Adsorpcija polifenolnih spojeva iz jabuke na ß-glukanu

Krešić, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:109:928549

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Vedrana Krešić

ADSORPCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ JABUKE NA β-GLUKANU

Diplomski rad

Osijek, srpanj 2017.

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Inženjerska kemija
Tema rada je prihvaćena na X sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 08.07.2016. godine.
Mentor: izv.prof.dr.sc. *Lidija Jakobek Barron*
Pomoć pri izradi: *Petra Matić*, dipl.ing.

ADSORPCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ JABUKE NA β-GLUKANU

Vedrana Krešić, 288-DI

Sažetak: Zadatak ovog rada bio je ekstrahirati polifenole iz mesa i kore starih sorti jabuka, usporediti ih s obzirom na količinu ukupnih polifenola i antiradikalnu aktivnost te provesti adsorpciju na β-glukanu s polifenolima iz jabuka koje su najbogatije polifenolima. Ekstrahirani su polifenoli iz mesa i kore starih sorti jabuka (lještarka, ljubeničarka, slavonska srčika, adamova zvijezda i divlja jabuka), ukupna količina polifenola određena je pomoću spektrofotometrijske Folin-Ciocalteau metode, a antiradikalna aktivnost pomoću DPPH metode određivanjem EC_{50} (*efficient concentration*) i *ARP* vrijednosti (*anti-radical power*). Pokazalo se da kora jabuka sadrži više ukupnih polifenola i pokazuje veću antiradikalnu aktivnost u usporedbi s mesom (osim divlje jabuke koja je sadržavala više polifenola u mesu nego u kori). Dva kultivara jabuka pokazala su se bogatija polifenolima, divlja jabuka (meso) i slavonska srčika (kora). Antiradikalna aktivnost bila je najveća kod polifenola iz mesa divlje jabuke te kore adamove zvijezde. Adsorpcija je na β-glukanu provedena s polifenolima iz slavonske srčike i divlje jabuke (kora i meso) jer su ovi kultivari bili najbogatiji polifenolima. Rezultati su analizirani ravnotežnim adsorpcijskim modelima (Freundlich, Langmuir i Dubinin-Radushkevich). Interakcije između polifenola i β-glukana bile su favorizirane za sve polifenole, a veze su bile fizikalne. Maksimalni adsorpcijski kapacitet prema Langmuirovoj izotermi pokazali su polifenoli iz kore slavonske srčike.

Ključne riječi: jabuka, polifenoli, antiradikalna aktivnost, β-glukan, adsorpcija, adsorpcijske izoterme

Rad sadrži: 49stranica
19 slika
3 tablice
32 literaturne reference
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	izv. prof. dr. sc. *Ivica Strelec*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Lidija Jakobek Barron*	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. *Mirna Habuda-Stanić*	član
4.	doc. dr. sc. *Ines Banjari*	zamjena člana

Datum obrane:

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

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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Engineering chemistry
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. X held on July 8th, 2016.
Mentor: *Lidija Jakobek Barron*, PhD, Associate professor
Technical assistance: *Petra Matić,* BSc

THE ADSORPTION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM APPLES ONTO β-GLUCAN

Vedrana Krešić, 288-DI

Summary: The aim of this work was to extract polyphenols from peel and flesh of old apple varieties, to compare varieties considering their total polyphenol amount and antiradical activity, and to conduct an adsorption experiment onto β-glucan with polyphenols from apples the richest in polyphenols. Polyphenols were extracted from flesh and peel of five apple varieties (lještarka, ljubeničarka, slavonska srčika, adamova zvijezda and wild apple), their total amount was determined by using spectrophotometric Folin-Cicalocalteau method, and the antiradical activity by using DPPH method through calculating EC_{50} (efficient concentration) and *ARP* values (antiradical power). It was found that apple peel contained more polyphenols and higher antiradical activity than apple flesh (except the wild apple which contained more polyphenols in the flesh). Two apple varieties were shown to be rich in polyphenols, wild apple (flesh) and slavonska srčika (peel). The antiradical activity was the highest in wild apple flesh and adamova zvijezda peel. The adsorption onto β-glucan was carried out with polyphenols from slavonska srčika and wild apple (flesh and peel) since they were the richest in polyphenols. The results were analysed with equilibrium adsorption models (Freundlich, Langmuir and Dubinin-Radushkevich models). Interactions between polyphenols and β-glucan were favored and the binding was physical. Polyphenols from slavonska srčika peel showed the maximum adsorption capacity according to the Langmuir isotherm.

Key words: apple, polyphenols, antiradical activity, β-glucan, adsorption, adsorption isotherms

Thesis contains: 49pages
19 figures
3 tables
32references
Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Ivica Strelec*,PhD, associate professor — chair person
2. *Lidija Jakobek Barron*,PhD, associate professor — supervisor
3. *Mirna Habuda-Stanić*,PhD, associate professor — member
4. *Ines Banjari*,PhD, assistant professor — stand-in

Defense date:

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

Ovaj diplomski rad izrađen je na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Utjecaj prehrambenih vlakana na bioraspoloživost polifenola istraživanjem adsorpcije i simuliranih probavnih procesa, *in vitro*“, broj projekta: IP-2016-06-6777, voditelja izv.prof.dr.sc. Lidije Jakobek Barron.

Zahvaljujem se mentorici izv.prof.dr.sc. Lidiji Jakobek Barron, na predloženoj temi, stručnoj pomoći i savjetima tijekom same izrade.

Zahvaljujem se asistentici Petri Matić, dip.ing. na pomoći tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada gdje sam zahvaljujući njezinim savjetima naučila jako puno te još više zavoljela naš fakultet.

Sadržaj

1. UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 4

2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI ... 5

2.1.1. Fenolne kiseline ... 6

2.1.2. Flavonoidi ... 6

2.1.3. Polifenoli u jabukama ... 7

2.2. ANTIOKSIDACIJSKA (ANTIRADIKALNA) AKTIVNOST POLIFENOLA ... 8

2.2.1. DPPH metoda za određivanje antiradikalne aktivnosti polifenola ... 9

2.3. INTERAKCIJE POLIFENOLA SA MAKROMOLEKULAMA ... 9

2.3.1. Interakcije sa prehrambenim vlaknima ... 9

2.3.2. β-glukan ... 10

2.4. ADSORPCIJA ... 11

2.4.1. Adsorpcijske izoterme ... 12

2.4.2. Freundlichova izoterma ... 12

2.4.3. Langmuirova izoterma ... 13

2.4.4. Dubinin-Radushkevicheva izoterma ... 14

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 16

3.1. ZADATAK RADA ... 17

3.2. MATERIJALI I METODE ... 18

3.2.1. Kemikalije ... 18

3.2.2. Priprema ekstrakta ... 18

3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola spektroskopskom Folin-Ciocalteu metodom ... 18

3.2.4. Određivanje antiradikalne aktivnosti pomoću DPPH metode ... 19

3.2.5. Adsorpcija polifenola iz jabuka na β-glukanu ... 20

3.2.6. Statistička obrada podataka ... 20

4. REZULTATI ... 22

4.1. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA JABUKA MJERENI SA FOLIN-CIOCALTEU METODOM ... 23

4.2. ANTIRADIKALNA AKTIVNOST POLIFENOLA IZ JABUKE ... 24

4.3. ADSORPCIJSKE IZOTERME ZA ADSORPCIJU POLIFENOLA IZ JABUKA NA Β-GLUKANU ... 35

5. RASPRAVA ... 40

6. ZAKLJUČCI ... 44

7. LITERATURA ... 46

Popis oznaka, kratica i simbola

K_F	konstanta relativnog adsorpcijskog kapaciteta (mg g^{-1}) (mg l^{-1})$^{-1/n}$
1/n	konstanta intenziteta adsorpcije
K_L	konstanta slobodne energije adsorpcije ili konstanta afiniteta (l mg^{-1})
q_m	maksimalni teorijski adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})
c_e	ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini (mg l^{-1})
q_e	ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),
ε	Polany potencijal (J mol^{-1})
β	konstanta povezana s adsorpcijskim kapacitetom (mol^2J^{-2})
E	srednja slobodna energija adsorpcije (J mol^{-1})
R^2	koeficijent determinacije
DPPH$^\bullet$	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
R$^\bullet$	Radikal
AH	Antioksidans
ARP	Učinkovitost antioksidansa (engl. *Anti-radical Power*)
EC_{50}	Učinkovita koncentracija (engl. *Efficient Concentration*)

1. UVOD

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji se nalaze u voću, povrću i njihovim proizvodima. Oni se danas intenzivno istražuju jer su pokazali brojna pozitivna svojstva u ljudskom organizmu kao što su antioksidativno djelovanje, smanjenje rizika od pojave karcinoma, dijabetesa, astme i drugih respiratornih bolesti, starenja i drugih (Pandey i Rizvi, 2009; Ramassamy, 2006). Jabuke predstavljaju važan izvor polifenola jer su dostupne tijekom cijele godine. Pokazalo se da su stare sorte jabuka bogatije polifenolima od današnjih komercijalnih, pa je važno očuvati ih zbog bioraznolikosti (Jakobek i sur., 2013). Polifenoli iz starih sorti jabuka pokazali su i antiradikalnu aktivnost (Iacopini i sur., 2010).

Jedna od bioaktivnosti polifenola koja nije u potpunosti istražena je njihova interakcija sa nutrijentima hrane. Pokazalo se da polifenoli mogu dolaziti u interakcije s ugljikohidratima, proteinima i lipidima u probavnom traktu (Jakobek, 2015). Oni se mogu "vezati" za neke od nutrijenata iz hrane koji ih prenose kroz organizam te u svojoj neizmijenjenoj formi imaju mogućnost pokazati potencijalno pozitivna svojstva. Prehrambena vlakna su ugljikohidrati koji su djelomično otporni na probavu i apsorpciju u tankom crijevu, s djelomičnom ili potpunom fermentacijom u debelom crijevu (Quiros-Sauceda i sur., 2014). Budući da se razgrađuju tek u debelom crijevu, prehrambena vlakna se mogu smatrati potencijalnim nosiocima polifenola kroz ljudski organizam ukoliko ulaze u interakcije s polifenolima. U grupu prehrambenih vlakana ulazi i β-glukan koji se može naći u gljivama, pekarskom kvascu, zobi, ječmu i algama (Laroche i sur., 2007).

Interakcije između polifenola i prehrambenih vlakana se mogu pratiti preko procesa adsorpcije u kojima je polifenol adsorbat, a β-glukan adsorbens. Tijekom adsorpcije, molekule iz otopine (adsorbat) adsorbiraju se na površinu adsorbensa (Soto i sur., 2011). Nakon uspostavljanja adsorpcijske ravnoteže mogu se odrediti adsorpcijske izoterme kao što su Freundlichova, Langmuirova, Dubinin-Radushkevicheva i druge (Foo i sur., 2010; Soto i sur., 2011). Preko parametara adsorpcijskih izotermi mogu se dobiti informacije o samom procesu adsorpcije: radi li se favoriziranoj, fizikalnoj ili kemijskoj, monoslojnoj ili višeslojnoj adsorpcijii drugo (Foo i sur., 2010; Soto i sur., 2011).

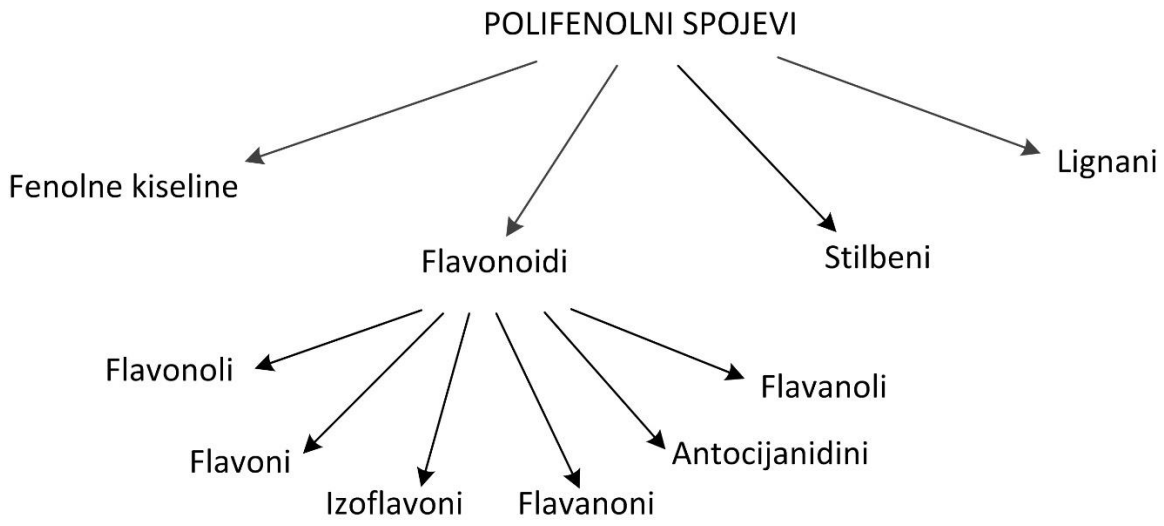
U ovom radu cilj je bio ekstrahirati polifenole iz kore i mesa starih kultivara jabuka (lještarka, ljubeničarka, slavonska srčika, adamova zvijezda i divlja jabuka), odrediti količinu ukupnih polifenola u kori i mesu spektrotomometrijskom Folin-Ciocalteau metodom, antiradikalnu aktivnost DPPH metodom, usporediti ove kultivare te odrediti koji su kultivari najbogatiji

polifenolima. Osim toga, cilj je bio provesti adsorpciju na β-glukanu s polifenolima iz mesa i kore jabuka koje su najbogatije polifenolima da bi se objasnile interakcije između polifenola jabuke i β-glukana. Pri tome je cilj bio odrediti parametre Freundlichove, Langmuirove i Dubinin-Raduschkevicheve adsorpcijske izoterme pomoću linearnog modela.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji se mogu naći u voću, povrću i njihovim proizvodima. Polifenolni spojevi pripadaju najbrojnijoj i najrasprostranjenijoj skupini spojeva u biljkama. Do danas je poznato više od 8000 spojeva. Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na: fenolne kiseline, flavonoide, tanine (kondenzirani i hidrolizirani) te ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini), a podjela je prikazana na **slici 1** (Bravo, 1998; Manach i sur., 2004; Pandey i Rizvi, 2009). Osnovna karakteristika svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova(Berend i Grabarić, 2008).



