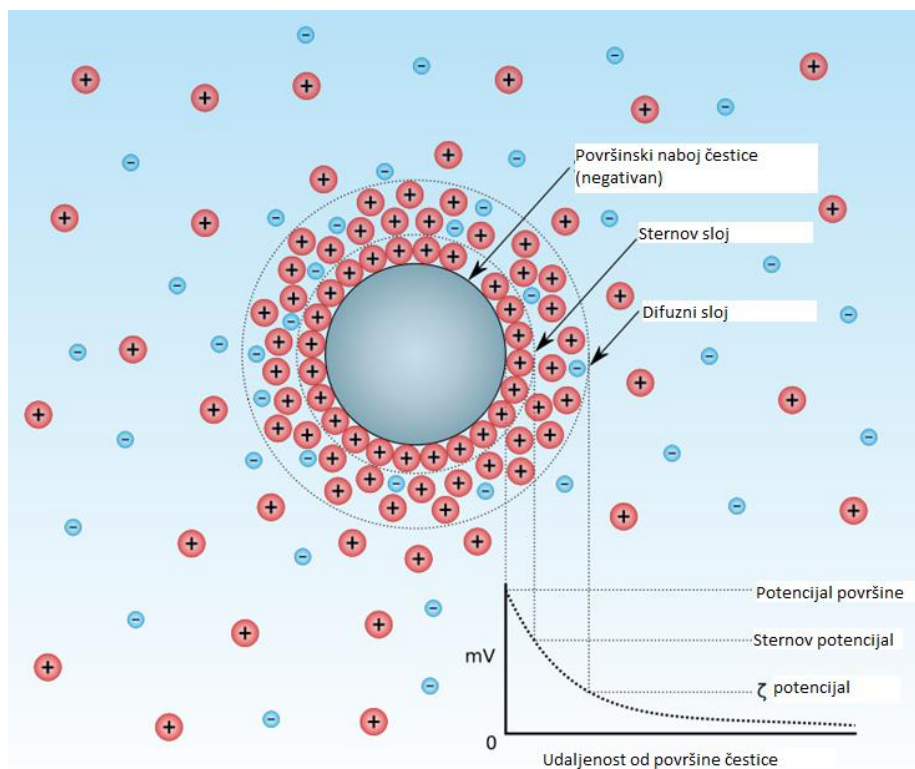
Stoga je zadatak ovog diplomskog rada bio odrediti vrijednost zeta potencijala modela klorogenske kiseline – β -glukan, otopine klorogenske kiseline i otopine β -glukana te predvidjeti najstabilnije ponašanje modela klorogenske kiseline – β -glukan. Klorogenska kiselina izabrana je kao jedna od predstavnica hidroksicimetnih kiselina, a β -glukan kao jedan od predstavnika prehrambenih vlakana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZETA POTENCIJAL

Interakcije između čestica kao i između čestica i medija određuju strukturu i stabilnost sustava. Jedan od parametara koji omogućuje promatranje električne interakcije je zeta potencijal (Cano–Sarmiento i sur., 2018).

Na **Slici 1** prikazana je čestica koja je negativno nabijena. Uz samu površinu negativno nabijene čestice nalaze se pozitivno nabijeni ioni iz otopine. Najviše se pozitivno nabijenih iona nalazi uz površinu čestice, a kako raste udaljenost od površine tako se izjednačava broj pozitivno i negativno nabijenih iona. Ova pojava se naziva dvostruki električni sloj ili dvosloj (Piljac, 2010.; Prakash i sur., 2014).



Slika 1 Shematski prikaz zeta potencijala (WEB 1)

Potencijal koji se javlja na udaljenosti te plohe smicanja naziva se zeta (ζ) potencijal.

Stoga, zeta potencijal (ζ -potencijal) predstavlja električni naboj molekula koje su suspendirane u tekućini. Također se naziva elektrokinetički potencijal, a mjeri se u milivoltima (mV) (Piljac, 2010; Prakash i sur., 2014).

Zeta potencijal se ne može izravno mjeriti te se zbog toga računa iz teorijskih modela ili procjenjuje eksperimentalno, često na temelju elektroforetske pokretljivosti. Čestice koje posjeduju zeta potencijal će putovati prema suprotnoj nabijenoj elektrodi.

Izračun se temelji na teoriji koju je 1903. opisao Marian Smoluchowski, a vrijedi za bilo koju koncentraciju ili oblik molekula. Stoga se, zeta potencijal može definirati **Jednadžbom 1**:

$$\zeta = \frac{4\pi\sigma\chi^{-1}}{\varepsilon} \quad (1)$$

gdje je σ - naboj po jedinici površine, χ^{-1} razmak koji opada porastom koncentracije i valencije iona. Koncentracija otopine obrnuto je proporcionalna zeta potencijalu. U slučaju da je vrijednost zeta potencijala jednaka nuli tada ne postoji vanjski odnosno Gouy-Chapmanov sloj (Metikoš-Huković i Martinez, 2004).

U **Tablici 1** prikazano je kako vrijednost zeta potencijala utječe na stabilnost i ponašanje molekula. Stabilnost sustava može se pratiti promjenom pH pufera, koncentracije i vrste iona (Hunter, 1988).

Tablica 1 Stabilnost i ponašanje molekula u ovisnosti o iznosu zeta potencijala

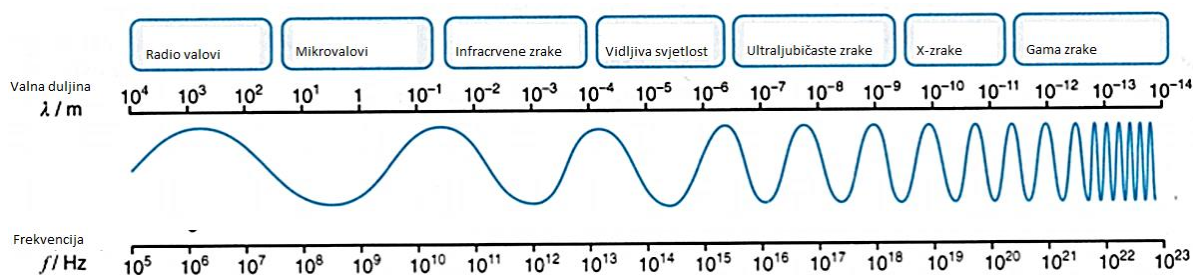
(Prakash i sur., 2014)

Zeta potencijal [mV]	Stabilnost i ponašanje molekula
0- ±5	Brza koagulacija i flokulacija
±10- ±30	Početna nestabilnost
±30- ±40	Srednja stabilnost
±40- ±60	Dobra stabilnost
Više od ±61	Odlična stabilnost

Razumijevanje električnih svojstava važno je za razvoj i dizajn proizvoda. Interakcija između sastojaka hrane utječe na strukturu, teksturu, boju i okus prehrambenog proizvoda. Primjena zeta potencijala ima utjecaj na razvoj novih proizvoda u različitim industrijama kao što su prehrambena, farmaceutska, metalna, kemijska industrija (Cano-Sarmiento, 2018).

2.2. UV/Vis SPEKTROSKOPIJA

UV/Vis spektroskopija je instrumentalna tehnika te se ubraja u spektroskopske metode, a primjenjuje se u svrhu analize različitih uzoraka. Spektroskopske metode temelje se na mjerenju interakcije između molekula i elektromagnetskog zračenja pri čemu molekula apsorbira ili emitira određenu količinu zračenja. Provođenjem ove instrumentalne tehnike dolazi do apsorpcije ultraljubičastog ili vidljivog zračenja biološki aktivnih molekula u otopini ili plinskoj fazi. S obzirom na količinu apsorbiranog zračenja računa se koncentracija ispitivane tvari u uzorku. Vidljivo ili ultraljubičasto zračenje predstavlja energiju koju uzorak apsorbira i uzrokuje pobuđivanje elektrona pri čemu oni prelaze iz osnovnog stanja u viši energetski nivo. UV i Vis spektrofotometar primjenjuje svjetlost u području valnih duljina od 185 do 400 nm u ultraljubičastom dijelu i od 400 do 700 nm u vidljivom dijelu (**Slika 2**). Snimljeni UV/Vis spektar predstavlja apsorpciju svjetlosti mjerenu kao funkciju njegove frekvencije ili valne duljine (Schmid, 2001; Jakobek Barron, 2020).



Slika 2 Prikaz elektromagnetskih valova (WEB 2)

Spektrofotometar je uređaj koji se koristi za snimanje spektra elektromagnetskog zračenja. On daje apsorbanciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Uređaj se sastoji od izvora svjetlosti, monokromatora (optičkih filtera) i detektora. Mjerenje se provodi na sobnoj temperaturi. Uzorak je u tekućem stanju, koji se ulijeva u staklene, plastične (Vis) ili kvarcne kivete (UV). Kivete se odabiru ovisno o području mjerenja. Izvor svjetlosti su najčešće deuterijeva lampa (emisija svjetlosti u UV području) i Wolframova nit (vidljivi dio spektra). Princip rada spektrofotometra je sljedeći: svjetlost prolazi kroz monokromator, razdvaja se prema valnim duljinama uz pomoć optičke rešetke (prizme) te se količina svjetlosti koja je prošla kroz uzorak, očitava na detektoru. Detektor sadrži fotoćeliju koja daje električni signal koji se pretvara u apsorbanciju. Uređaj radi na osnovi mjerenja i računanja razlike između intenziteta upadne svjetlosti i intenziteta svjetlosti koja je prošla kroz uzorak.

Jednadžba 2 prikazuje princip rada spektrofotometra, a predstavljaju Lambert-Beerov zakon:

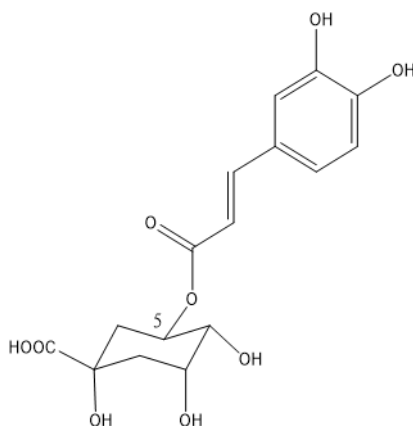
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

gdje je A apsorbancija na određenoj valnoj duljini, c množinska koncentracija (mol dm^{-3}), l debljina sloja otopine (cm), ε molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Što je veći broj molekula koje apsorbiraju zračenje, veća je i apsorbancija. Na osnovi snimljenog spektra zaključuje se na kojoj valnoj duljini molekula najbolje apsorbira zračenja (apsorpcijski maksimum). Nakon izmjerene apsorbancije primjenom Lambert-Beerovog zakona, može se odrediti i koncentracija tvari koje se ispituje (Schmid, 2001; Jakobek Barron, 2020).