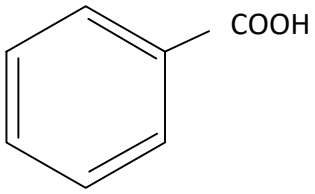
Slika 1 Podjela polifenolnih spojeva na temelju njihove kemijske strukture (pripremljeno prema Manach i sur., 2004; Ramassamy, 2006)

Polifenolni spojevi pokazali su mnoge pozitivne bioaktivnosti, kao što su antioksidativno djelovanje,smanjenje rizika od pojave karcinoma, dijabetesa, starenja, astme i drugo (Pandey i Rizvi, 2009; Ramassamy, 2006).

Polifenoli u biljkama mogu imati više uloga.Mogu biti signalne molekule, sudjelovati u hormonskoj regulaciji rasta biljaka te ih štititi od mikroorganizama(antimikrobno djelovanje).Također, mogu zaštititi biljku od UV zračenja te privlačiti oprašivače. U namirnicama mogu pridonositi gorčini, oštrini, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Berend i Grabarić, 2008).

2.1.1. Fenolne kiseline

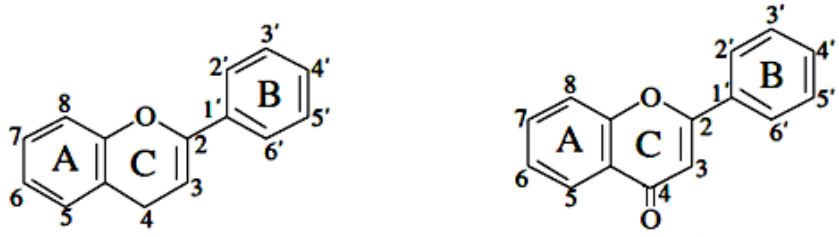
Fenolne kiseline se mogu podijeliti na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Manach, 2004). To su polifenolne komponente male molekularne mase. Osnovna struktura fenolnih kiselina prikazana je na **slici 2**(Bravo, 1998).



Slika 2 Osnovna struktura fenolnih kiselina (Bravo, 1998)

2.1.2. Flavonoidi

Struktura flavonoida temelji se na flavonoidnoj jezgri. Samu strukturu flavonoida čine dva aromatska prstena A i B te oksigenirani heterociklički prsten C. U prirodi se flavonoidi nalaze najčešće u obliku glikozida, tj. povezani su s molekulama šećera, što doprinosi većoj raznolikosti i broju tih spojeva (Bravo, 1998; Jakobek, 2007). Na **slici 3** prikazana je osnovna struktura flavonoida.



Slika 3 Osnovna struktura flavonoida. a) flavan jezgra flavonoida; b) 4 okso flavonoid jezgra (pripremljeno prema Bravo, 1998; Jakobek, 2007)

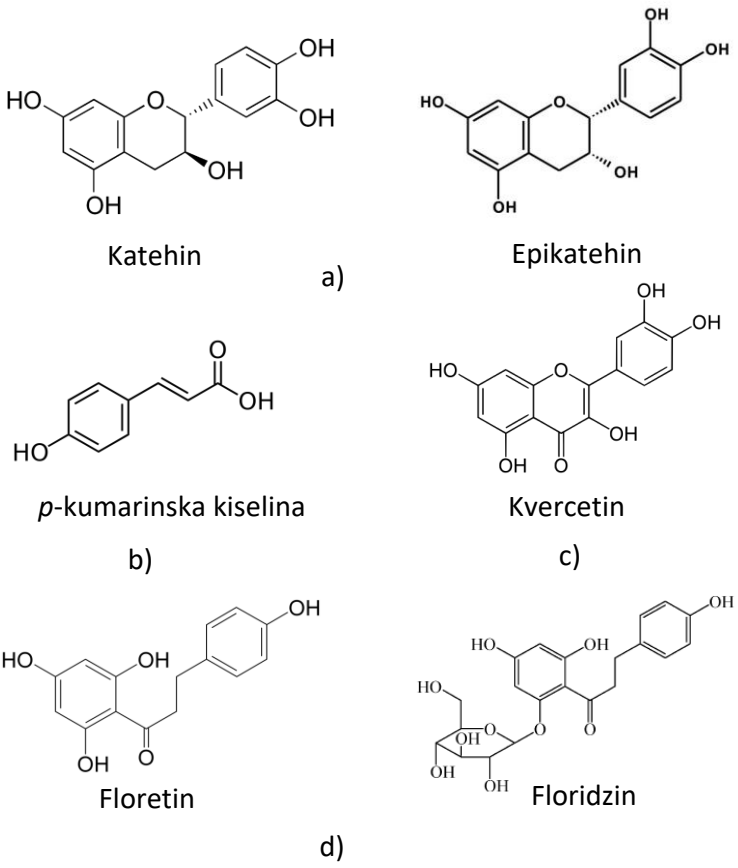
U skupinu flavonoida ubrajaju se flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini te flavanoli (Bravo, 1998). Flavonoli su najviše zastupljeni od svih flavonoida u hrani. Izoflavonoidi su flavonoidi čija je struktura slična strukturi estrogena. Iako nisu steroidi, na 7 i 4' poziciji imaju hidroksilne skupine što ih čini fitoestrogenima (Manach i sur., 2004). Antocijanini su biljni pigmenti topljivi u vodi. Daju plavu, purpurnu i crvenu boju cvijeću, voću i povrću.

Najčešći šećeri koji se vežu na molekulu antocijanidina su glukoza, ramnoza, galaktoza i drugi (Jakobek, 2007).

2.1.3. Polifenoli u jabukama

Jabuke su voće koje je poznato od davnina, a dostupne su tijekom cijele godine. Postoje mnoge sorte jabuka s različitim senzorskim i organoleptičkim svojstvima.

Polifenolne skupine koje su pronađene u jabukama su: proantocijanidini, flavanoli, fenolne kiseline, dihidrokalkoni i antocijanini. Najveći udio polifenola u mesu i kori zauzimaju proantocijanidini. U mesu jabuka pronađeno je da su najviše zastupljenefenolne kiseline, dok su u kori jabuka najviše zastupljeni flavonoli i dihidrokalkoni.Budući da su jabuke dostupne tijekom cijele godinei imaju pozitivne učinke na zdravlje,one se sve više istražuju (Jakobek i sur., 2013; Jakobek i Barron, 2016). Na **slici 4** prikazani su polifenoli koji se nalaze u jabukama.



Slika 4 Struktura nekih polifenola u jabukama. a) flavanoli; b) fenolna kiselina; c) flavonol; d) dihidrokalkoni (pripremljeno prema Manach i sur., 2004; Shao i sur., 2008)

2.2. ANTIOKSIDACIJSKA (ANTIRADIKALNA) AKTIVNOST POLIFENOLA

Polifenoli posjeduju mnoga potencijalno pozitivnasvojstva poput antibakterijskog, antialergijskog, antimutagenog, protuupalnog te antikancerogenog djelovanja. Antiradikalna tj. antioksidacijska aktivnost proizlazi iz sposobnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala. Također, polifenoli pokazuju sposobnost kelatnog vezanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004).

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala kojibi inače uzrokovali oksidaciju pojedinih spojeva.Oni inhibiraju ili odgađaju oksidaciju supstrata kada su prisutni u koncentraciji manjoj od njega, neutraliziraju slobodne radikale tako što im daju svoj elektron. Antioksidansi djeluju kao reducirajuće sredstvo. Imaju sposobnost stabilizirati ili deaktivirati slobodne radikale tako što doniraju elektron, a zbog svoje stabilnosti ne mogu postati slobodni radikali. Da bi bili prepoznati kao antioksidansi, polifenolni spojevi moraju ispunjavati sljedeća dva uvjeta:

- Antioksidans (polifenol) treba biti prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, ali u dovoljnoj da bitno uspori ili spriječi reakcijuoksidacije.
- Nastali radikal iz polifenola mora biti dovoljno stabilan da ne potakne lančanu reakciju.

Slobodni radikali sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u elektronskim orbitalama ito ih čini vrlo reaktivnima. Slobodni radikali mogu nastati u reakcijama oksidacije.Oni i druge reaktivne vrste kisika ubrajaju superoksidni(O_2^-), hidroksilni radikal (OH^-), hidroperoksidni radikal (HO_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2) i lipidni peroksidni radikal(Kazazić, 2004).

Oksidativni stres može nastati ako izostane antioksidacijska zaštita protiv slobodnih radikala. Slobodni radikali, reaktivne vrste kisika te oksidativni stres zajedno uz neke druge faktore, sudjeluju u razvoju mnogih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes te različiti upalni procesi. Polifenoli i drugi antioksidansi posjeduju mogućnost da hvatanjem slobodnih radikala te drugim antioksidacijskim aktivnostima, smanjuju rizik od nastajanja već spomenutih bolesti (Kazazić, 2004).

2.2.1. DPPH metoda za određivanje antiradikalne aktivnosti polifenola

Hvatanje radikala je važan mehanizam kojeg slijede mnogi antioksidansi u hrani. Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti često se koriste metode koje se temelje na hvatanju sintetičkih radikala u polarnim organskim otapalima na sobnoj temperaturi. Jedna od tih metoda je DPPH metoda u kojoj se koristi slobodni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•). Redukcija ovog radikala se prati spektrofotometrijski. U formi radikala DPPH• je tamno obojen, a apsorbira na 515 nm. Za vrijeme reakcije s antioksidansom (AH) apsorpcija se smanjuje zbog smanjenja koncentracije DPPH• (Jakobek, 2007). Reakcija hvatanja slobodnih DPPH• radikala je sljedeća (Brand-Williams i sur., 1995):

$$DDPH^{\cdot} + AH \longrightarrow DPPH - H + A^{\cdot}$$

$$DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow DPPH - R$$

Antiradikalna aktivnost se definira kao količina antioksidansa koja je potrebna za smanjenje početne koncentracije DPPH• radikala za 50%. Ta vrijednost se zove učinkovita koncentracija EC_{50} (engl. *Efficient Concentration*). Zbog boljeg razumijevanja se govori o efikasnosti antioksidansa (engl. *Antiradical Power - ARP*) koja iznosi $1/EC_{50}$. (Brand-Williams i sur., 1995).

2.3. INTERAKCIJE POLIFENOLA S MAKROMOLEKULAMA

Polifenoli su pokazali mnoge potencijalno pozitivne bioaktivnosti u koje ulaze i interakcije polifenola s makromolekulama kao što su proteini, ugljikohidrati i lipidi (Jakobek, 2015; Le Bourvellec i Renard, 2012). Bioaktivnost polifenola nije u potpunosti istražena.

2.3.1. Interakcije s prehrambenim vlaknima

Prehrambena vlakna definiraju se kao ugljikohidrati koji su djelomično otporni na probavu i apsorpciju u tankom crijevu, s djelomičnom ili potpunom fermentacijom u debelom crijevu. Prehrambena vlakna se mogu podijeliti s obzirom na njihovu topljivost na:

- topljiva i
- netopljiva.

U netopljiva vlakna ubrajaju se: celuloza, hemiceluloza, hitin, a u topljiva β-glukani, inulin, pektini i oligosaharidi(Quiros-Sauceda i sur., 2014).

Pokazalo se da prehrambena vlakna mogu ulaziti u interakcije s polifenolima (Jakobek, 2015), a ove interakcije mogu utjecati na bioaktivnost polifenola, funkcionalnu i senzorsku kvalitetu hrane pa se provode istraživanja ovih interakcija (Gao i sur., 2012; Wu i sur., 2011).

Također, pokazalo se da veze između prehrambenih vlakana i polifenola mogu biti:

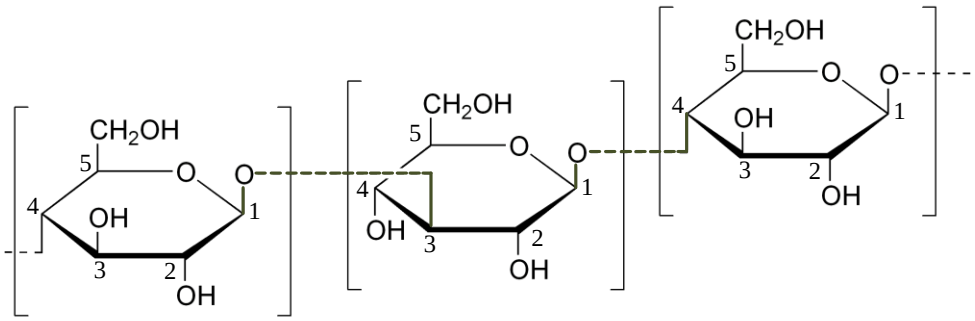
- nekovalentne veze (vodikove veze - između OH skupine polifenola i kisikovog atoma vlakana; elektrostatske interakcije), te
- kovalentna veza (između fenolnih kiselina i vlakana) (Bordenave i sur., 2014; Quiros-Sauceda i sur., 2014).

  Najčešće su nekovalentne veze.

2.3.2. β-glukan

β-glukan je prirodno vlakno, polisaharid sastavljen od jedinica glukoze. Može se naći u gljivama, pekarskom kvascu, zobi, ječmu i algama (Laroche i sur., 2007). Pokazao je potencijalno pozitivna svojstva kao što su antioksidacijska aktivnost, smanjenje upalnog odgovora organizma preko stimulacije imunološkog odgovora, sniženje razine kolesterola, pozitivan utjecaj na respiratorne bolesti i druge (Chen i Raymond, 2008; Kofuji i sur., 2012; Queenan i sur., 2007).

Struktura β-glukana iz kvasca je β-(1,3)-(1,6)-D-glukan, a iz žitarica β-(1,3)-(1,4)-D-glukan. Kemijska struktura β-glukana iz žitarica prikazana je na **slici 5** (Laroche i Michaud, 2007).



Slika 5 Kemijska struktura β-(1,3)-(1,4)-D-glukana (pripremljeno prema Laroche i Michaud, 2007)

β-glukan je pokazao da može ulaziti u interakcije s polifenolima (Simonsen i sur., 2009) Interakcije polifenola i β-glukana mogu biti interpretirane kroz proces adsorpcije, pri čemu su polifenoli adsorbat, a β-glukan je adsorbens.

2.4. ADSORPCIJA

Tijekom procesa adsorpcije, molekule iz otopine adsorbiraju se na površinu adsorbensa (β-glukan) (Soto i sur., 2011). Proces adsorpcije se može definirati kroz četiri koraka:

1. transport adsorbata iz otopine,
2. difuzija adsorbata preko tekućeg filma koji okružuje česticu adsorbensa,
3. unutarčestična difuzija i
4. adsorpcija i desorpcija adsorbata s površine adsorbensa (Plazinski i sur., 2009).

Adsorpcija se može podijeliti s obzirom na privlačne sile koje se stvaraju između adsorbirane čestice na:

- FIZIKALNU ADSORPCIJU (Van der Waalsove sile, vodikove veze),
- KEMIJSKU ADSORPCIJU(kovalentna veza) i
- IONSKU ADSORPCIJU (ionska veza) (Brdička, 1969).

Na sam proces adsorpcije mogu utjecati različiti uvjeti kao što su:

- svojstva adsorbata,
- svojstva adsorbensa i
- pH, temperatura otopine u kojoj je odvija adsorpcija i sl. (Marsal i sur., 2012; Soto i sur., 2011; Wu i sur., 2011).

Adsorpcijski kapacitet adsorbata na adsorbensu se može izračunati pomoću **formule 1**:

$$q_e = \frac{(c_o - c_e) \cdot V_m}{c_a \cdot V_a} \quad \textbf{(1)}$$

gdje je: q_e– ravnotežni adsorpcijski kapacitet adsorbata na adsorbensu (mg g^{-1}),

c_o– početna koncentracija adsorbata u otopini (mg l^{-1}),

c_e – ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini (mg l^{-1}),

V_m – volumen otopine u kojoj se odvija adsorpcija (l),

c_a – koncentracija adsorbensa u otopini (g l^{-1}) i

V_a – volumen adsorbensa u otopini (l).

U stanju ravnoteže mogu se odrediti adsorpcijske izoterme preko kojih se može doći do informacija o samom procesu adsorpcije.

2.4.1. Adsorpcijske izoterme

Adsorpcijska izoterma predstavlja odnos između adsorbirane količine adsorbata koji je adsorbirao na adsorbensu i koncentracije adsobrata koja preostaje u otopini (neadsorbirana koncentracija) pri konstantnoj temperaturi. Korištenjem različitih modela kao što su Freundlichov, Langmirov, Dubinin-Radushkevichev i drugi može se preko konstanti ovih modela doći do informacija o samom procesu adsorpcije (Foo i Hameed, 2010; Limousin i sur., 2007; Soto i sur., 2011).

2.4.2. Freundlichova izoterma

Freundlichova adsorpcijska izoterma opisuje neidealnu, reveznu adsorpciju na heterogenu površinu koja nije ograničena na stvaranje monosloja. Ona pretpostavlja da svako mjesto na površini adsorbensa ima svoju energiju pa se mjesta s većom energijom prije popune (Foo and Hameed, 2010; Soto et al., 2011).

Nelinearni oblik Freundlichove jednadžbe dan je **formulom 2**, dok je linearni oblik ove jednadžbe dan **formulom 3**.

$$q_e = K_F c_e^{1/n} \quad \textbf{(2)}$$

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log c_e \quad \textbf{(3)}$$

gdje je: q_e– ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),

K_F – konstanta relativnog adsorpcijskog kapaciteta (mg g^{-1}) (mg l^{-1})$^{-1/n}$,

c_e – ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini (mg l^{-1}) i

1/n- konstanta intenziteta adsorpcije (Babaeivelni et al, 2013; Foo and Hameed, 2010;Marsal et al., 2012; Soto et al., 2011).

Dijagram ovisnosti (log q_e) o (log c_e) daje nagib pravca 1/*n*i odsječak na y osi log K_F.

2.4.3. Langmuirova izoterma

Langmuirov model predviđa adsorpciju u jednom sloju na homogenoj površini, a adsorpcija se može odvijati na ograničenim mjestima. Nakon što se molekule adsorbiraju na površinu adsorbensa, ona predviđa da nema daljnjih adsorpcije (Foo and Hameed, 2010; Soto et al., 2011).

Nelinearni oblik Langmuirove jednadžbe dan je **formulom 4**, dok je linearni oblik ove jednadžbe dan **formulom 5**.

$$q_e = \frac{q_m K_L c_e}{1 + K_L c_e} \quad \textbf{(4)}$$

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_m} + \frac{c_e}{q_m} \quad \textbf{(5)}$$

gdje je: q_e– ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),

K_L–konstanta slobodne energije adsorpcije ili konstanta afiniteta (l mg^{-1})

c_e – ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini (mg l^{-1}) i

q_m– maksimalni teorijski adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})(Babaeivelni et al, 2013; Foo and Hameed, 2010;Marsal et al., 2012; Soto et al., 2011).

Dijagram ovisnosti c_e/q_e *vs* c_e daje pravac s nagibom pravca $1/g_m$ i odsječkom na y osi $1/K_L q_m$.

2.4.4. Dubinin-Radushkevicheva izoterma

Dubinin-Radushkevicheva izoterma se koristi za razlikovanje kemijske od fizikalne adsorpcije (Foo and Hameed, 2010; Soto et al., 2011).

Nelinearni oblik Dubinin-Radushkevicheve jednadžbe dan je **formulom 6**, dok je linearni dan **formulom 7**.

$$q_e = q_m e^{(-\beta\varepsilon^2)} \quad \textbf{(6)}$$

$$\ln q_e = \ln q_m - \beta\varepsilon^2 \quad \textbf{(7)}$$

gdje je: q_e– ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),

q_m – maksimalni teorijski adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),

β – konstanta povezana s adsorpcijskim kapacitetom (mol^2J^{-2}),

ε – Polany potencijal (J mol^{-1}).

Polany potencijal se može izračunati s **formulom 8**:

$$\varepsilon = RTln\left(1 + \frac{1}{c_e}\right) \quad \textbf{(8)}$$

gdje je: ε – Polany potencijal (J mol^{-1}).

c_e – ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini (mg l^{-1}),

T – temperatura (K) i

R – opća plinska konstanta (8,314 J mol^{-1} K^{-1}).

S Dubinin-Radushkevichevom izotermom se može odrediti srednja slobodna energija *E* preko koje se može doći do zaključka da li je adsorpcija kemijska ili fizikalna. Ukoliko *E* iznosi manje od 8 kJ mol^{-1}, tada je adsorpcija fizikalna, a ukoliko je *E* veća od 8 kJ/mol adsorpcija je kemijski proces (Marsal i sur., 2012).

Srednja slobodna energija adsorpcije se može odrediti preko **formule 9**:

$$E = \frac{1}{\sqrt{2\beta}} \quad \textbf{(9)}$$

gdje je: E – srednja slobodna energija adsorpcije (J mol^{-1}) i

β – konstanta povezana s adsorpcijskim kapacitetom (mol^2J^{-2}) (Babaeivelni et al, 2013; Foo and Hameed, 2010;Marsal et al., 2012; Soto et al., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak rada bio je

-ekstrahirati polifenole iz kore i iz mesa pet različitih vrsta jabuka

-lještarka,

-ljubeničarka,

-slavonska srčika,

-adamova zvijezda i

-divlja jabuka

-odrediti koncentraciju ukupnih polifenola u mesu i kori ovih jabuka pomoću spektrofotometrijske Folin-Ciocalteau metode,

-odrediti antiradikalnu aktivnost različitih skupina polifenola u kori i mesu ovih jabuka upotrebom DPPH metode. Antiradikalna aktivnost izražena je preko učinkovite koncentracije (EC_{50} vrijednosti) i efikasnosti antioksidansa (*ARP* vrijednost),

-usporediti kultivare jabuka s obzirom na količinu polifenola

-provesti adsorpciju polifenola iz mesa i kore jabuka koje sadrže najveće količine polifenola na β-glukanu. Za istraživanje adsorpcije korišteni su modeli:

-Freundlichove

- Langmuirove

-Dubinin-Raduschkevicheve adsorpcijske izoterme

- odrediti konstante ovih izotermi kako bi se omogućio uvid u mehanizam adsorpcije.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Kemikalije

Kemikalije koje su upotrijebljene u ovom diplomskom radu su:

- metanol,
- klorovodična kiselina,
- natrijev karbonat (200 g l^{-1}),
- Folin-Ciocalteau reagens,
- DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikal) (1 mmol l^{-1}),
- β-glukan (190 mg l^{-1}),
- galna kiselina (1000 mg l^{-1}),
- fosfatni pufer (0,13 M; pH 5,5).

3.2.2. Priprema ekstrakta

Uzorci kore i mesa jabuka dobiveni su guljenjem kore te rezanjem mesa jabuke na manje komade (~ 1 kg). Uzorci kore homogenizirani su pomoću miksera za kavu, a uzorci mesa jabuke pomoću štapnog miksera. Za pripremu ekstrakta mesa odvagano je ~ 0,2 g jabuka te je dodano 1,5 mL 80%-tnog metanola. Uzorci su ostavljeni 15 min na ultrazvučnoj kupelji, centrifugirani na 10 000 rpm 10 minuta, nakon čega je ekstrakt dekantiran. Ostatak je ponovo ekstrahiran pomoću 0,5 mL 80%-tnog metanola na ultrazvučnoj kupelj 15 minuta i centrifugiran na 10 000 rpm 10 minuta. Dva ekstrakta su spojena. Ukupno je dobiveno 2 ml ekstrakta. Za pripremu ekstrakta kore postupak je bio isti, osim što je korišten 0,1 % HCl u metanolu umjesto 80 % -tnog metanola. Za svaki kultivar jabuka ekstrakti su pripremljeni u dvije paralele.

3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola spektroskopskom Folin Ciocalteu metodom

Ukupni polifenoli u mesu i kori jabuka određeni su Folin-Ciocalteu metodom (Singleton i sur., 1999). Pripremljenom ekstraktu kore i mesa jabuka (20 µL) dodana je destilirana voda (1580 µL) i Folin-Ciocalteau reagens (100 µL). Zatim je u otopinu dodano 300 µL natrijevog karbonata (200 g l^{-1}). Uzorci su promiješani na vortexu (Grant Bio, Cambridgeshire, England) te su

stavljeni u vodenu kupelj na 40°C u trajanju od 30 min. Apsorbancija (*A*) je mjerena na 765 nm prema slijepoj probi (umjesto ekstrakta sadrži destiliranu vodu) na spektrofotometru (UV 2005, Selecta, Španjolska). Rezultati su izraženi u mg galne kiseline po l (mg l^{-1}) te su preračunati u mg galne kiseline po kg svježe mase jabuka (mg kg^{-1} FW, fresh weight). Mjerenja su u svakom uzorku izvršena dva puta.

3.2.4. Određivanje antiradikalne aktivnosti pomoću DPPH metode

Antiradikalna aktivnost je određena pomoću DPPH metode. U kivetu je dodano 200 µL DPPH (1 mmol l^{-1}) i 2800 µL metanola. Apsorbancija DPPH otopine (A_{DPPH}) je očitana na 517 nm prema destiliranoj vodi na spektrofotometru (UV 2005, Selecta, Španjolska). Pripremljeno je tri reakcijske otopine za svaki ekstrakt jabuke na sljedeći način: dodan je ekstrakt polifenola (meso: 50, 100 ili 300 µL, osim ekstrakta mesa divlje jabuke za koje su volumeni bili 10, 50 i 100 µL; kora: 10, 50 i 100 µL osim ekstrakta kore divlje jabuke za koju su volumeni bili 5, 100 i 300 µL), 200 µL DPPH (1 mmol l^{-1}), a ostatak volumena do 3000 µL činio je metanol. Apsorbancija reakcijskih otopina ($A_{ekstrakt}$) očitavana je na 517 nm prema slijepoj probi (20 µL ekstrakta mesa ili kore jabuka te od 2980 µL metanola) u različitim vremenskim intervalima u ukupnom vremenu od 90 minuta. Cilj je bio postići „steady state“ stanje.

Izračunat je % preostalog DPPH radikala za svako mjerenje prema formuli **10**:

$$\%\, preostalog\ DPPH\ = \frac{A_{ekstrakt}}{A_{DPPH}/100} \qquad \textbf{(10)}$$

U ovisnost je stavljen % preostalog DPPH radikala u „steady state“ stanju *vs* koncentracija jabuke u reakcijskoj otopini (g jabuke po g DPPH radikala). Iz ovog dijagrama očitana je EC_{50}vrijednost (g jabuke po g DPPH radikala potrebni za inhibiranje 50% DPPH radikala). Izračunata je i *ARP* vrijednost (antiradical power) prema formuli **11:**

$$ARP\ = 1/EC_{50} \qquad \textbf{(11)}$$

Veća *EC50* vrijednost predstavlja slabiju antiradikalnu aktivnost, dok veća *ARP* vrijednost predstavlja veću antiradikalnu aktivnost te je pomoću ARP vrijednosti lakše interpretirati rezultate.

3.2.5. Adsorpcija polifenola iz jabuka na β-glukanu

Stock otopina β-glukana pripremljena je u koncentraciji od 190 mg l^{-1} u destiliranoj vodi te je zagrijavana 15 min na 80 °C. Otopina je čuvana u hladnjaku na +4 °C.

Adsorpcija polifenola na β-glukanu provedena je kroz 16 h na 25 °C. Reakcijska otopina sastojala se od ekstrakta jabuka (100, 200, 500 i 700 µL), β-glukana (53 µL) te fosfatnog pufera (pH 5,5) do ukupnog volumena od 2 mL. Otopine su ostavljene na tresilici (IKA KS 130, Staufen, Germany) 16 h radi postizanja ravnoteže. Nakon adsorpcije, neadsorbirani polifenoli odvojeni su od adsorbiranih pomoću celulozno nitratnih filtera (Whatman, 0,1 µm, Njemačka) na uređaju za vakuum filtraciju (Sartorius, Goettingen, Njemačka). Količina neadsorbiranih polifenola (c_e) određena je pomoću Folin-Ciocalteau metode i izražena je u mg l^{-1} galne kiseline.Izračunat je adsorpcijski kapacitet q_e koji predstavlja mg adsorbiranih polifenola po g β-glukana (mg g^{-1}) pomoću formule 1.

Podaci za c_e i q_e upotrijebljeni su za prikazivanje adsorpcijskih izotermi u linearnom obliku:

-Freundlichova prema formuli 3 (log *qe* vs log *ce*; određeni su nagib pravca *1/n* te odsječak na osi y log K_F)

-Langmuirova prema formuli 5 (c_e/q_e vs c_e; određeni su nagib pravca $1/q_m$ te odsječak na osi y log $1/K_L q_m$)

-Dubinin-Raduskevicheva prema formuli 7 (ln *qe* vs ε^2;određeni su nagib pravca -β te odsječak na osi y ln q_m).