UV/Vis spektroskopija primjenjuje se za analizu, identifikaciju i kvantifikaciju aktivnih tvari u hrani, biljkama, farmaceutskim pripravcima, poljoprivrednim i drugim proizvodima.

2.3. KLOGROGENSKE KISELINE

Klorogenske kiseline (CGAs) pripadaju skupini polifenolnih spojeva te su esteri hidroksicimetnih kiselina. One predstavljaju spojeve nastale esterifikacijom (-)-kina kiseline s hidroksicimetnim kiselinama koje mogu biti kafeinska, *p*-kumarinska, ferulična kiselina. Kemijsku strukturu klorogenskih kiselina čine jedna ili dvije kateholne skupine s dvije -OH skupine u *ortho*- položaju (Vermerris i Nicholson, 2006). Kemijska struktura najzastupljenijeg izomera klorogenske kiseline, 5-*O*-kafeoil-kina kiseline, prikazana je na **Slici 3**.



Slika 3 Strukturna formula klorogenske kiseline, 5-*O*-kafeoil-kina kiselina

Hidroksicimetne kiseline imaju sposobnost da u maloj koncentraciji odgode ili zaustave oksidacijske procese u biološkim sustavima. Antioksidansi doniraju svoje elektrone slobodnom radikalu i tako ga učine nedostupnim za daljnje reakcije. Slobodni radikali su nestabilne

molekule koje karakterizira slobodan elektron u vanjskoj valentnoj ljusci te zbog toga teže ulaze u reakcije s drugim molekulama (Santos-Sánchez i sur., 2019).

Izvori klorogenskih kiselina su namirnice biljnog podrijetla te različiti pripravci od biljnog materijala kao što su kava i čaj. Prema epidemiološkim istraživanjima, konzumiranje izvora klorogenskih kiselina pokazala su moguću biološku i farmakološku aktivnost, moguću antioksidativnu ulogu te moguće antiupalno i antitumorsko djelovanje na ljudski organizam. Također, pojedina epidemiološka istraživanja pokazala su moguću zaštitnu ulogu kod sprječavanja nastanka dijabetesa i pretilosti, a povezana su s metabolizmom glukoze. Zatim, klorogenska kiselina, dobivena iz ekstrakta zelene kave, pokazala je moguću učinkovitost u borbi protiv visokog krvnog tlaka (hipertenzija). Nadalje, klorogenska kiselina može utjecati na koncentraciju (snižavati koncentraciju) dušikovog oksida i djelovati opuštajuće na krve žile. Primijećen je i mogući antimikrobni učinak klorogenske kiseline u obliku konzervansa ili dodataka hrani te mogući baktericidni učinak na *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* i vjerojatno antifungalno djelovanje na staničnu membranu gljivica, *Candida albicans* (Naveed i sur., 2017; Belkaid i sur., 2006; Thom, 2007; Higdon i Frei, 2006; Clifford i sur., 2020; Anggreani i Lee, 2017).

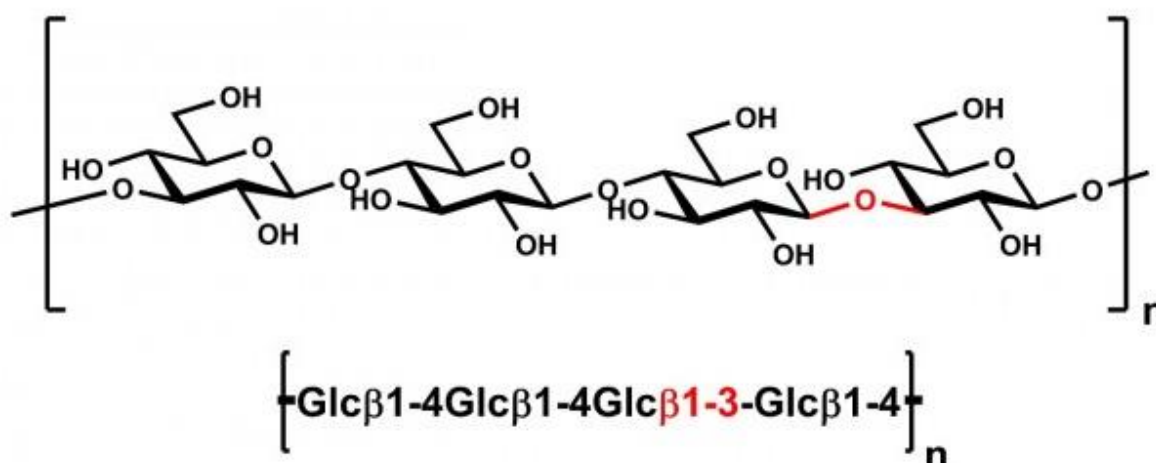
U svrhu identifikacije i kvantifikacije klorogenskih kiselina najčešće se primjenjuju instrumentalne tehnike kao što su kromatografija, spektroskopija, elektrokemijske metode.

2.4. PREHRAMBENA VLAKNA

Prehrambena vlakna su dio biljnog materijala, a mogu biti topljiva i netopljiva u vodi. Također, prehrambena vlakna mogu se još definirati kao jestivi dijelovi biljaka koji su otporni na probavu i apsorpciju u tankom crijevu te dolazi do potpuno ili samo djelomične fermentacije u debelom crijevu (De Vries, 2001). Stoga, topljiva vlakna su pektin, gume, biljni lijepak i ona fermentiraju. Netopljiva vlakna su celuloza, hemiceluloza, lignin i ona djelomično fermentiraju (Dhingra i sur., 2012). Unos hrane bogate vlaknima vjerojatno snižava krvni tlak, poboljšava krvnu sliku i slično. Anaerobnom fermentacijom koju uzrokuju bakterije dolazi do stvaranja plinova (metan, vodik i ugljikov dioksid) koji mogu uzrokovati osjećaj napuhnutosti (Othles i Ozgoz, 2014). Dnevni unos prehrambenih vlakana ovisi o dobi, spolu, energetske unosu i preporukama (Anderson i sur., 2009). Dijetalna vlakna mogu se odrediti različitim instrumentalnim tehnikama, kao što su enzimске, gravimetrijske i enzimsko-kemijske metode (Dhingra i sur., 2012).

2.4.1. β -glukan

β -glukani su neprobavljivi polisaharidi koji se javljaju u prirodi u različitim organskim izvorima kao što su žitarice, kvasci, bakterije, alge. Predstavljaju važne komponente vlakana koja sadrže nerazgranati polisaharidi, a sastoje se od β -D-glukopiranozne jedinice povezane preko (1 $\rightarrow$ 4) i (1 $\rightarrow$ 3) glikozidne veze u žitaricama i (1 $\rightarrow$ 6) glikozidne veze u izvorima gljiva (**Slika 4**). Njihova struktura ima utjecaj na topljivost β -glukana u vodi.



Slika 4 Struktura β -glukana (WEB 3)

Glukani iz žitarica su obično koncentrirani u unutarnjem aleuronu i subaleuronu stjenki stanica endosperma. Od žitarica, najveća količina β -glukana nalazi se u zrnima ječma i zobi (Havrlentová i sur., 2011). Glukani iz mikrobioloških izvora se mogu pronaći unutar ili na površini mikrobnih stanica ili se izlučuju izvanstanično mikrobnim stanicama u susjedno okruženje (Ciecierska i sur., 2019). Prvi put je 1968. godine β -glukan izoliran iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyes cerevisiae* (Vis i Lorenz, 1996).

U svrhu određivanja β -glukana najčešće se koriste enzimске, kromatografske, enzimsko-gravimetrijske i ekstrakcije metode (Havrlentová i sur., 2011).

Epidemiološka istraživanja pokazala su moguća antibakterijska, antivirusna i imunomodulirajuća svojstva β -glukana iz izvora gljiva, za prevenciju i terapiju u humanoj medicini (stimulacija makrofaga kroz receptor β -glukana smješteni na njihovim površinama). Nadalje, neki β -glukani iz mikrobioloških izvora pokazali su se kao mogući stimulansi imunološkog mehanizma te kao mogući antitumorski i antimikrobni zaštitnici (Havrlentová i sur., 2011; Petravić-Tominac i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak diplomskog rada je bio provesti elektrokinetičko istraživanje stabilnosti modela klorogenske kiseline i β -glukana, te otopine klorogenske kiseline i otopine β -glukana kroz različite pH vrijednosti pufera i u određenom vremenskom periodu te snimiti njihove UV/Vis spektre.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Priprema otopina

Otopine korištene u ovom diplomskom radu su klorogenska kiselina, β -glukan, ultračista voda, karbonatni pufer, fosfatni pufer, kalijev klorid i klorovodična kiselina.

Pripremila se otopina klorogenske kiseline masene koncentracije 1900 mg L^{-1} u metanolu, HPLC čistoće te je za elektrokinetičko i spektroskopsko istraživanje razrijeđena u slijedećim masenim koncentracijama: 25, 50, 75, 100 do 150 mg L^{-1} . Razrjeđenja su se pripremala u pufer otopinama pH vrijednosti 1,5, 5,5, 7,5 i 10.

Otopina β -glukana masene koncentracije 190 mg L^{-1} , a za istraživanje u ovom diplomskom radu upotrijebila se masena koncentracija 5 mg L^{-1} . Razrjeđenja su pripremana u odgovarajućim pufer otopinama pH vrijednosti 1,5, 5,5, 7,5 i 10.

Model otopina pripremljena je od otopine klorogenske kiseline masene koncentracije 25 mg L^{-1} i otopine β -glukana masene koncentracije 5 mg L^{-1} te je razrijeđena u odgovarajućim pufer otopinama pH vrijednosti 1,5, 5,5, 7,5 i 10.