3.2.6. Statistička obrada podataka

Za obradu dobivenih podataka korišten je kompjutorski program MS Excel (Microsoft Corporation, SAD). Za svaki uzorak kore i mesa jabuke, ukupni polifenoli su određeni u dvije paralele koja je svaka mjerena dva puta (n=4). Nakon adsorpcije, koncentracija ukupnih polifenola mjerena je dva puta (n=2). Određena je standardna devijacija (**formula 12**), relativna standardna devijacija (**formula 13**) te koeficijent varijacije (**formula 14**).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n-1}} \qquad \textbf{(12)}$$

gdje je: *SD* – standardna devijacija,

n –broj ponavljanja,

x_i – rezultat pojedinačnog mjerenja i

$\overline{x}$–srednja vrijednost rezultata mjerenja.

Relativna standardna devijacija:

$$\mathrm{RSD} = \left(\frac{SD}{\bar{x}} \right) 10^{z} \; \mathrm{z} = 2, \mathrm{RSO}\,(\%) \qquad \textbf{(13)}$$

gdje je: *RSD* – relativno standardno odstupanje (%),

SD – standardna devijacija i

$\overline{x}$ – srednja vrijednost rezultata mjerenja.

Koeficijent varijacije:

$$KV = \frac{SD}{X} \times 100 \qquad \textbf{(14)}$$

gdje je: *KV* - koeficijent varijacije (%),

SD– standardna devijacija rezultata mjerenja i

x – srednja vrijednost mjerenja.

U svakom uzorku antiradikalna aktivnost mjerena je je jedan put u tri različite koncentracije. Regresijska analiza upotrijebljena je kod adsorpcijskih izotermi pri dobivanju jednadžbe pravca te određivanju nagiba pravca i odsječka na y osi. Određen je i pripadajući koeficijent determinacije r^2.

4. REZULTATI

4.1. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA JABUKA MJERENI FOLIN-CIOCALTEAU METODOM

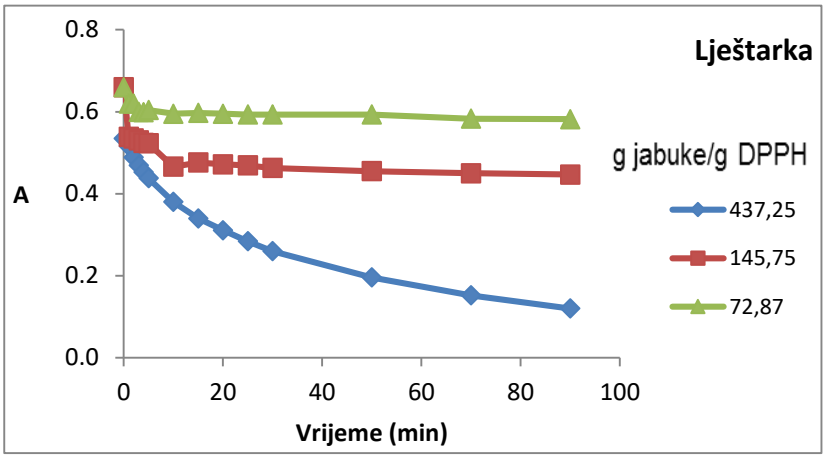
Tablica 1 Ukupni polifenoli* u ekstraktima kore i mesa jabuka mjereni Folin-Ciocateau metodom.

	Kultivar jabuke	Koncentracija (mg l^{-1})	Količina (udio) polifenola (mg kg^{-1} FW)	Standardna devijacija (mg kg^{-1})	Relativna standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Meso	Lještarka	39,05	314,25	64,72	0,21	20,59
	Ljubeničarka	80,27	754,01	183,79	0,24	24,38
	Slavonska srčika	74,31	662,11	13,95	0,02	2,11
	Adamova zvijezda	50,85	464,24	162,97	0,35	35,10
	Divlja jabuka	444,16	3959,29	328,34	0,08	8,29
Kora	Lještarka	378,92	3594,99	304,04	0,08	8,46
	Ljubeničarka	497,00	4594,21	1248,09	0,27	27,17
	Slavonska srčika	740,31	6531,78	960,60	0,15	14,71
	Adamova zvijezda	488,73	4713,19	508,42	0,11	10,79
	Divlja jabuka	394,88	3737,49	371,15	0,10	9,93

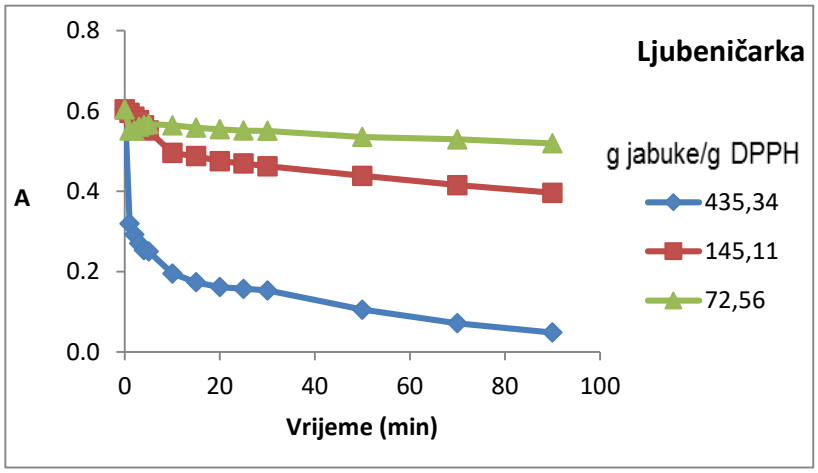
*koncentracija polifenola izražena kao ekvivalent galne kiseline (n=4)

FW – engl. fresh weight (svježe mase)

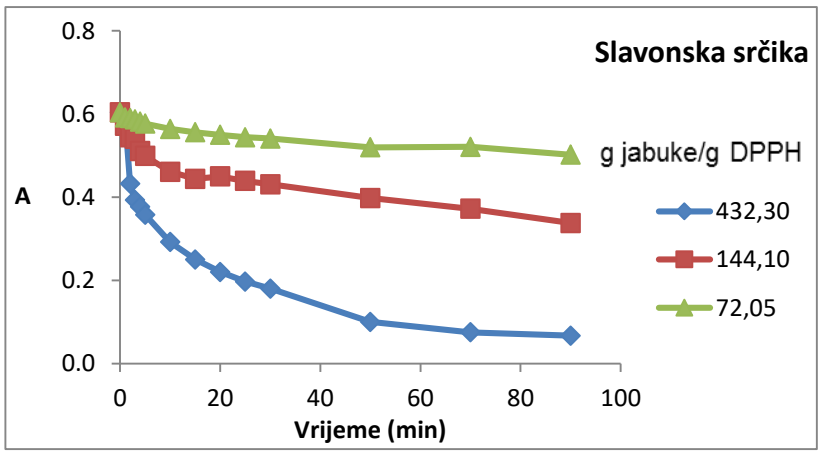
4.2. ANTIRADIKALNA AKTIVNOST POLIFENOLA JABUKE



a)

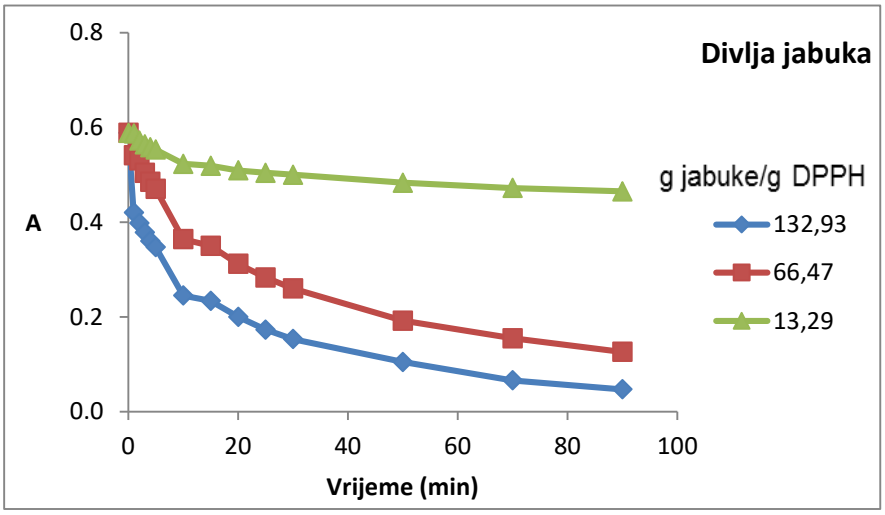


b)

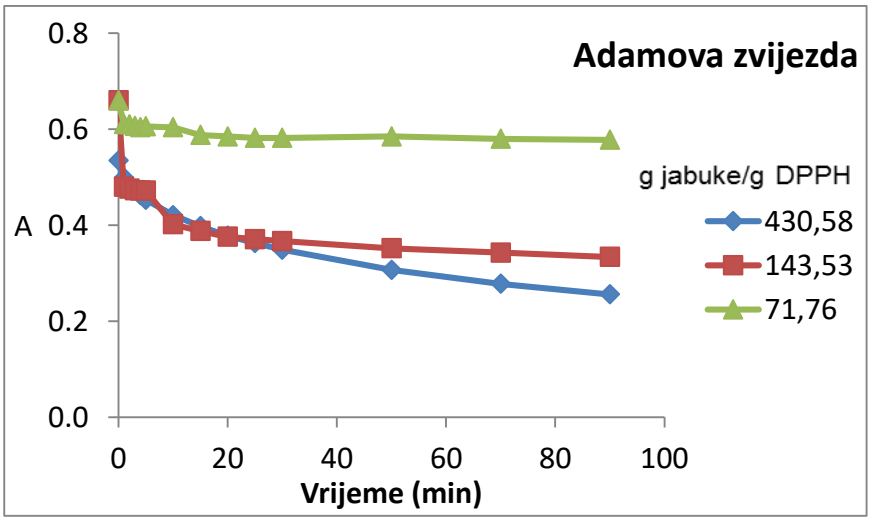


c)

Slika 6 Prikaz tijeka reakcije nestajanja DPPH radikala kroz vrijeme nakon reakcije s polifenolima iz mesa jabuka. a) lještarka; b) ljubeničarka; c) slavonska srčika

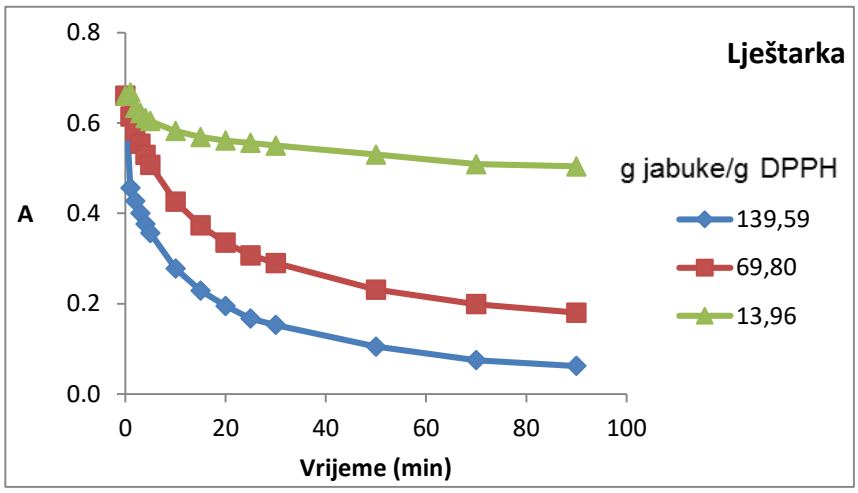


a)

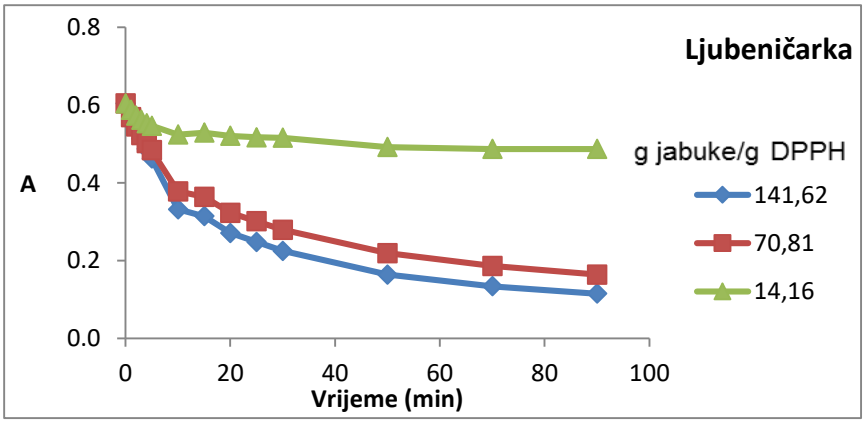


b)

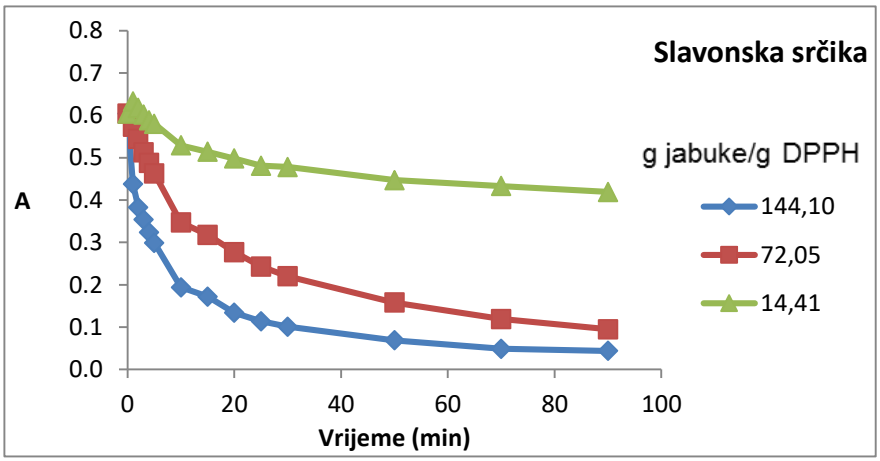
Slika 7 Prikaz tijeka reakcije nestajanja DPPH radikala kroz vrijeme nakon reakcije s polifenolima iz mesa jabuka. a) divlja jabuka; b) adamova zvijezda



a)

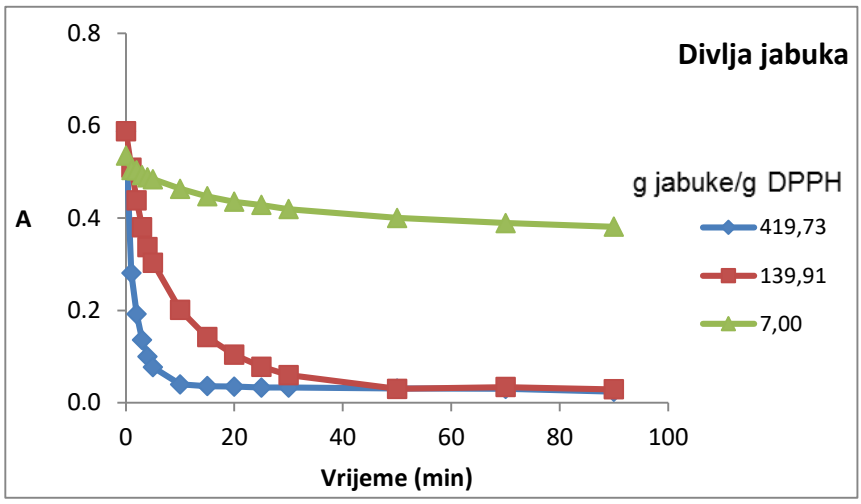


b)

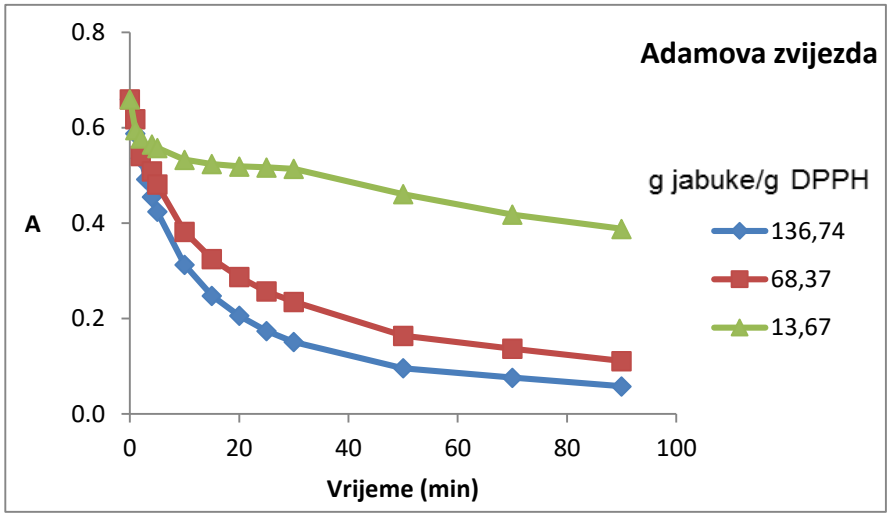


c)

Slika 8 Prikaz tijeka reakcije nestajanja DPPH radikala kroz vrijeme nakon reakcije s polifenolima iz kore jabuka. a) lještarka; b) ljubeničarka; c) slavonska srčika

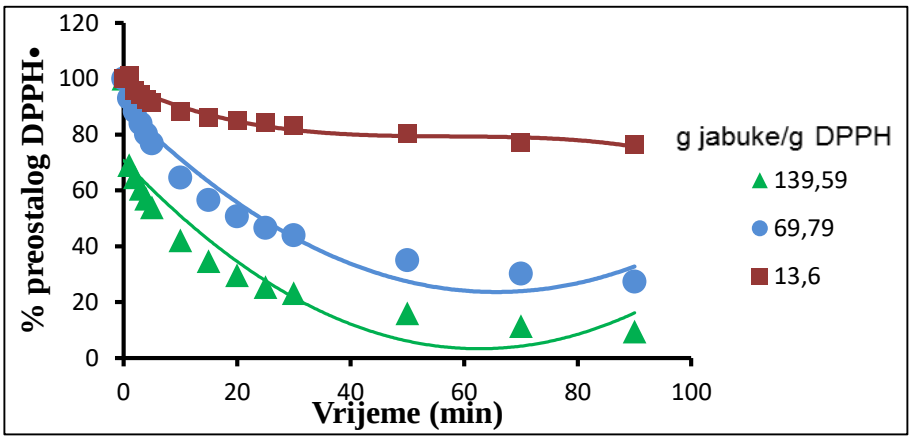


a)

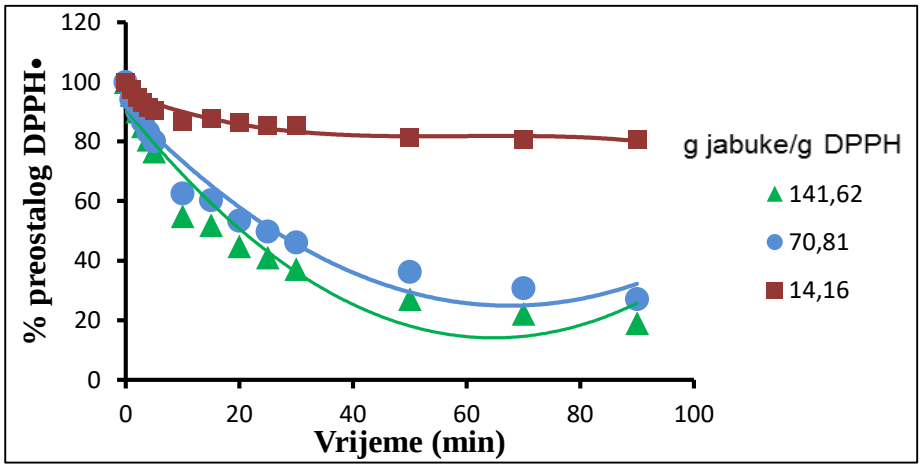


b)

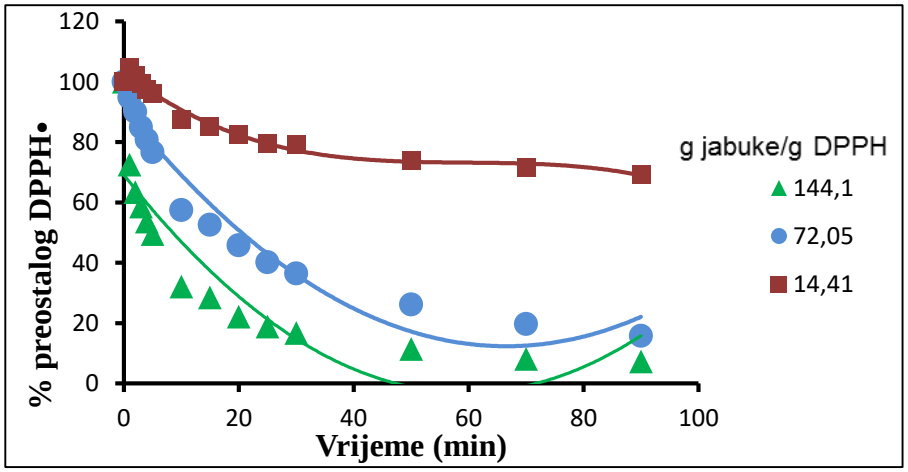
Slika 9 Prikaz tijeka reakcije nestajanja DPPH radikala kroz vrijeme nakon reakcije s polifenolima iz kore jabuka. a) divlja jabuka; b) adamova zvijezda



a)

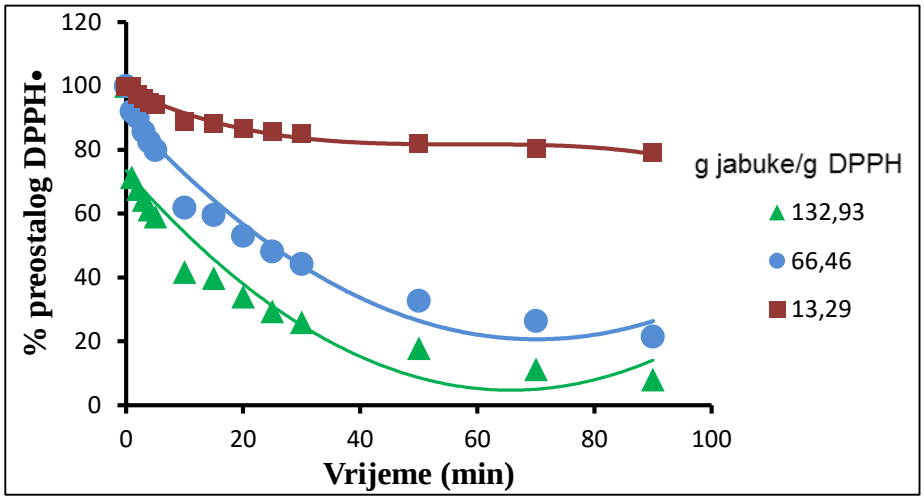


b)

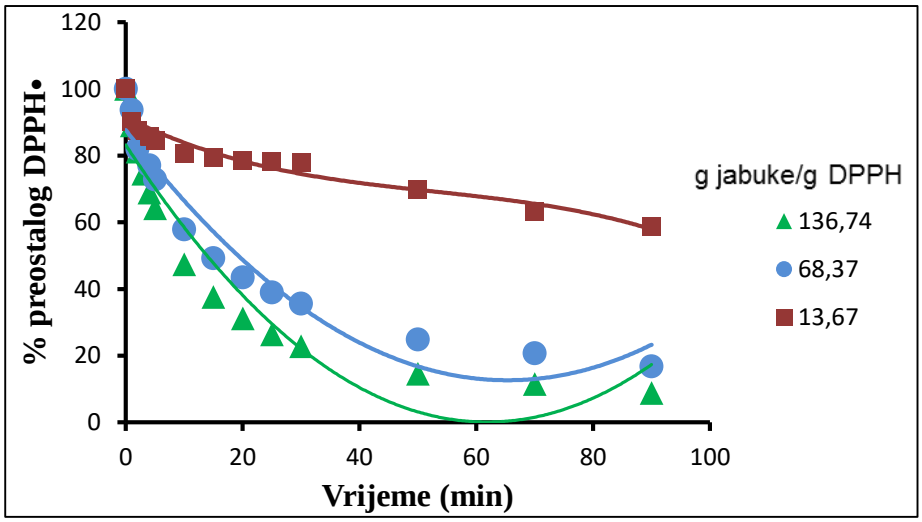


c)

Slika 10 Kinetika reakcije polifenola iz mesa jabuka s DPPH radikalima (g jabuke/g DPPH). a) lještarka; b) ljubeničarka; c) slavonska srčika

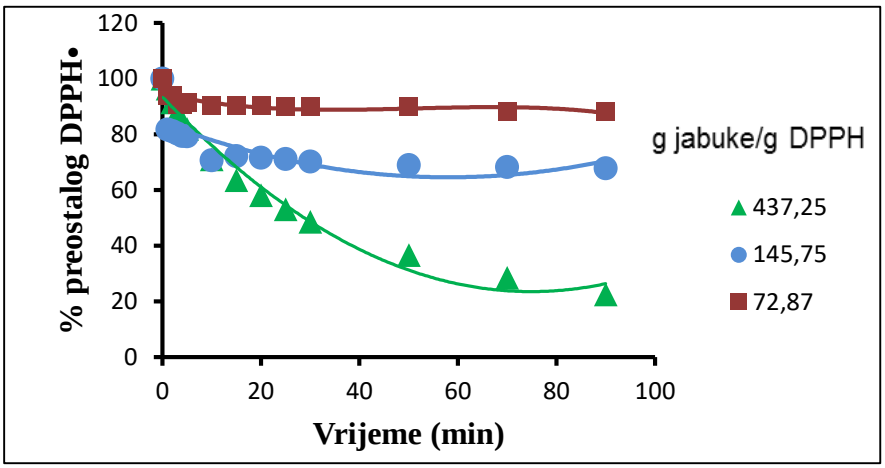


a)

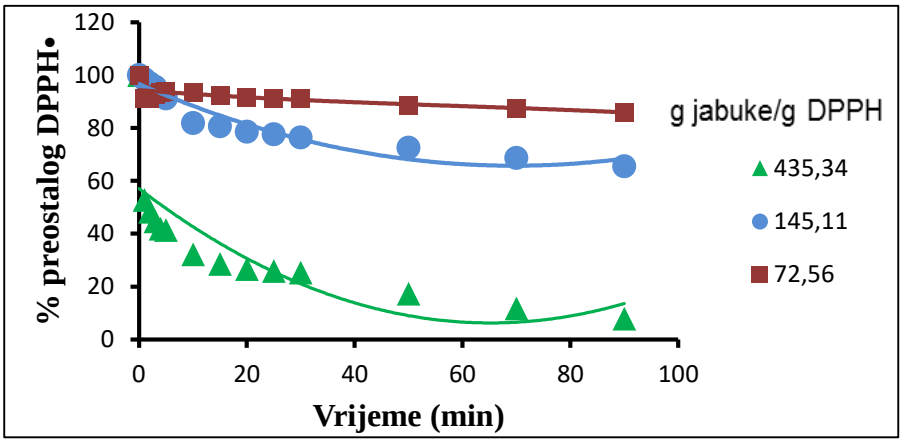


b)

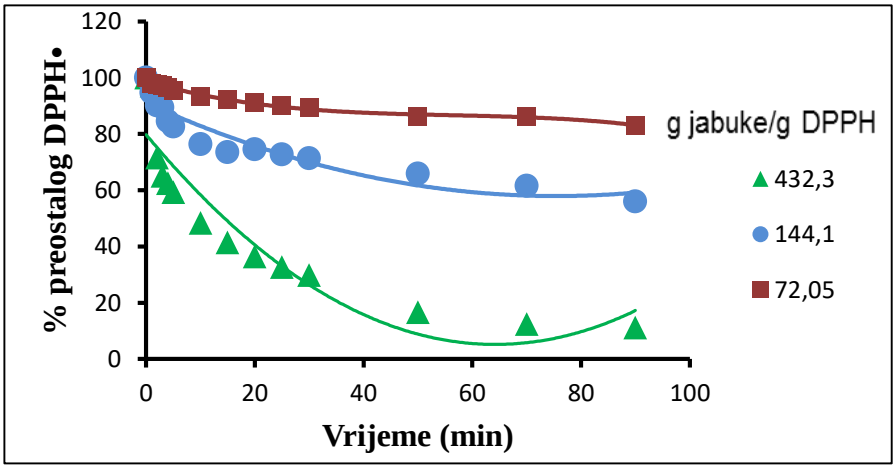
Slika 11 Kinetika reakcije polifenola iz mesa jabuka s DPPH radikalima (g jabuke/g DPPH). a) divlja jabuka; b) adamova zvijezda



a)