3.2.2. UV/Vis spektar

Snimanje UV/Vis spektara otopina klorogenske kiseline (25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) te modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) provedeno je pomoću UV/Vis spektrofotometra UV-1280 tvrtke Shimadzu (**Slika 5**) u području valnih duljina (λ) od 200 do 1100 nm u vremenskom periodu od 0, 1, 2, 5 i 16 sati. UV/Vis spektri otopina i modela snimani su u različitim puferskim otopinama pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10.



Slika 5 Prikaz UV/Vis spektrofotometra (Shimadzu UV-1280)

3.2.3. Zeta potencijal

U ovom diplomskom radu korišten je uređaj Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Velika Britanija) (**Slika 6**) za mjerenje zeta potencijala ispitanih otopina i modela. Zetasizer 2000 je kompjutorski kontrolirani laboratorijski uređaj za mjerenje zeta potencijala u različitim uzorcima te upotrebljava sofisticiranu lasersku interferometrijsku M3-PALS (fazna analiza rasipanja svjetlosti) tehniku. Uzorci za analizu injektirani su špricom u količini najmanje od 5 mL u uređaj Zetasizer 2000. Mjerenje se provodi na sobnoj temperaturi (25 °C) u tri paralele te se za izračun koristi srednja vrijednost.

Zeta potencijal mjerio se u otopinama klorogenske kiseline masene koncentracije (25, 50, 75, 100 i 150 mg L⁻¹) i u otopini β -glukana (5 mg L⁻¹) te u modelu klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹) u puferskim otopinama pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10 u vremenskom periodu od 0, 1, 2, 5 i 16 sati.

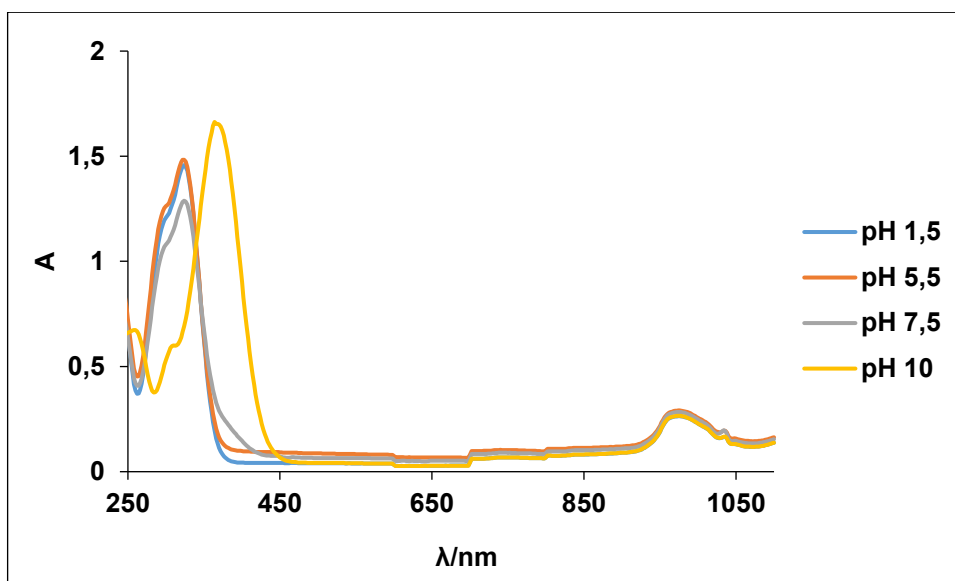


Slika 6 Uređaja za mjerenje zeta potencijala (Zetasizer 2000)

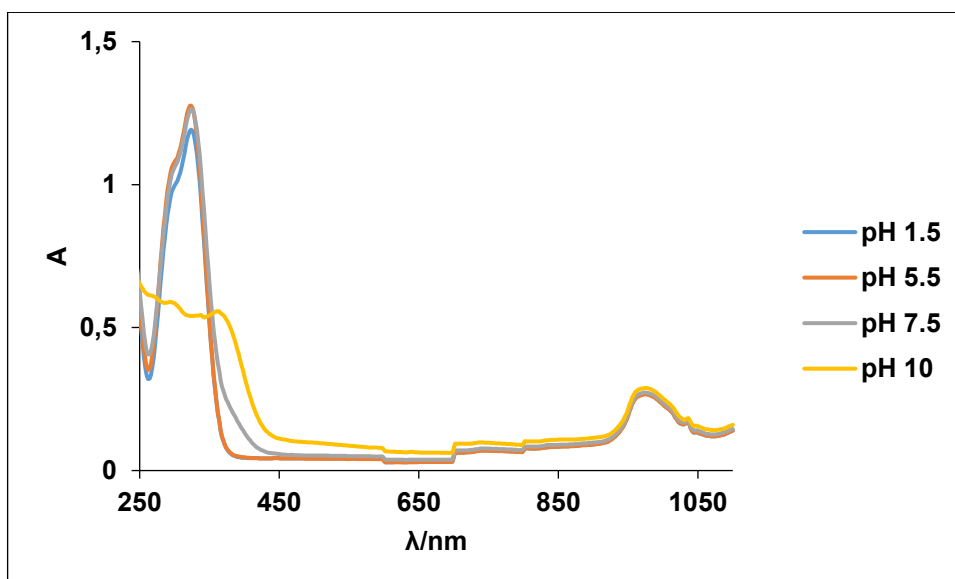
4. REZULTATI

4.1. UV/Vis SPEKTRI

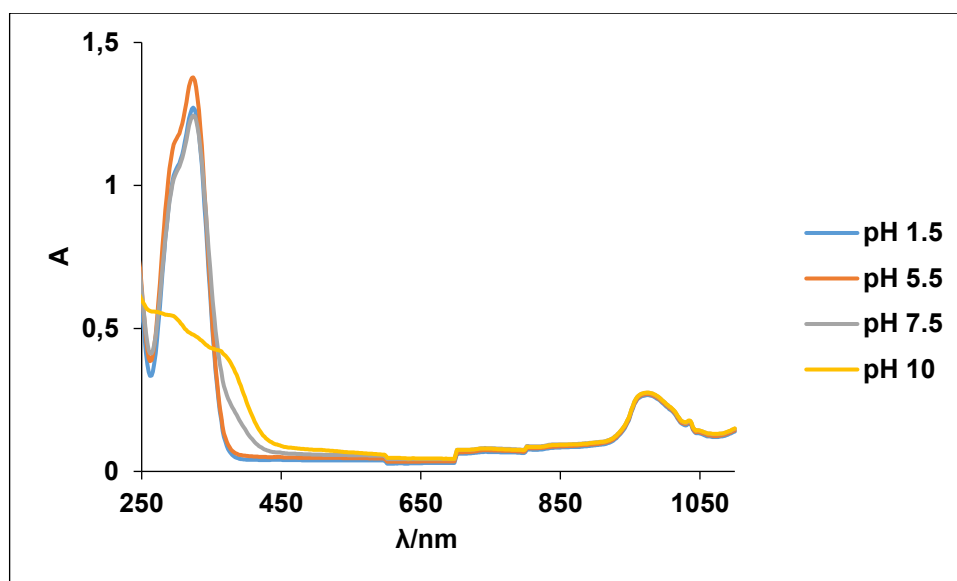
4.1.1. UV/Vis spektri modela klorogenske kiseline – β -glukan



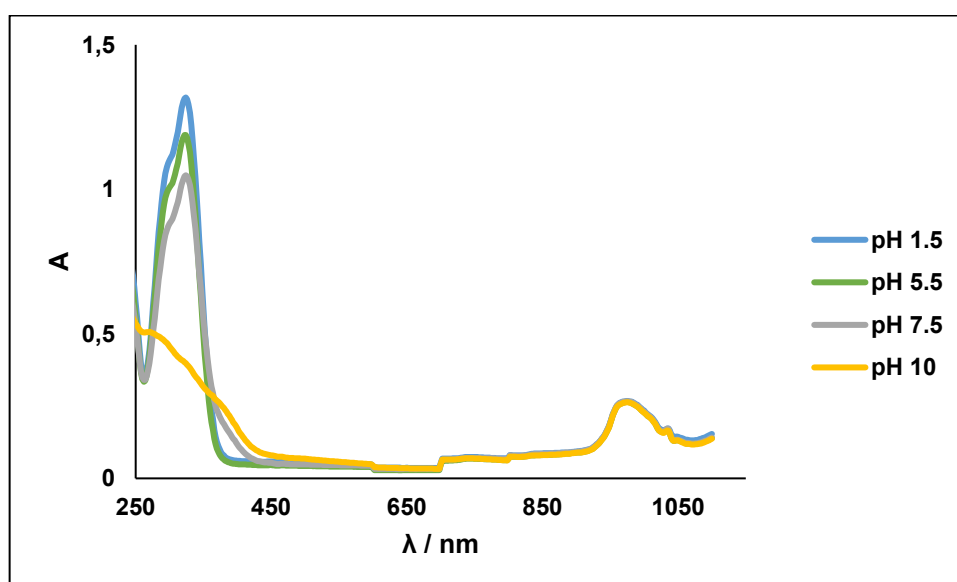
Slika 7 UV/Vis spektar modela klorogenske kiseline (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) u nultom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