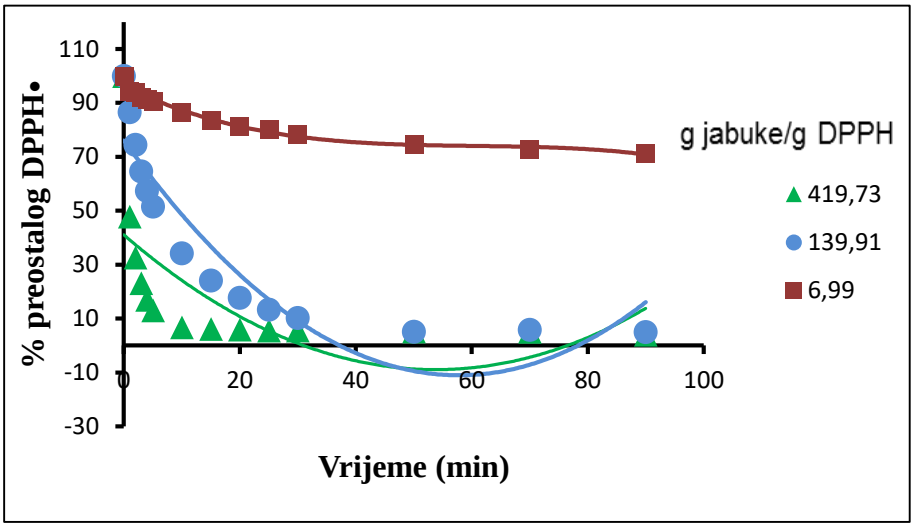


b)

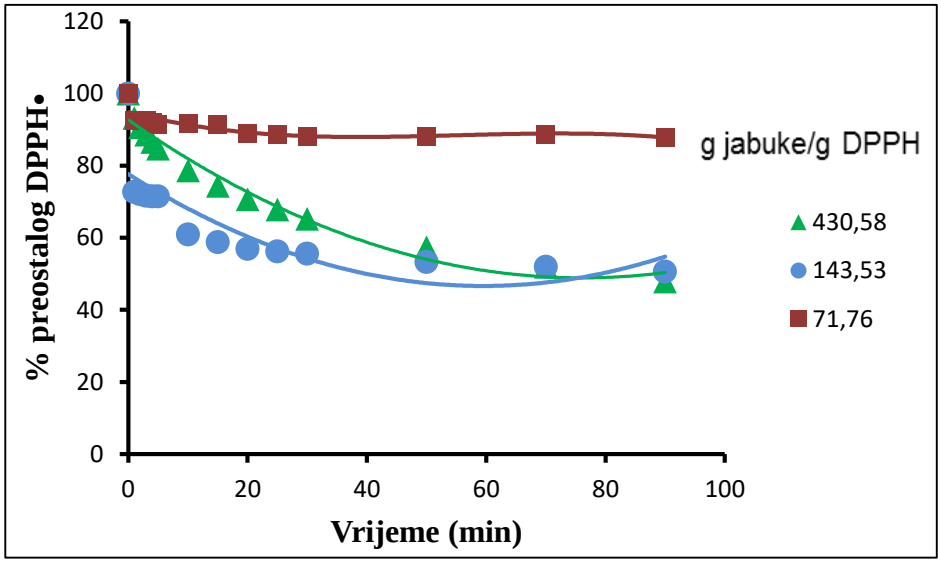


c)

Slika 12 Kinetika reakcije polifenola iz kore jabuka s DPPH radikalima (g jabuke/g DPPH). a) lještarka; b) ljubeničarka; c) slavonska srčika

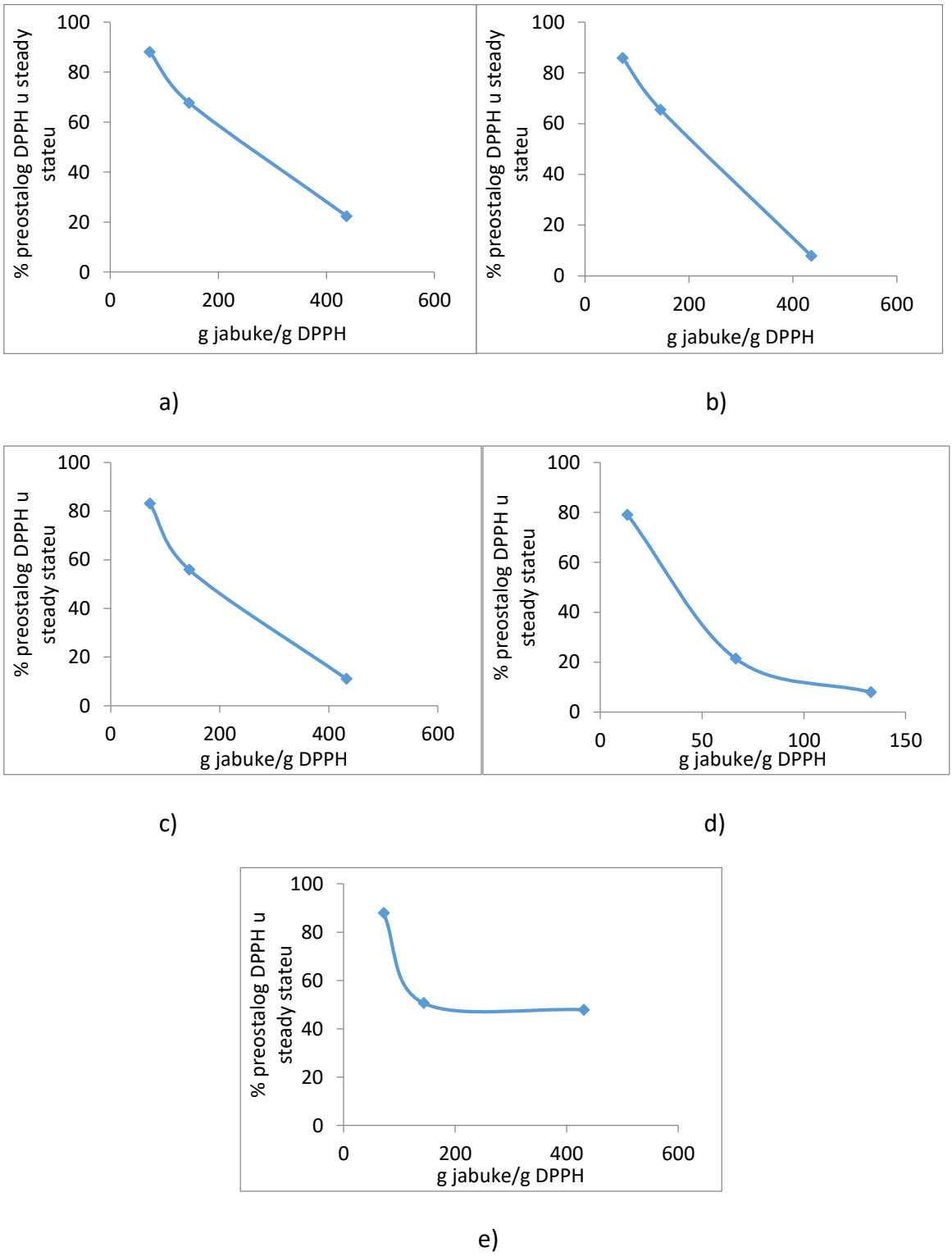


a)

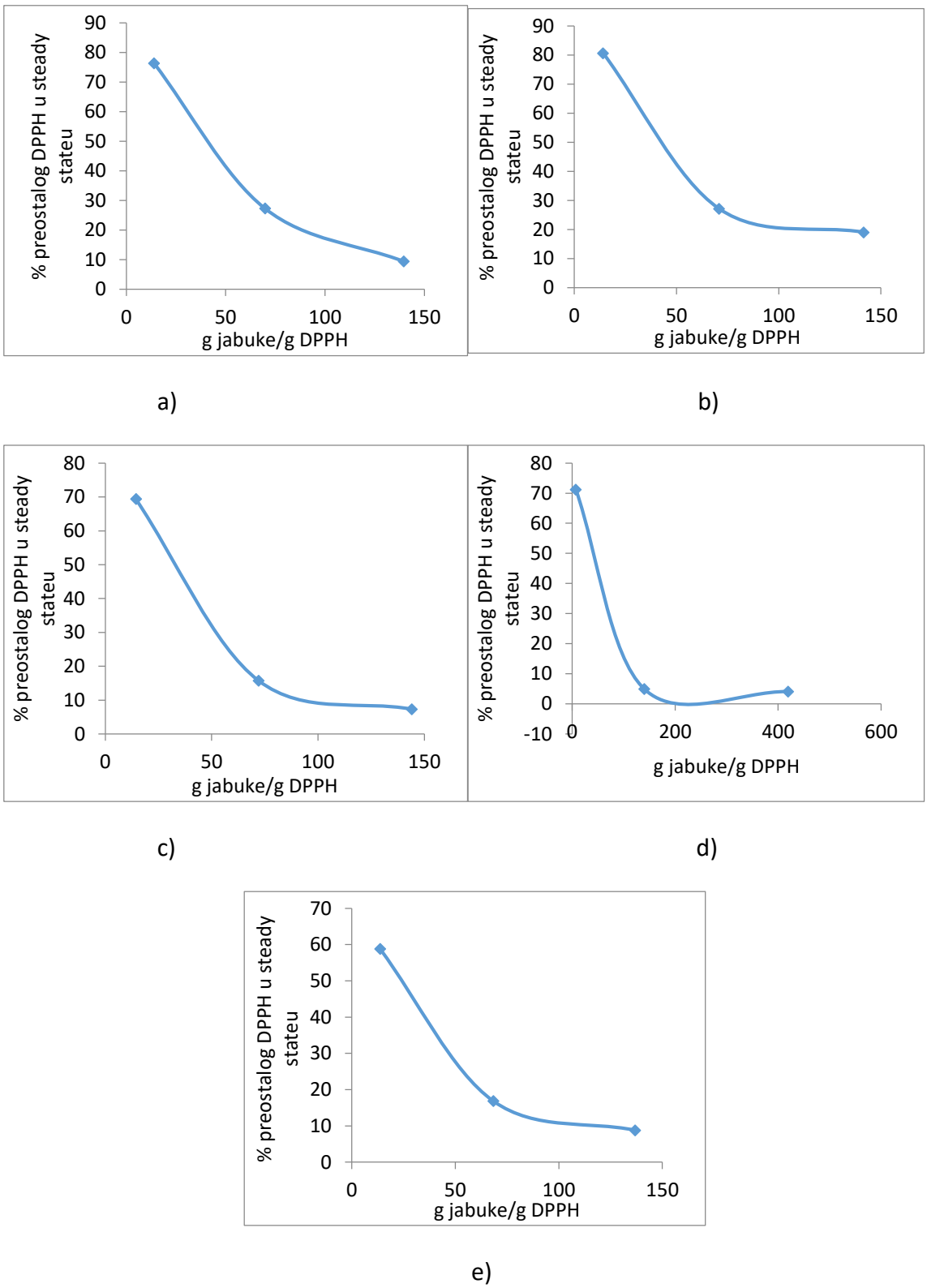


b)

Slika 13 Kinetika reakcije polifenola iz kore jabuka s DPPH radikalima (g jabuke/g DPPH). a) divlja jabuka; b) adamova zvijezda



Slika 14 Ovisnost % preostalogDPPH radikala u „steady state“ stanju o masi jabuke/masi DPPH radikala za meso jabuka, nakon 90 minuta reakcije. a) lještarka; b) ljubeničarka; c) slavonska srčika; d) divlja jabuka; e) adamova zvijezda



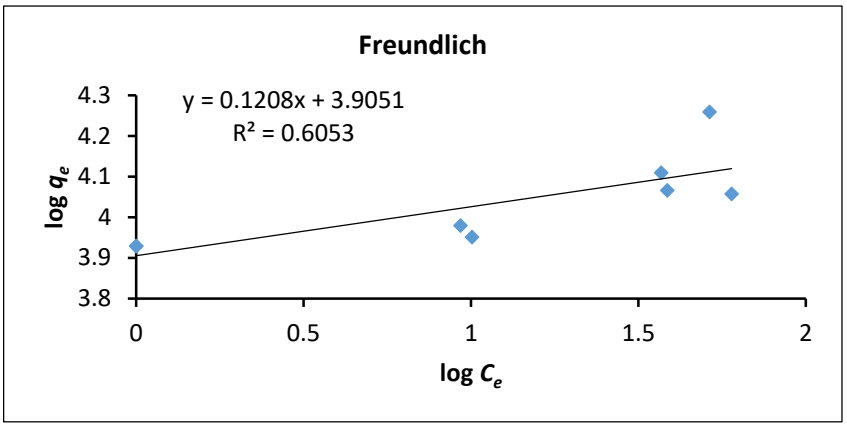
Slika 15 Ovisnost % preostalogDPPH radikala u „steady state“ stanju o masi jabuke/masi DPPH radikala za koru jabuka, u vremenu od 90 minuta. a) lještarka; b) ljubeničarka; c) slavonska srčika; d) divlja jabuka; e) adamova zvijezda

Tablica 2 Antiradikalna aktivnost polifenolnih spojeva iz jabuke izražena kao EC_{50} i *ARP* vrijednost

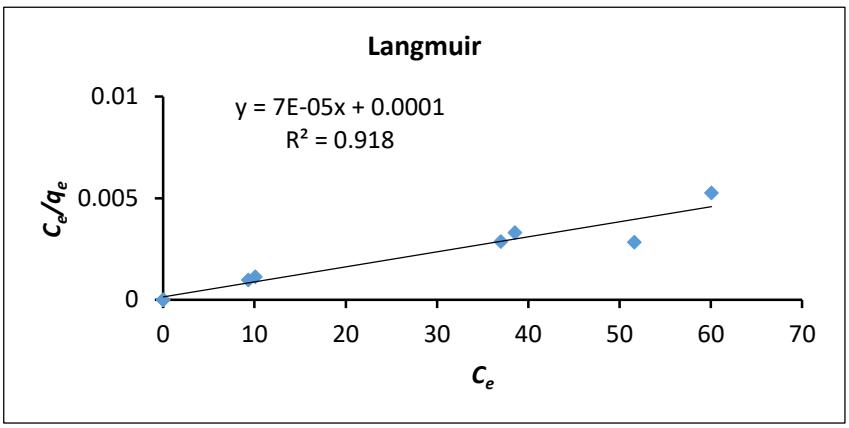
Kultivar jabuke		EC_{50}* g jabuke/ g DPPH	*ARP*
lještarka	Meso	213,56	0,0047
	Kora	39,63	0,0252
ljubeničarka	Meso	202,68	0,0049
	Kora	41,08	0,0243
slavonska srčika	Meso	161,48	0,0062
	Kora	30,71	0,0326
divlja jabuka	Meso	41,37	0,0242
	Kora	35,48	0,0282
adamova zvijezda	Meso	143,41	0,0070
	Kora	22,38	0,0447

***** EC_{50} vrijednost dobivena pomoću dijagrama ovisnosti % preostalog DPPH radikala u „steady state“ stanju o mase jabuke/masi DPPH u vremenu od 90 minuta.

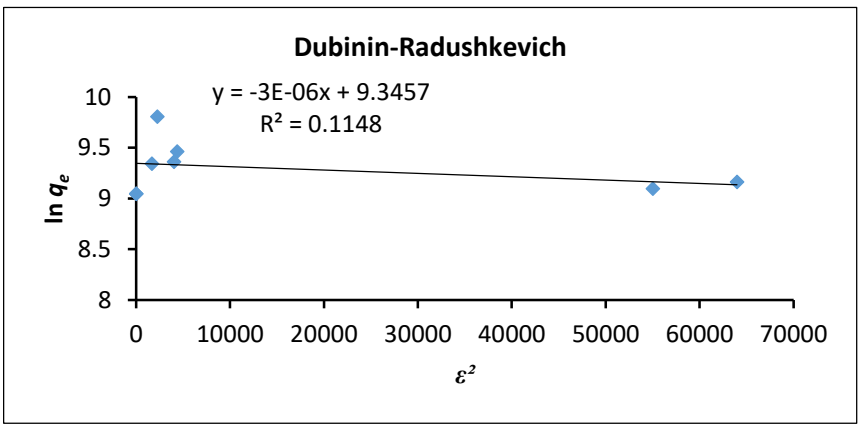
4.3. ADSORPCIJSKE IZOTERME ZA ADSORPCIJU POLIFENOLA JABUKA NA B-GLUKANU



a)

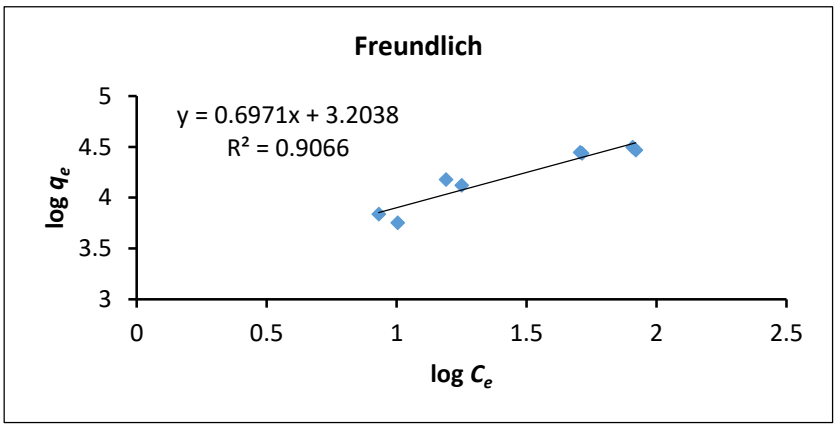


b)

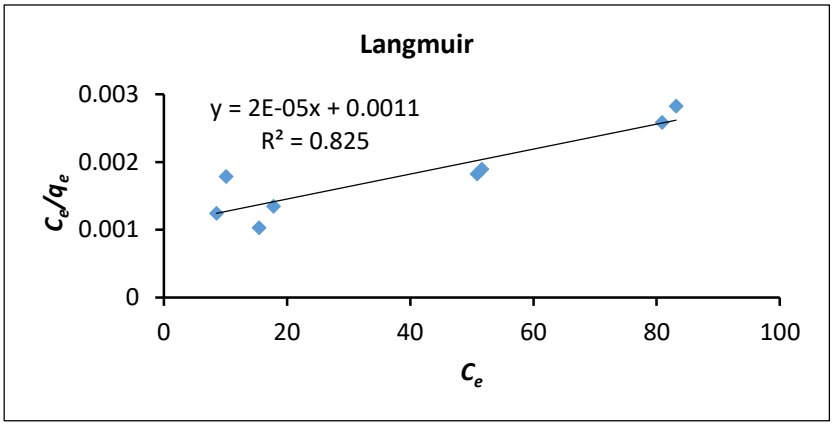


c)

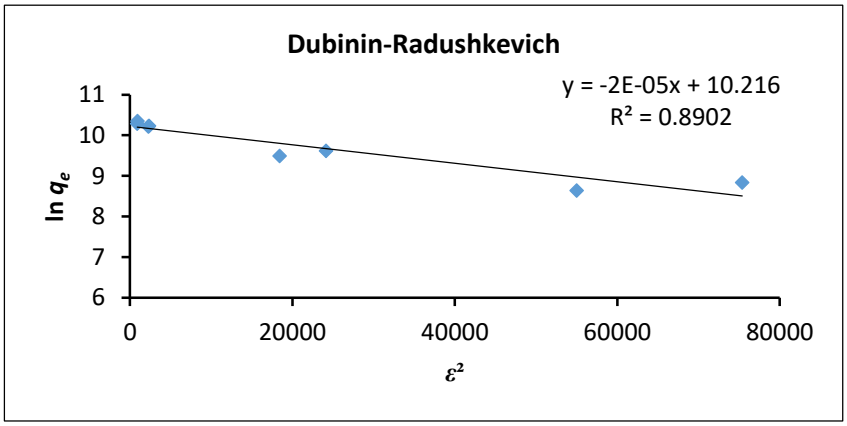
Slika 16 Linearni adsorpcijski modeli za adsorpciju polifenola iz mesa divlje jabuke na β-glukanu. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinin-Radushkevichev model



a)

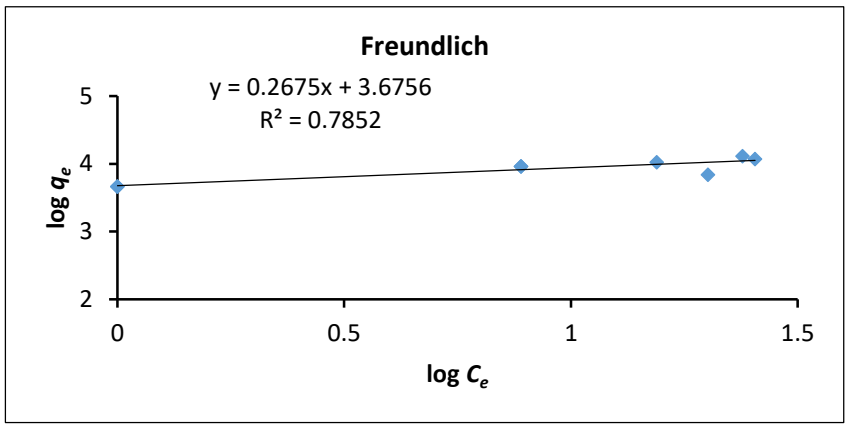


b)

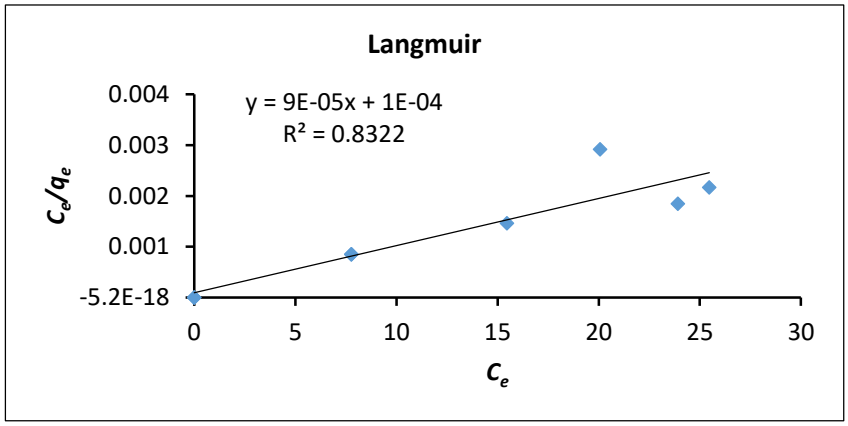


c)

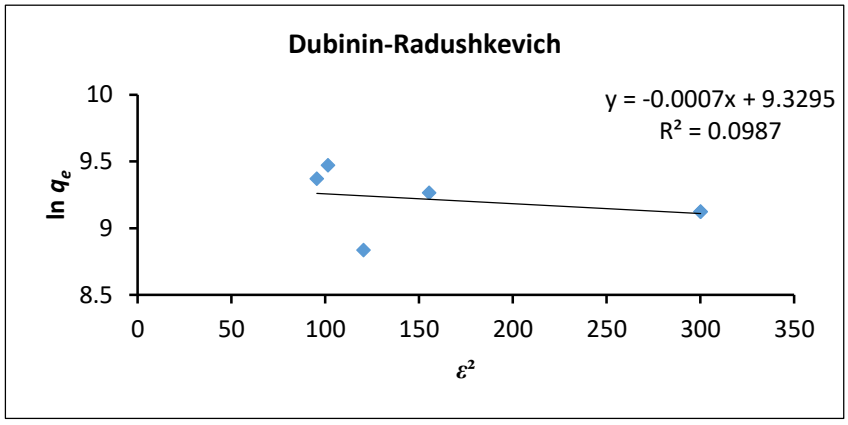
Slika 17 Linearni adsorpcijski modeli za adsorpciju polifenola iz kore divlje jabuke na β-glukanu. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinin-Radushkevichev model



a)

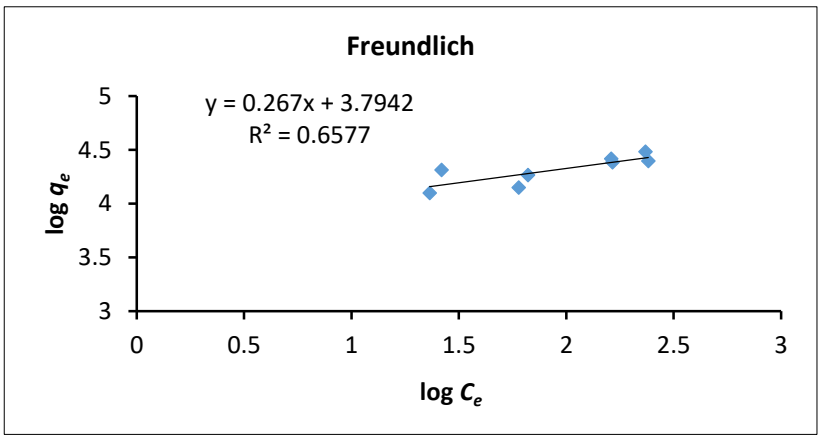


b)

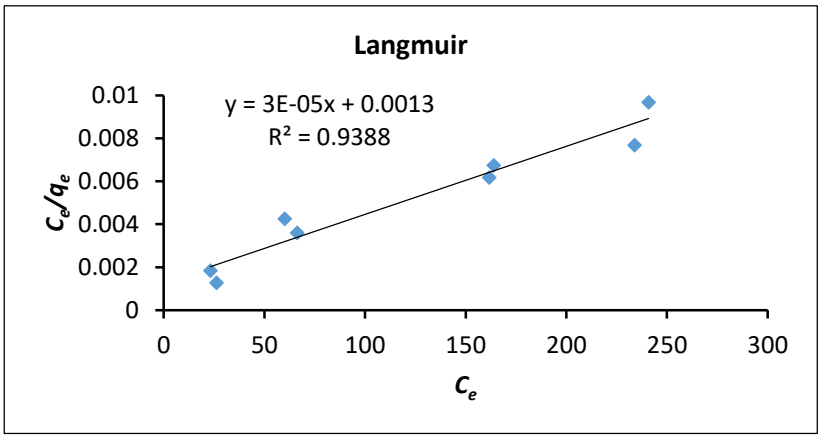


c)

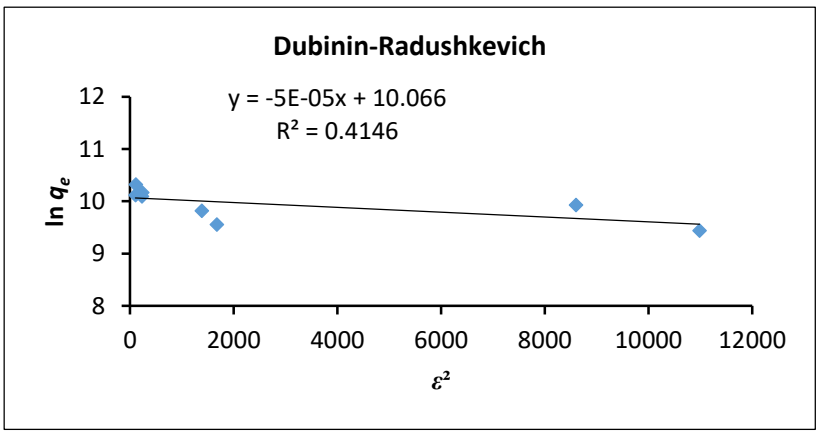
Slika 18 Linearni adsorpcijski modeli za adsorpciju polifenola iz mesa slavonske srčike na β-glukanu. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinin-Radushkevichev model



a)



b)



c)

Slika 19 Linearni adsorpcijski modeli za adsorpciju polifenola iz kore slavonske srčike na β-glukanu. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinin-Radushkevichev model

Tablica 3 Parametri Freundlichove, Langmuirove i Dubinin-Radushkevicheve adsorpcijske izoterme dobiveni za adsorpciju polifenola iz divlje jabuke i slavonske srčike na β-glukanu

Kultivar jabuke		Freundlichov model*		Langmuirov model*		Dubinin-Radushkevichev model*	
		1/n	K_F (mg g^{-1}) (mg $l^{-1})^{-1/n}$	K_L (l mg^{-1})	q_m (mg g^{-1})	E (kJ mol^{-1})	q_m (mg g^{-1})
Divlja jabuka	Meso	0,0593	50,82	0,699	14285,71	0,4082	11449,48
	Kora	0,6971	24,63	0,018	50000	0,5773	27337,10
Slavonska srčika	Meso	0,2675	39,47	1,120	11111,12	0,0267	11265,50
	Kora	0,267	44,44	0,023	33333,34	0,1	23529,26

* Modeli su dobiveni pomoću 100, 200, 500 i 700 µl ekstrakta jabuke, 53 µl β-glukana i fosfatnog pufera (pH=5,5) na volumen od 2 ml.
Mjerenje je izvršeno 2 puta (n=2) metodom za ukupne polifenole
1/n (konstanta intenziteta adsorpcije)
K_F (konstanta relativnog adsorpcijskog kapaciteta (mg g^{-1})(mg $l^{-1})^{-1/n}$);
K_L (konstanta slobodne energije ili konstanta afiniteta (l mg^{-1})
q_m (maksimalni teorijski adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})
E srednja slobodna energija adsorpcije (kJ mol^{-1})

5. RASPRAVA

U **Tablici 1** prikazan je sadržaj polifenola u mesu i kori jabuka određen Folin-Ciocalteau metodom, a izražen u mg l^{-1} i mg kg^{-1} svježe mase jabuka (FW), prema galnoj kiselini. Najviše polifenola u mesu sadržavala je divlja jabuka (3959 mg kg^{-1} FW), a slijedile su je ljubeničarka, slavonska srčika, adamova zvijezda te lještarka (314 do 754 mg kg^{-1} FW). U kori jabuka najviše polifenola pronađeno je u slavonskoj srčiki (6532 mg kg^{-1} FW), a slijedile su adamova zvijezda, ljubeničarka, divlja jabuka i lještarka (3595 do 4713 mg kg^{-1}FW). Kora je sadržavala više ukupnih polifenola nego meso (osim divlje jabuke koja je imala više polifenola u mesu nego u kori). Količine su slične literaturnim podacima (Jakobek i sur., 2013; Jakobek i Barron, 2016).
Antiradikalna aktivnost polifenola iz kore i mesa ispitivanih jabuka određena je pomoću DPPH metode. **Slike 6, 7, 8** i **9** prikazuju nestajanje DPPH radikala tijekom 90 minuta reakcije s polifenolima jabuka. Iz slika je vidljivo da se za veću koncentraciju polifenola (veći g jabuka /g DPPH) brže postizalo"steady state" stanje. Reakcija je u prvih 20-tak minuta tekla brže, nakon čega se brzina reakcija hvatanja slobodnih radikala usporavala (smanjivala seje i apsorbancija). **Slike 10, 11, 12** i **13** daju prikaz promjene postotka preostalog DPPH radikala nakon reakcije s polifenolima jabuka tijekom 90 minuta trajanja reakcije. S većom koncentracijom polifenola (veći udio g jabuke / g DPPH radikala) brže se postizalo"steady state" stanje. Reakcija polifenola sa slobodnim DPPH radikalima može se podijeliti u dvije faze:

1. faza u kojoj se inhibicija odvija brže (20-ak minuta reakcije)
2. faza u kojoj se inhibicija odvija sporije, što je u skladu s ranijim istraživanjima (Brand-Williams i sur., 1995).