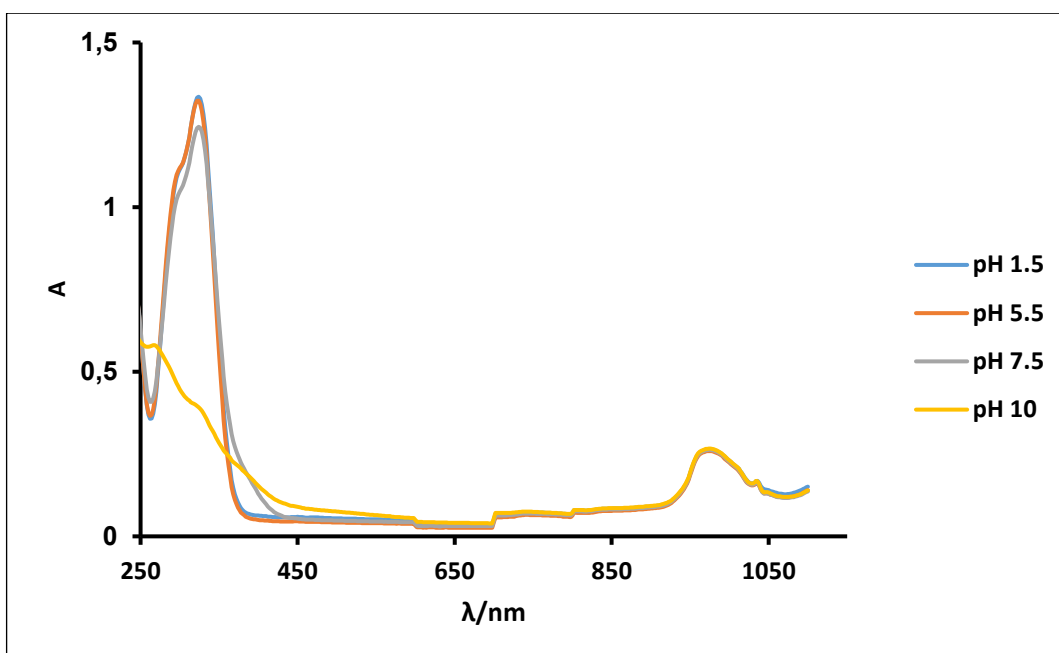
Slika 8 UV/Vis spektar modela klorogenske kiseline (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) u prvom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



Slika 9 UV/Vis spektar modela klorogenske kiseline (25 mg L⁻¹) i β-glukana (5 mg L⁻¹) u drugom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

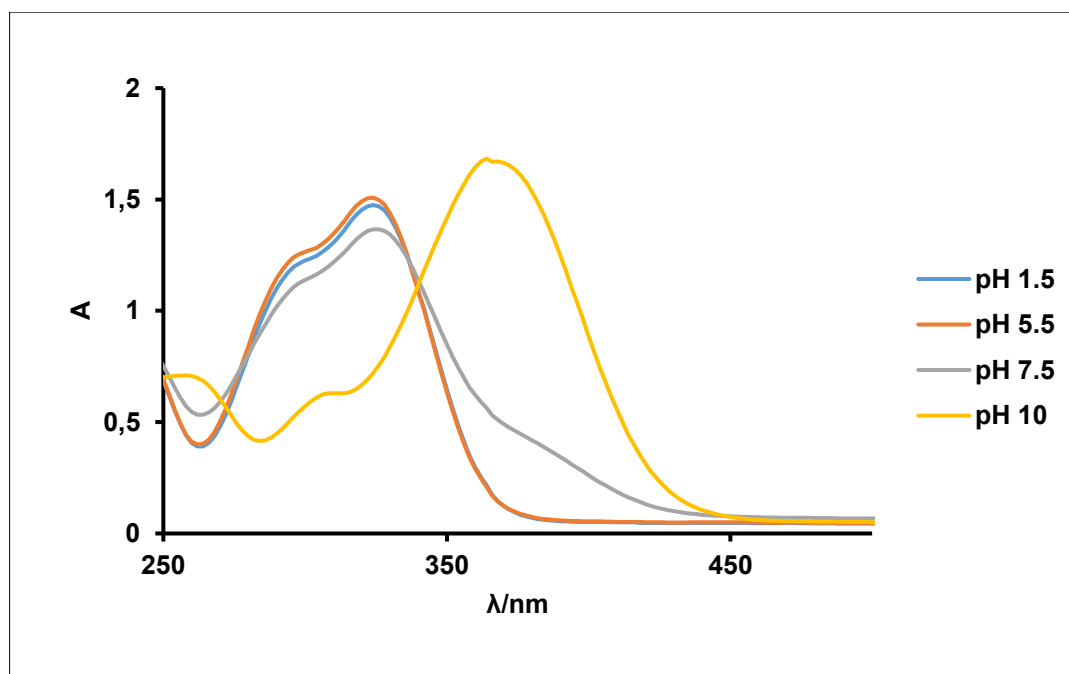


Slika 10 UV/Vis spektar modela klorogenske kiseline (25 mg L⁻¹) i β-glukana (5 mg L⁻¹) u petom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

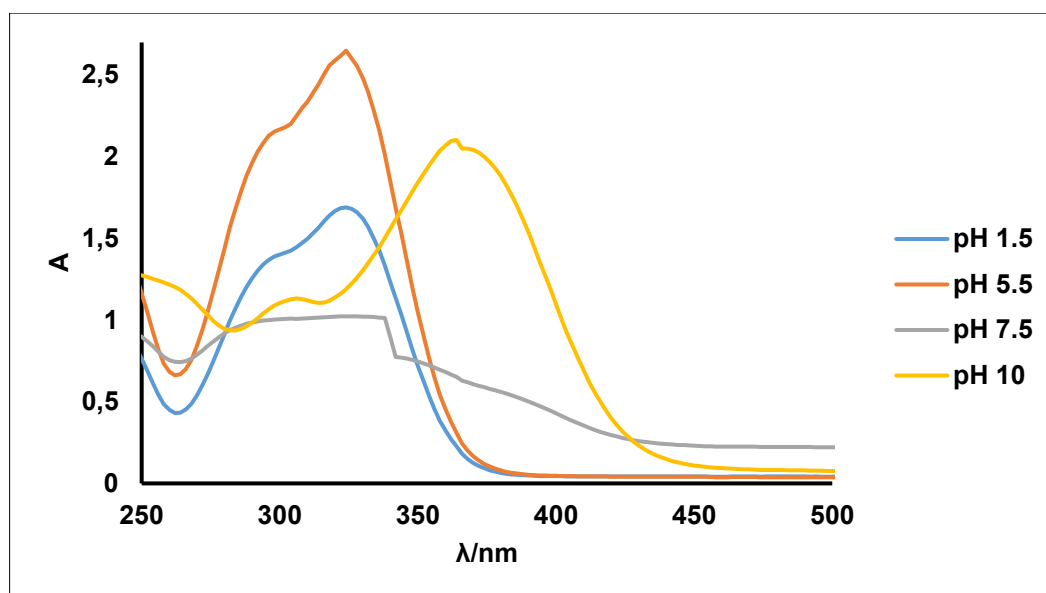


Slika 11 UV/Vis spektar modela klorogenske kiseline (25 mg L⁻¹) i β-glukana (5 mg L⁻¹) u šesnaestom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

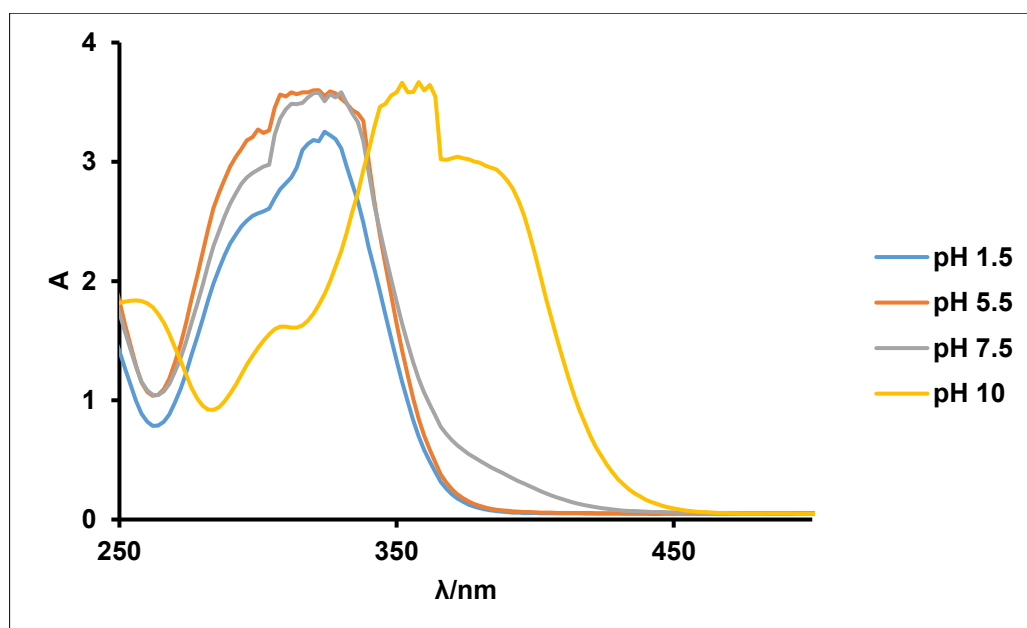
4.1.2. UV/Vis spektri otopine klorogenske kiseline



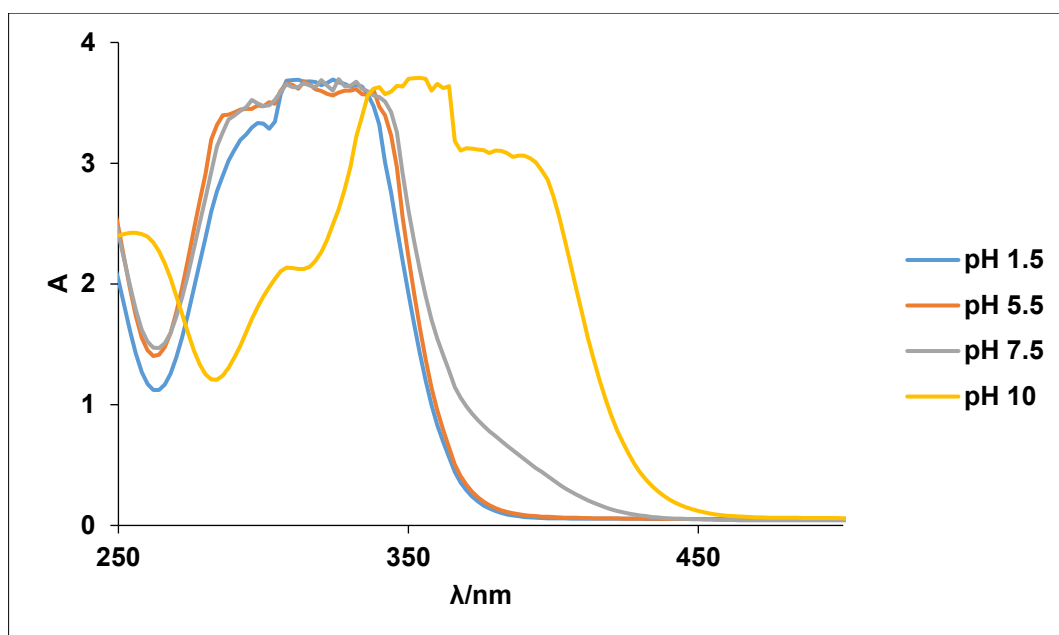
Slika 12 UV/Vis spektar otopine klorogenske kiseline (25 mg L⁻¹) pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



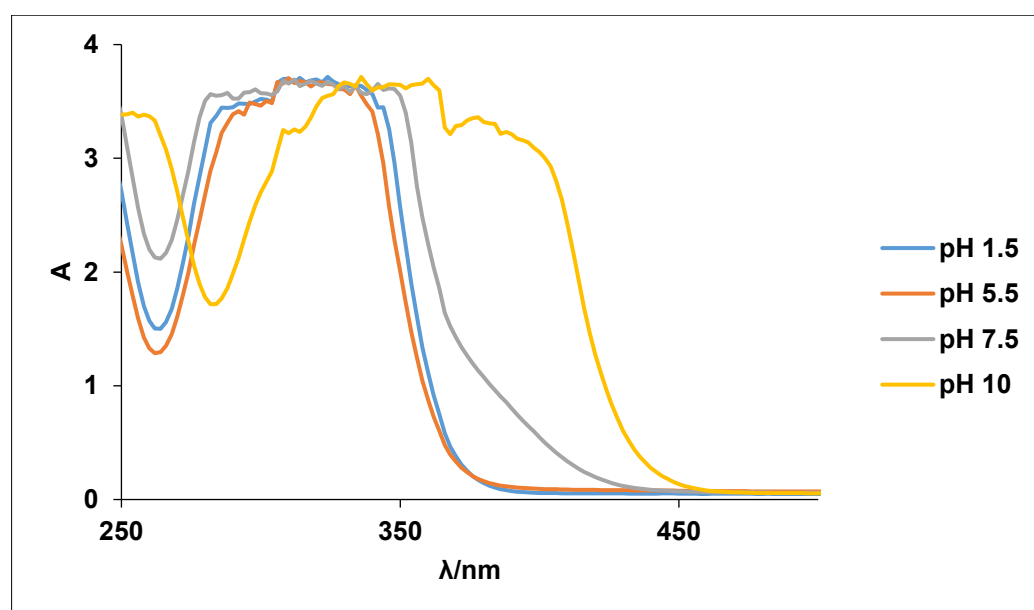
Slika 13 UV/Vis spektar otopine klorogenske kiseline (50 mg L^{-1}) pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



Slika 14 UV/Vis spektar otopine klorogenske kiseline (75 mg L^{-1}) pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

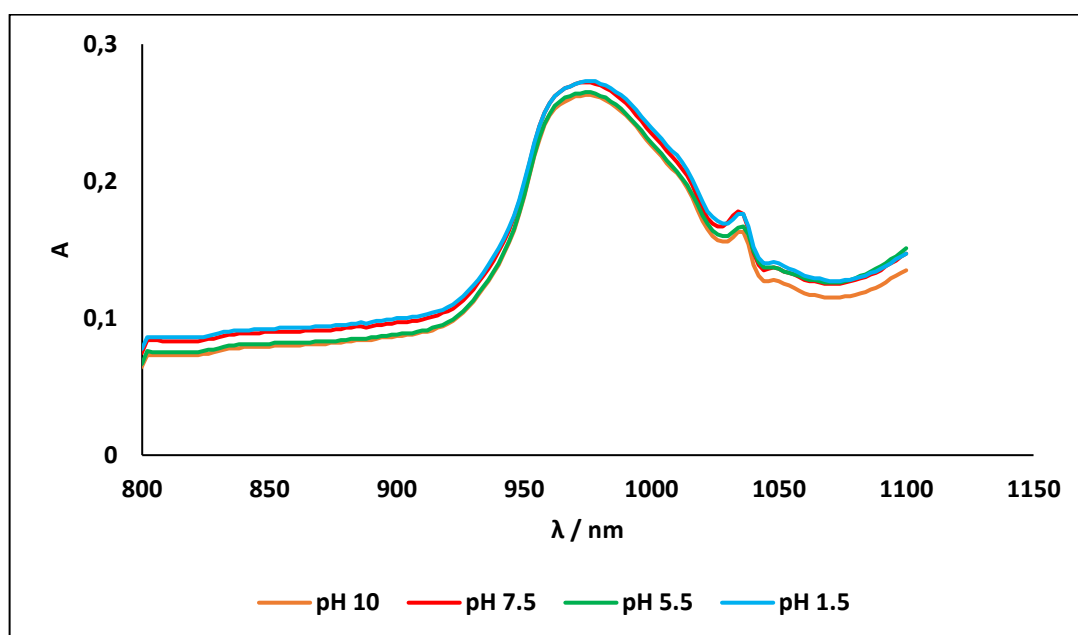


Slika 15 UV/Vis spektar otopine klorogenske kiseline (100 mg L^{-1}) pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



Slika 16 UV/Vis spektar otopine klorogenske kiseline (150 mg L^{-1}) pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

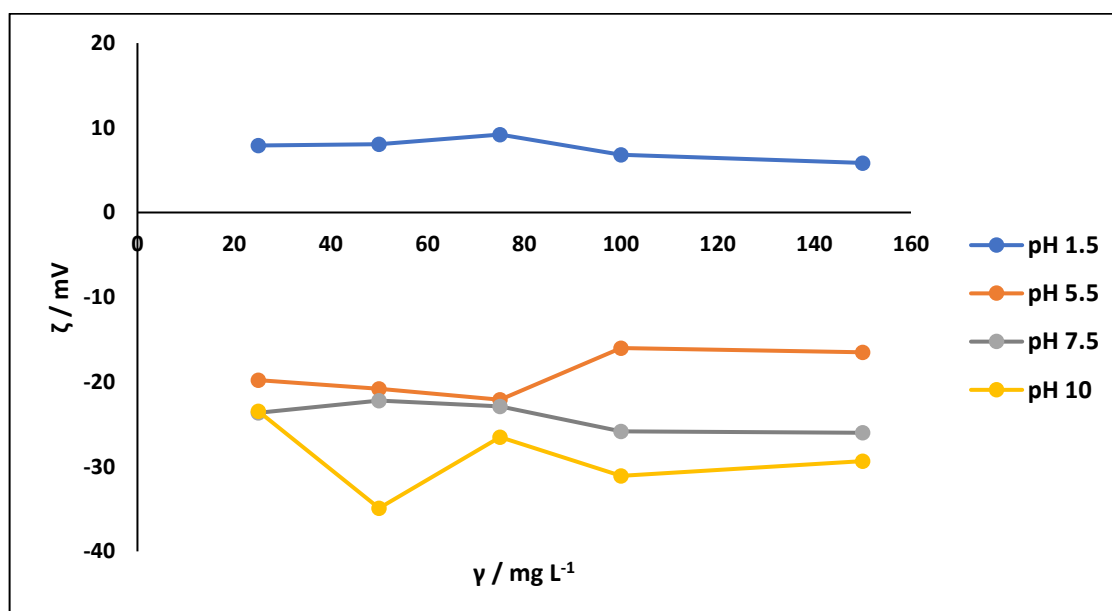
4.1.3. UV/Vis spektri otopine β -glukana



Slika 17 UV/Vis spektar β -glukana (5 mg L⁻¹) pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

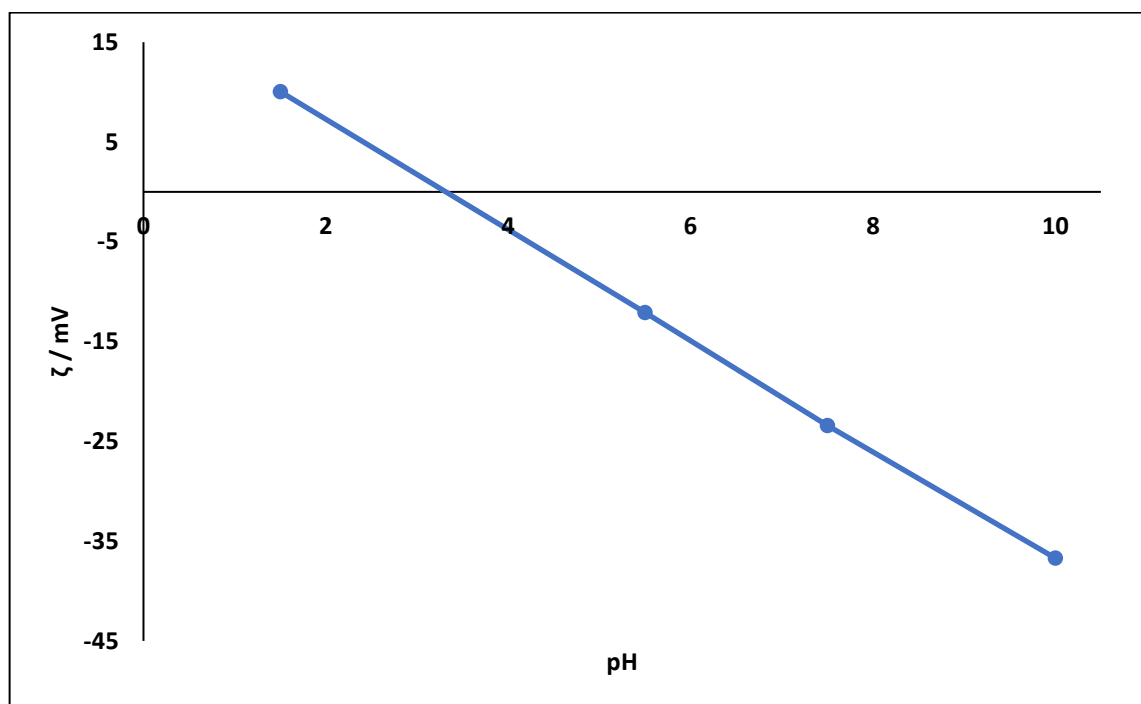
4.2. ZETA POTENCIJAL

4.2.1. Zeta potencijal otopine klorogenske kiseline



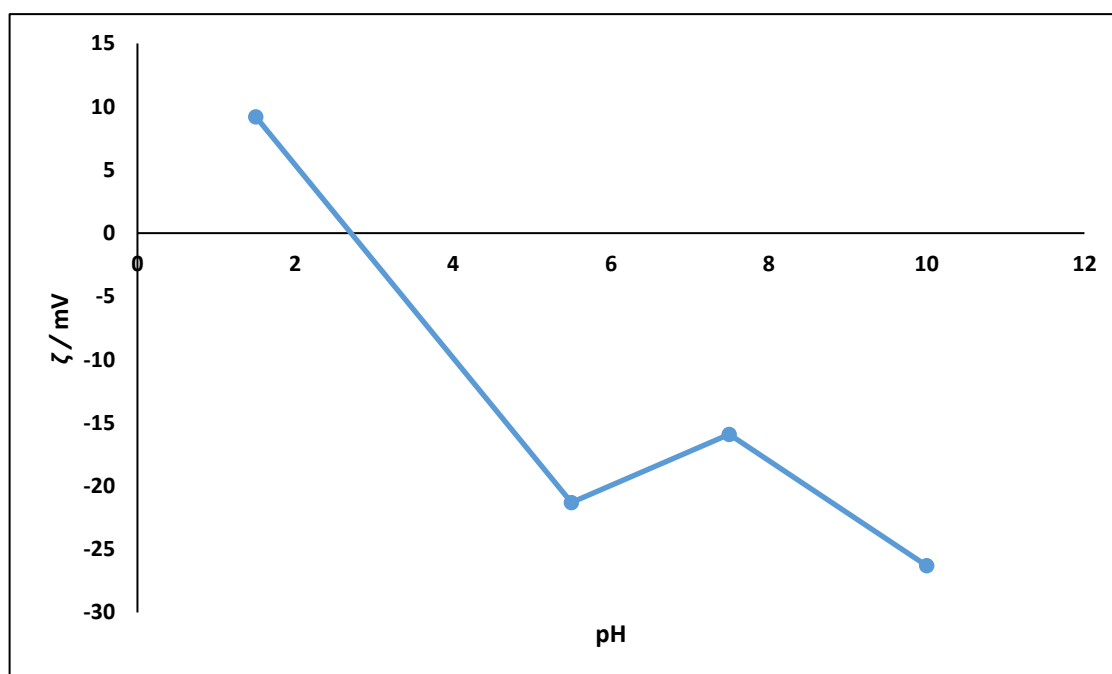
Slika 18 Zeta potencijal otopine klorogenske kiseline (γ = 25, 50, 75, 100 i 150 mg L⁻¹) u ovisnosti o pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

4.2.2. Zeta potencijal otopine β -glukana

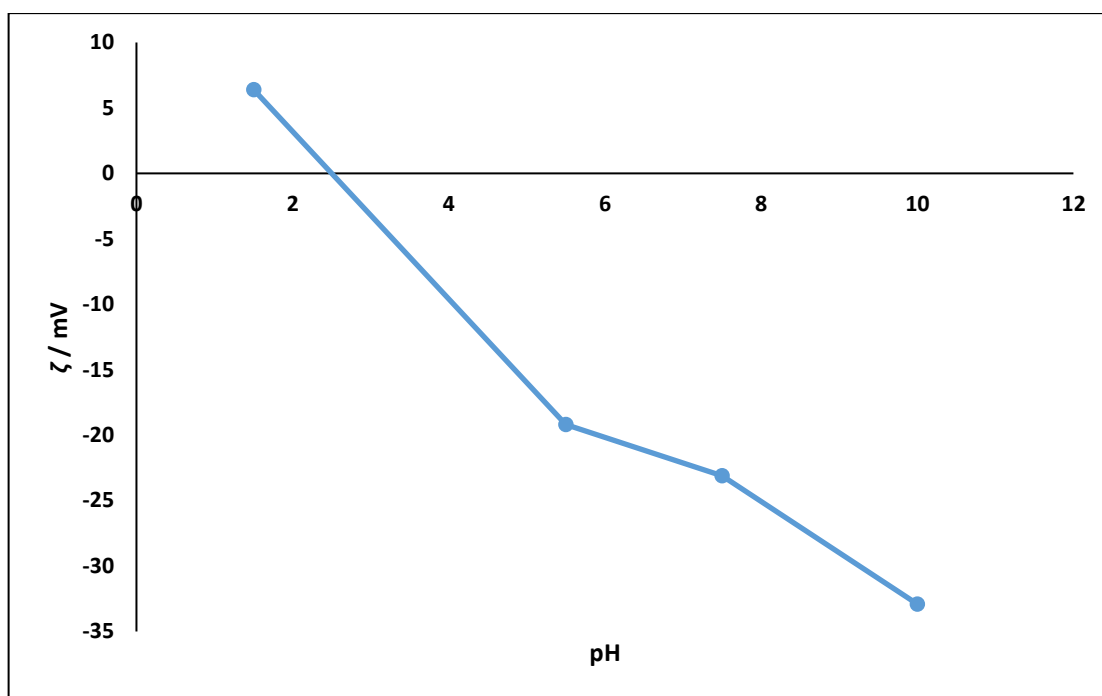


Slika 19 Ovisnost zeta potencijal otopine β -glukana (5 mg L^{-1}) o pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

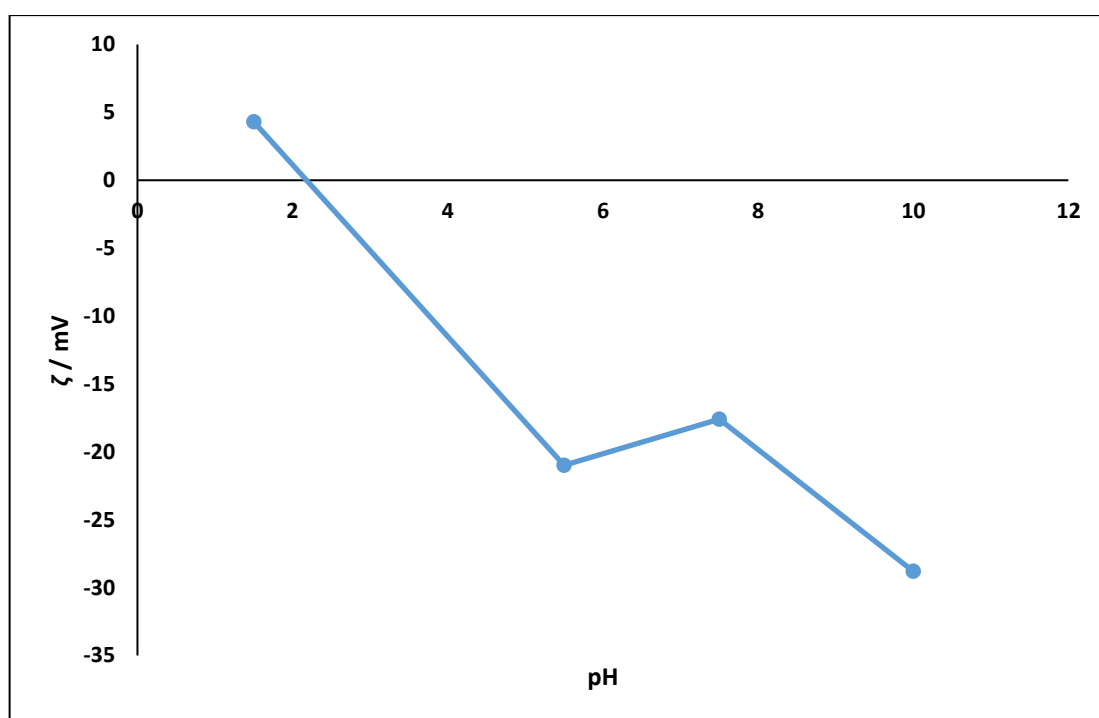
4.2.3. Zeta potencijal modela klorogenska kiselina – β -glukan



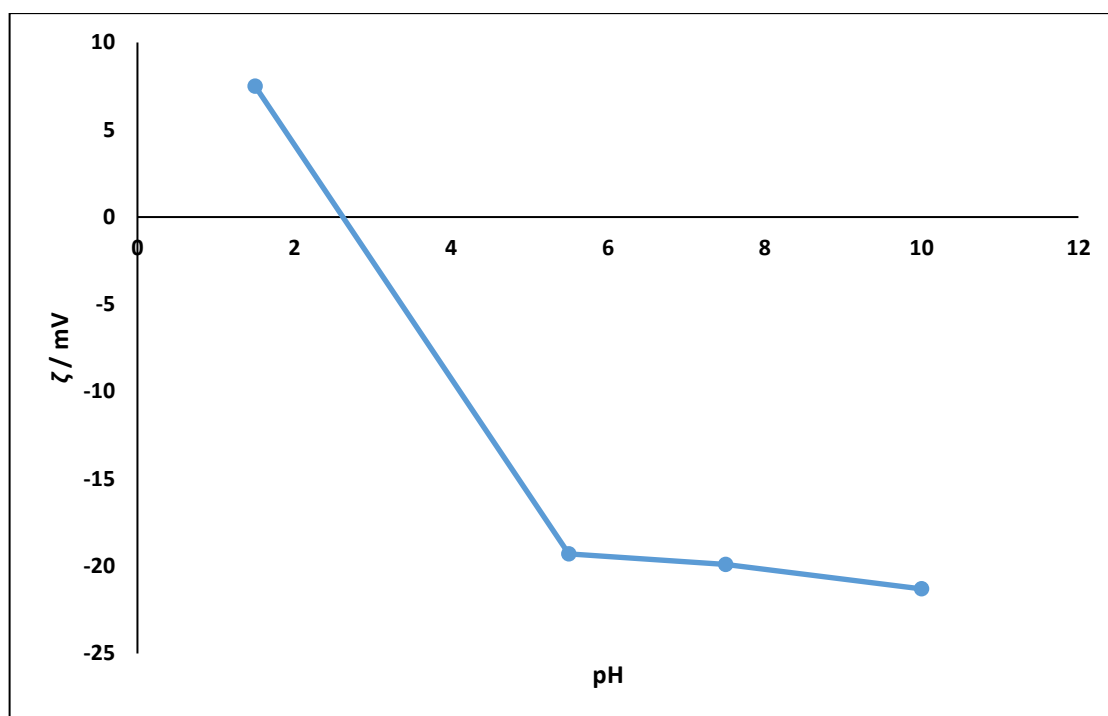
Slika 20 Zeta potencijal modela klorogenske kiseline (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) u nultom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



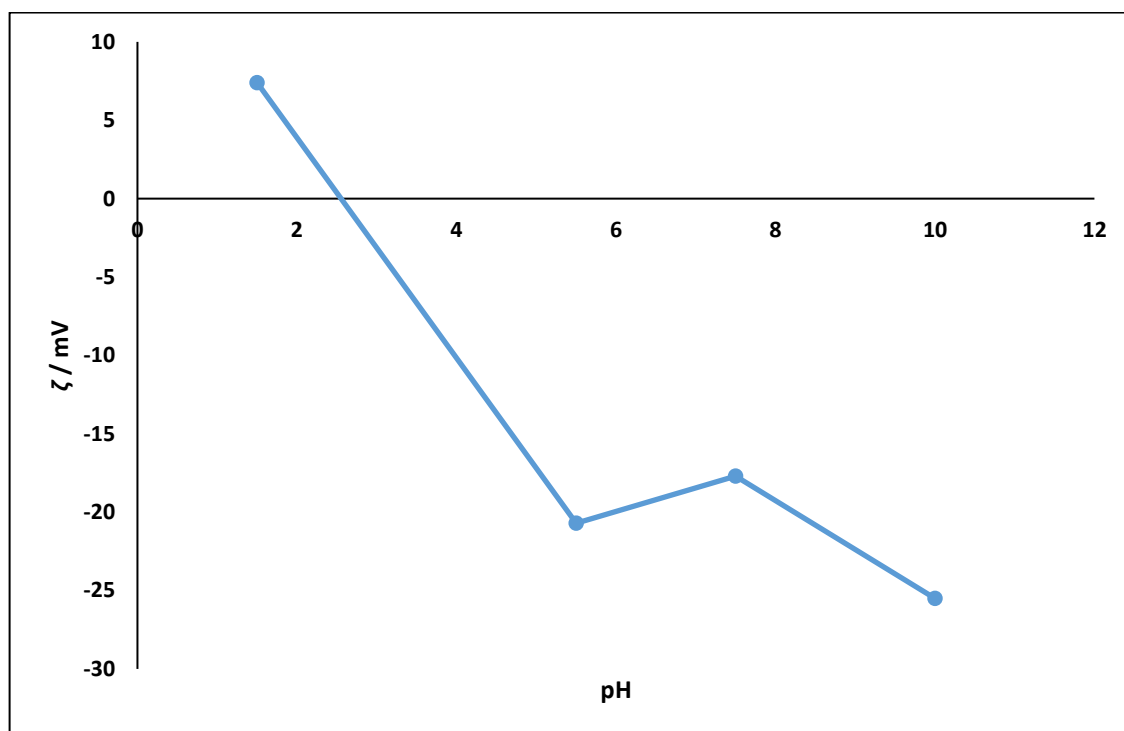
Slika 21 Zeta potencijal modela klorogenske kiseline (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) u prvom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



Slika 22 Zeta potencijal modela klorogenske kiseline (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) u drugom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



Slika 23 Zeta potencijal modela klorogenske kiseline (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) u petom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10



Slika 24 Zeta potencijal modela klorogenske kiseline (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) u šesnaestom satu pri pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10

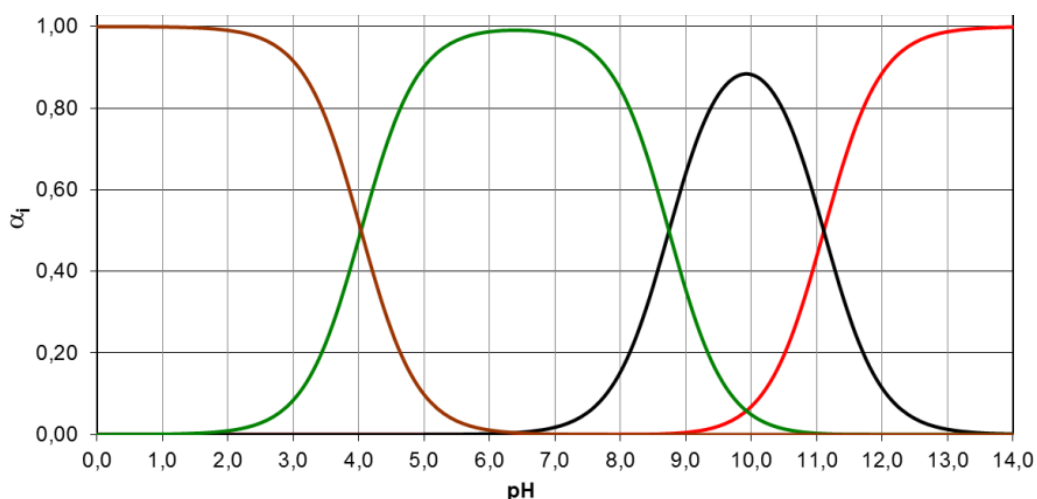
5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu primijenilo se elektrokinetičko istraživanje na ponašanje otopine β -glukana, otopine klorogenske kiseline i modela klorogenska kiselina – β -glukan za utvrđivanje najstabilnijeg oblika modela te su se snimili i njihovih UV/Vis spektri.

UV/Vis spektri otopine β -glukana ($\gamma = 5 \text{ mg L}^{-1}$), otopina klorogenske kiseline ($\gamma = 25, 50, 75, 100 \text{ i } 150 \text{ mg L}^{-1}$) i modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) snimljeni su u području valnih duljina (λ) od 200 do 1100 nm. Na **Slikama** od **7** do **17** su prikazani snimljeni UV/Vis spektri ispitanih otopina. Model klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) pratio se u vremenskom periodu od nultog, prvog, drugog, petog i šesnaestog sata u pH vrijednostima od 1,5, 5,5, 7,5 i 10, a snimljeni UV/Vis spektri prikazani su na **Slikama 7-11**. Snimljeni UV/Vis spektri modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) pokazali su dva apsorpcijska maksimuma u rasponu valnih duljina od 326 do 362 nm i na valnoj duljini od 984 nm. Model klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) pri pH 10 u nultom satu pokazuje apsorpcijski maksimum pri 362 nm, dok od prvog do šesnaestog sata se visina apsorpcijskog maksimuma smanjuje. U pH 1,5, 5,5 i 7,5 apsorpcijski maksimum modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) je stabilan i nalazi se na 330 nm. Apсорpcijski maksimum pri valnoj duljini od 330 nm odgovara prisustvu hidrokisicimetnih kiselina odnosno klorogenskoj kiselini, dok apсорpcijski maksimum na 984 nm vjerojatno odgovara β -glukanu (Belay i Gholap, 2009). Da bi se potvrdili apсорpcijski maksimumi modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}), snimljeni su pri istim uvjetima, UV/Vis spektri otopina klorogenske kiseline masenih koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1} i otopine β -glukana (5 mg L^{-1}). UV/Vis spektri otopina klorogenske kiseline masenih koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1} prikazani su na **Slikama 12-16** te se uočava jedan jasno izraženi apсорpcijski maksimum pri 326 nm u pH 1,5, 5,5 i 7,5 te na oko 360 nm u pH 10 te pretpik na valnoj duljini od oko 326 nm, što je uočeno i kod modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}). Belay i Gholap (2009) te Navarra i suradnici (2017) uočili su apсорpcijski maksimum klorogenske kiseline na oko 326 nm (pretpik 300 nm), kao što je i dobiveno u ovom diplomskom radu. Porastom masene koncentracije klorogenske kiseline poveća se i apсорbancija. Zatim su snimljeni UV/Vis spektri otopine β -glukana (5 mg L^{-1}) pri jednakim uvjetima kao kod modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) te su prikazani na **Slici 17**. Apсорpcijski maksimum otopine β -glukana (5 mg L^{-1}) u pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10 je pri valnoj duljini od 984 nm te nije uočen utjecaj promjene pH vrijednosti na pomak apсорpcijskog maksimuma otopine β -glukana (5 mg L^{-1}) (Wu i sur., 2011). Iz snimljenih UV/Vis spektara modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) i otopine β -glukana (5 mg L^{-1}) može se pretpostaviti da valna duljina od 984 nm odgovara prisustvu β -glukana. Na snimljene UV/Vis spektre modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}),

različite pH vrijednosti pufera i različiti vremenski periodi imaju utjecaj na izgled apsorpcijskih spektara.

Nadalje, ispitan je utjecaj pH, koncentracije i vremenskog perioda na električni parametar, zeta potencijal, na stabilnost modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) te na otopinu β -glukana (5 mg L^{-1}) i različite koncentracije klorogenske kiseline. Na **Slici 18** prikazan je grafički prikazi ovisnosti zeta potencijala različitih masenih koncentracija otopine klorogenske kiseline o pH vrijednosti pufera. U kiselom mediju vrijednosti zeta potencijala su pozitivne i iznose za sve ispitane koncentracije klorogenske kiseline ($25, 50, 75, 100$ i 150 mg L^{-1}) od $+5$ do $+10 \text{ mV}$. Zatim u pH $5,5, 7,5$ i 10 vrijednost zeta potencijala otopina klorogenske kiseline ($\gamma = 25, 50, 75, 100$ i 150 mg L^{-1}) je negativna te su zabilježene najniže vrijednosti zeta potencijala pri pH 10 . Raspon vrijednosti zeta potencijala za ispitane masene koncentracije otopine klorogenske kiseline su od -25 do -35 mV što prema teorijskim osnovama govori da je molekula klorogenske kiseline u pH 10 stabilna i nalazi se u anionskom obliku (Salopek i sur., 1992). Također, da bi se potvrdio i usporedio oblik molekule napravljena je simulacija distribucijskog dijagrama. Distribucijski dijagram prikazan je na **Slici 25**.



Slika 25 Distribucijski dijagram otopine klorogenske kiseline (Tomic, 2016)

Iz distribucijskog dijagrama otopine klorogenske kiseline uočava se da su pri pH vrijednostima $3,0$ i $4,0$ prisutne neutralna molekula klorogenske kiseline i njezin anion, a pri pH vrijednosti $5,0$ - $12,0$ anioni CGA^- i CGA^{2-} . Anion CGA^- nastao je disocijacijom karboksilne skupine (deprotonizacija) na cikloheksanskom prstenu kina kiseline u strukturi CGA (Janeiro i Brett, 2004). Usporedbom vrijednosti zeta potencijala za otopinu klorogenske kiseline ($\gamma = 25, 50, 75, 100$ i 150 mg L^{-1}), distribucijskog dijagrama klorogenske kiseline i mehanizma oksidacije klorogenske kiseline uočava se jednak oblik molekule pri različitim pH vrijednostima.

Nadalje, ispitan je utjecaj pH pufera na vrijednost zeta potencijala otopine β -glukana, masene koncentracije 5 mg L^{-1} (**Slika 19**). Iz **Slike 19** uočava se linearno opadanje iznosa zeta potencijala porastom pH vrijednosti te je u kiselom mediju pozitivna vrijednost, a u ostalim pH

negativna vrijednost. Najnegativniju vrijednost zeta potencijala, ujedno i najvišu vrijednost zeta potencijala, otopina β -glukana pokazuje u pH 10 ($\zeta = -35$ mV). Jednak iznos zeta potencijala otopine β -glukana dobili su i autori Anusuya i Sathiyabama (2014) iako su oni temeljili svoje istraživanje na kreiranju β -glukan nanočestice. Ova vrijednost zeta potencijala otopine β -glukana govori da je otopina u pH 10 najstabilnija (Upadhyay i sur., 2017).

Dobivene vrijednosti zeta potencijala otopine klorogenske kiseline i β -glukana usporedile su se s modelom klorogenska kiselina – β -glukan. Pripremljen je model klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹), a stabilnost modela klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹) se pratila kroz promjene u iznosu zeta potencijala u pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10 te kroz vremenski period od nultog do šesnaestog sata. Na **Slikama od 20 do 24** prikazane su ovisnosti zeta potencijala modela klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹). Model klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹) pokazao se najstabilniji u pH 10 jer su vrijednosti zeta potencijala najviše u tom mediju i iznose od -28 do -30 mV (Metikoš-Huković i Martinez, 2000; Piljac, 2010). Vrijednosti zeta potencijala modela klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹) su slične vrijednostima zeta potencijala otopine klorogenske kiseline i otopine β -glukana. Također, utjecaj vremenskog perioda istraživanja na stabilnost modela klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹) pokazao je da se najviše promjena zeta potencijala događa u prvih pet sati eksperimenta dok u preostalom vremenskom periodu do šesnaest sati vrijednost zeta potencijala je bez promjena. Nadalje, drugi sat provođenja eksperimenta pokazao je najveći iznos zeta potencijala modela klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹) koji iznosi -32,9 mV u pH 10 te prema teoriji stabilnosti se pokazao kao najstabilniji.

Iz provedenog istraživanja u ovom diplomskom radu može se zaključiti da na UV/Vis spektre i vrijednost zeta potencijala modela klorogenska kiselina (25 mg L⁻¹) – β -glukan (5 mg L⁻¹) utječe promjena pH vrijednosti, vrijeme ispitivanja i koncentracija, a očituje se u izgledu UV/Vis spektara i iznosu zeta potencijala.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovi ovog diplomskog rada može se zaključiti:

- Snimljeni UV/Vis spektri modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) pokazali su dva apsorpcijska maksimuma u rasponu valnih duljina od 326 do 362 nm te na valnoj duljini od 984 nm. Apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 330 nm odgovara prisustvu hidroksicimetnih kiselina odnosno klorogenskoj kiselini, dok apsorpcijski maksimum na 984 nm vjerojatno odgovara prisustvu β -glukana.
- UV/Vis spektri otopina klorogenske kiseline masenih koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1} pokazali su jedan jasno izraženi apsorpcijski maksimum pri 326 nm u pH 1,5-7,5 te na oko 360 nm u pH 10 te pretpik na valnoj duljini od oko 326 nm, što je uočeno i kod modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}).
- Apsorpcijski maksimum otopine β -glukana (5 mg L^{-1}) u pH 1,5-10 je pri valnoj duljini od 984 nm te nije uočen utjecaj promjene pH vrijednosti na pomak apsorpcijskog maksimuma otopine β -glukana (5 mg L^{-1}).
- Raspon vrijednosti zeta potencijala za ispitane masene koncentracije otopine klorogenske kiseline su od -25 do -35 mV što govori da je molekula klorogenske kiseline u pH 10 stabilna i nalazi se u anionskom obliku.
- Najnegativniju vrijednost zeta potencijala, ujedno i najvišu vrijednost zeta potencijala, otopina β -glukana pokazuje u pH 10 ($\zeta = -35 \text{ mV}$).
- Model klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) pokazao se najstabilniji u pH 10 jer su vrijednosti zeta potencijala najviše u tom mediju i iznose od -28 do -30 mV.
- Drugi sat provođenja eksperimenta pokazao je najveći iznos zeta potencijala modela klorogenska kiselina (25 mg L^{-1}) – β -glukan (5 mg L^{-1}) koji iznosi -32,9 mV u pH 10 te se pokazao za ovaj model kao najstabilniji.
- Na UV/Vis spektre i vrijednost zeta potencijala modela klorogenska kiselina – β -glukan utječe promjena pH vrijednosti, vrijeme ispitivanja i koncentracija, a očituje se u izgledu UV/Vis spektara i iznosu zeta potencijala.

7. LITERATURA

- Anderson JW, Baird P, Davis RH, Ferreri S, Kundston M, Koraym A, Waters V, Williams CL: Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*: 67:188-205, 2009.
- Anggreani E, Lee CY: Neuroprotective Effect of Chlorogenic Acids against Alzheimer's Disease. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* 6:330-337, 2017.
- Anusuya S, Sathiyabama M: Preparation of β -D-glucan nanoparticles and its antifungal activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 70:440-443, 2014.
- Belay A, Gholap AV: Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* 3:34-240, 2009.
- Belkaid A, Currie JC, Desgagnés J, Annabi B: The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. *Cancer Cell International* 6:7, 2006.
- Cano-Sarmiento C, Téllez-Medina DI, 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.
- Ciecierska A, Drywien EM, Hamulka J, Sadkowski T: Nutraceutical functions of beta-glucans in human nutrition. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 70:315-324, 2019.
- Clifford MN, Kerimi A, Williamson G: Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids (acyl-quinic acids) in humans. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19:1299-1352, 2020.
- De Vries JW, Camire ME, Cho S, Craig S, Gordon D, Jones JM, Li B, Lineback D, Prosky L, Tunland BC: The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* 46:112-129, 2001.
- Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT: Dietary fibre in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology* 49:255-266, 2012.
- Farah A, Monteiro M, Donangelo MC, Lafay S: Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *Journal of Nutrition* 138:2309-2315, 2013.
- Havrlentová M, Petrušáková Z, Burgárová A, Gago F, Hlinková A, Šturdík E: Cereal β -glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods- A Review. *Czech Journal of Food Sciences* 29:1-14, 2011.
- Higdon JV, Frei B: Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:101-123, 2006.

- Hunter RJ: *Zeta Potential in Colloid Science Principles and Applications*. Academic Press, London, San Diego, 1988.
- Jakobek Barron L: *Nastavni materijali iz kolegija Inženjerska kemija*. Osijek, 2020.
- Janeiro P, Brett AMO: Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, 518:109-115, 2004.
- Metikoš-Huković M, Martinez S: Praktikum iz elektrokemije (Interna skripta). Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2004.
- Navarra G, Moschetti M, Guarrasi V, Mangione R M, Militello V, Leone M: Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy. *Journal of Chemistry* 5:1-8, 2017.
- Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khane GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F, WenHua L, XiaoHui Z: Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 97:67-74, 2017.
- Othles S, Ozgos S: Health effects of dietary fiber. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria* 13:191-202, 2014.
- Petravić-Tominac V, Zechner-Krpan V, Grba S, Srećec S, Panjkota-Krbavčić I, Vidović I: Biological Effects of Yeast β -Glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 75:149-158, 2010.
- Piljac I: *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2010.
- Prakash S, Mishra R, Malviya R, Sharma KP: Measurement Techniques and Pharmaceutical Applications of Zeta Potential: A Review. *Journal of Chronotherapy and Drug Delivery* 5:33-40, 2014.
- Salopek B, Krašić D, Filipović S: Measurement and application of zeta-potential. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik* 4:147-151, 1992.
- Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B: *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*. Antioxidants, Emad Shalaby, IntechOpen, London, United Kingdom.
- Schmid FX: *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. Encyclopedia of Life Sciences Macmillian Publishers Ltd., Nature Publishing Group, Stuttgart, 2001.

- Thom E: The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. *The Journal of International Medical Research* 35:900-908, 2007.
- Tomac I: Karakterizacija klorogenskih kiselina i analiza antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama kave primjenom elektrokemijskih metoda. *Disertacija*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2016.
- Upadhyay TK, Fatima N, Sharma D, Saravanakumar V, Sharma R: Preparation and characterization of beta-glucan particles containing a payload of nanoembedded rifabutin for enhanced targeted delivery to macrophages. *EXCLI Journal* 16:210-228, 2017.
- Vermerris W, Nicholson R: *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Berlin, 2006.
- Vis RB, Lorenz K: β -Glucans: Importance in Brewing and Methods of Analysis. *LWT – Food Science and Technology* 30:331-336, 1996.
- WEB 1: https://bs.wikipedia.org/wiki/Zeta_potencijal (Prestupljeno 20.1.2021.)
- WEB 2: [33087005570_c6a25a1774_o.png \(764×319\) \(wp.com\)](https://www.wp.com/33087005570_c6a25a1774_o.png) (Pristupljeno 5.2.2021.)
- WEB 3: <https://libios.fr/en/analytical-solutions/food-constituents-enzymes/polysaccharides-oligosaccharides/-glucan-oats-high-viscosity> (Pristupljeno 17.6.2021.)
- Wu Z, Ming J, Gao R, Wang Y, Liang Q, Yu H, Zhao G: Characterization and Antioxidant Activity of the Complex of Tea Polyphenols and Oat β -Glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:10737-10746, 2011.