Slike 14 i **15** predstavljaju ovisnost postotka preostalog DPPH radikala u "steady state" stanju (nakon 90 minuta reakcije) za tri različite ispitivane koncentracijske razine o g jabuke/g DPPH. Iz ovih dijagrama izračunata je EC_{50} vrijednost (g jabuka/ g DPPH potrebna da dovede do 50% inhibicije DPPH radikala). Antiradikalna aktivnost polifenolnih spojeva jabuka prikazana je u **Tablici 2**. U usporedbi polifenola iz mesa jabuke, najveću antiradikalnu aktivnost pokazala je divlja jabuka (EC_{50} 41,37; ARP 0,0242), a slijedile su adamova zvijezda, slavonska srčika, ljubeničarka i lještarka. Polifenoli iz kore adamove zvijezde pokazali su najveću antiradikalnu aktivnost (EC_{50} 22,4; ARP 0,0447), a slijedile su slavonska srčika, divlja jabuka, lještarka i ljubeničarka. Polifenoli jabuka pokazali su antiradikalnu aktivnost i ranijim istraživanjima (Iacopini i sur., 2010). Polifenoli kore jabuke pokazali su veću antiradikalnu aktivnost od mesa

jabuka. To se slaže s podacima za količinu ukupnih polifenola (**Tablica 1**)jer se pokazalo da kora jabuka sadrži veću količinu polifenola od mesa.

Dva kultivara jabuke izabrana su za daljnji eksperiment: divlja jabuka zbog velike količine polifenola u mesu te slavonska srčika zbog velike količine polifenola u kori (**Tablica 1**). Provedena je adsorpcija polifenola iz mesa i kore divlje jabuke i slavonske srčike na β-glukanu u vremenu od 16 h i izmjerena je ravnotežna koncentracija polifenola nakon 16 h adsorpcije (c_e u mg l^{-1}) te je izračunata i masa adsorbiranih polifenola po masi β-glukana (q_e u mg polifenola po g β-glukana). Ovi rezultati obrađeni su jednadžbama Freundlichove, Langmuirove i Dubinin-Radushkevicheve adsorpcijske izoterme, linearnim modelima (**Slike 16, 17, 18** i **19**). Adsorpcija polifenola iz mesa jabuka najbolje odgovara Langmuirovom modelu (R^2 = 0,918 i 0,8322, **slike 16** i **18**) te slijedi Freundlichov model (R^2 = 0,6053 i 0,7852, **slike 16** i **18**). Podaci se dosta slabije slažu s Dubinin-Radushkevichevim modelom (R^2 = 0,1148 i 0,0987, **slike 16** i **18**). Adsorpcija polifenola iz kore jabuke (**slike 17** i **19**) može se opisati sa sva tri modela (za Langmuirov R^2 = 0,825 i 0,9388; za Freundlichov R^2 = 0,9066 i 0,6577; za Dubinin-Radushkevichev R^2 = 0,8902 i 0,4146, **slike 17** i **19**). No, uzimajući u obzir sve parametre, najbolje odgovaraju Freundlichov i Langmuirov model.

Prema Langmuirovom modelu adsorpcija se odvija u jednom sloju na homogenoj površini, a nakon što se molekule adsorbiraju na površinu adsorbensa nema daljnjih interakcija (Foo and Hameed, 2010; Soto et al., 2011). Prema Freundlichu, adsorpcija je neidealna, revezna adsorpcija na heterogenu površinu koja nije ograničena na stvaranje monosloja (Foo and Hameed, 2010; Soto et al., 2011). Može se pretpostaviti da se u slučaju polifenola iz mesa jabuke, adsorpcija na β-glukanu odvija u jednom sloju, prema Langmuiru pošto ovaj model najbolje odgovara podacima. Kod polifenola iz kore, nije potpuno jasno da li se adsorpcija odvija u jednom ili više slojeva. Potrebna su daljnja istraživanja radi objašnjenja adsorpcije polifenola iz kore i mesa jabuka.

U **Tablici 3** prikazane su konstante Freundlichovog, Langmuirovog i Dubinin-Radushkevichevog modela. Ove konstante dobivene su pomoću jednadžbi linearnih modela iz nagiba i odsječka na y-osi. Prema Freundlichovoj konstantni *1/n* interakcije između polifenola iz mesa i kore jabuka su favorizirane (*1/n* manji od 1) (Babaeivelni i sur., 2013). Freundlichova konstantaK_F predstavlja vrijednost relativno adsorpcijskog kapaciteta q_e u mg g^{-1} za ravnotežnu koncentraciju C_e od 1 mg l^{-1} (Marsal i sur., 2012). Prema K_F najveći kapacitet adsorpcije na β-

glukanu pokazali su polifenoli iz mesa divlje jabuke (50,82 (mg g^{-1}) (mg $l^{-1})^{-1/n}$) te kore slavonske srčike (44,44 (mg g^{-1}) (mg $l^{-1})^{-1/n}$). Maksimalni teorijski adsorpcijski kapacitet polifenola na β-glukanuq_m prema Langmuiru i Dubinin-Radushkevichu pokazali su polifenoli iz kore jabuka (Langmuir q_m 50000 i 33333,34 mg g^{-1}; Dubinin-Radushkevich q_m 27337 i 23529 mg g^{-1}*)*, dok je kapacitet za polifenole mesa bio manji. Langmuirova konstanta K_L predstavlja ravnotežnu konstantu adsorpcije koja je povezana s ukupnom slobodnom energijom adsorpcije ili konstantu afiniteta (Marsal i sur., 2012). Najveći afinitet za adsorpciju pokazali su polifenoli mesa jabuka (K_L 0,699 i 1,120 l mg^{-1}).

Prema Dubinin-Radushkevichevom modelu može se odrediti slobodna energija adsorpcije *E* prema kojoj se može doći do zaključka je li adsorpcija fizikalna ili kemijska. Za sve polifenole iz kore i mesa, *E* je bila manja od 8 kJ mol^{-1} pa se može pretpostaviti su se polifenoli vezali na β-glukan fizikalnim vezama (Marsal i sur., 2012). Prijašnja istraživanja pokazala su da interakcije polifenola i polisaharida mogu biti fizikalne (vodikove veze, Van der Waalsove veze), a veza se odvija između hidroksilne skupine polifenola i hidroksilne skupine u molekuli polisaharida (Quiros-Sauceda i sur, 2014; Bordenave i sur., 2014). No, rezultate koji proizlaze iz Dubinin-Radushkevicheve izoterme treba interpretirati oprezno jer je ovaj model najmanje odgovarao adsorpciji polifenola iz jabuka na β-glukanu.

Iz rezultata je vidljivo da postoje razlike u adsorpciji na β-glukan između polifenola ekstrahiranih iz mesa i kore jabuka. Pokazalo se da su interakcije između polifenola kore i mesa na β-glukanu favorizirane. Polifenoli mesa jabuke pokazuju veliki afinitet za vezanje, dok se ipak više polifenola iz kore veže na β-glukan. Adsorpcija ovisi o sastavu polifenola kore i mesa jabuke te je u daljnjem ispitivanju ovih procesa potrebno utvrditi pojedine polifenolne spojeve koji se nalaze u kori i mesu te njihovu adsorpciju na β-glukan.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu ukupni polifenoli te antiradikalna aktivnost određivani su u ekstraktima mesa i kore pet starih kultivara jabuka. Adsorpcija na β-glukanu provedena je s ekstraktima mesa i kore jabuka koje su se pokazale najbogatije polifenolima. Izvedeni su sljedeći zaključci.

1. Kora jabuka sadržavala je više ukupnih polifenola od mesa jabuke. Iznimka je divlja jabuka koja je sadržavala nešto više polifenola u mesu nego u kori. Ukoliko se uspoređuju polifenoli mesa jabuke, meso divlje jabuke bilo je najbogatije polifenolima. Ukoliko se uspoređuju polifenoli kore, kora slavonske srčike bila je najbogatija polifenolima.
2. Polifenoli iz mesa i kore jabuka pokazali su da imaju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Pri tome su veću antiradikalnu aktivnost pokazali polifenoli kore. Ukoliko se uspoređuju polifenoli mesa, najveću antiradikalnu aktivnost pokazali su polifenoli mesa divlje jabuke. Ukoliko se uspoređuju polifenoli kore, kora adamove zvijezde pokazala je najveću antiradikalnu aktivnost.
3. Polifenoli iz mesa i kore divlje jabuke i slavonske srčike odabrani su za eksperiment adsorpcije na β-glukanu.
4. Adsorpcija polifenola iz mesa jabuka najbolje se može opisati Langmuirovom i Freundlichovom izotermom, dok se adsorpcija polifenola kore može opisati Freundlichovom, Langmuirovom i nešto manje Dubinin-Radushkevichevom izotermom. Prema parametrima izotermi, adsorpcija svih polifenola je favorizirana.
5. Postoje razlike u adsorpciji polifenola iz kore i mesa jabuke na β-glukan. Maksimalni adsorpcijski kapacitet β-glukan je pokazao prema polifenolima iz kore jabuka. Najveći afinitet za adsorpciju pokazali su polifenoli mesa jabuke. Može se pretpostaviti da se polifenoli iz kore i mesa vežu na β-glukan fizikalnim vezama.
6. Daljnja istraživanja potrebna su da bi se objasnio mehanizam adsorpcije.

7. LITERATURA

Babaeivelni, K, Khodadoust, AP: Adsorption of fluoride onto crystalline titanium dioxide: effect of pH, ionic strength, and co-existing ions, Journal of Colloid Interface Science 394: 419-427, 2013.

Berend, S, Grabarić, Z: Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 59: 205-212, 2008.

Bravo, L: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, Nutritional Reviews 56: 317-333, 1998.

Bordenave, N, Hamaker, BR, Ferruzzi MG: Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in food, Food&Function 5: 18-34, 2014.

Brand Williams, W, Cuvelier, ME, Berset, C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie 28, 25-30, 1995.

Brdička R: *Osnove fizikalne kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1969.

Chen, J, Raymond, K: Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risk, Vascular Health and Risk Management 4: 1265-1272, 2008.

Foo, KY, Hameed, BH: Insight into the modeling of adsorption isotherm systems, Chemical Engineering Journal 156: 2-10, 2010.

Gao, R, Liu H, Peng, Z, Wu, Z, Wang, Y, Zhao, G: Adsorption of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) onto oat β-glucan, Food Chemistry 132: 1936-1943, 2012.

Iacopini, P, Camangi, F, Stefani A, Sebastiani, L: Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of Malus x domestica Borkh. in a peroxynitrite-induced oxidative process, Journal of Food Composition and Analysis. 23: 518–524, 2010.

Jakobek, L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Disertacija.* Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2007.

Jakobek, L, García-Villalba, R, Tomás-Barberán, FA: Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region, Journal of Food Composition and Analysis 31: 199-211, 2013.

Jakobek, L, Barron, AR: Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds, Journal of Food Composition and Analysis 45: 9-15, 2016.

Jakobek, L: Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins, Food Chemistry 175: 556-567, 2015.

Kazazić, SP: Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 55, 279-290, 2004.

Kofuji, K, Aoki, A, Tsubaki, K, Konishi, M, Isobe, T, Murata, Y: Antioxidant activity of β-Glucan, ISRN Pharmacology 2012: 1-5, 2012.

Laroche, C, Michaud, P: New developments and prospective applications for β (1,3) glucans, Recent Patents on Biotechnology 1: 59-73, 2007.

Le Bourvellec, C, Renard, CMGC: Interactions between polyphenols and macromolecules: quantifications methods and mechanism, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 52: 213-248, 2012.

Limousin, G, Gaudet, JP, Charlet, L, Szenknect, S, Barthès, V, Krimissa, M: Sorption isotherms: a review on physical bases, modeling and measurement, Applied Geochemistry 22: 249-275, 2007.

Manach, C, Scalbert, A, Morand, C, Rémésy, C, Jiménez, L: Polyphenols: food sources and bioavailability, The American Journal of Clinical Nutrition79: 727-747, 2004.

Marsal, A, Maldonado F, Cuadros, S, Bautista ME, Manich, AM: Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of poloyphenols onto tannery shavings, Chemical Engineering Journal 183: 21-29, 2012.

Pandey, KB, Rizvi, SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and diseases, Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2: 270-278, 2009.

Plazinski, W, Rudzinski, W, Plazinska, A: Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: a review, Advances in Colloid and Interface Science 152: 2-13. 2009.

Prior, RL, Wu, X, Schaich, K: Standardized Methods for Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements, Journal of Agricultural and Food Chemistry53: 10, 4290-4302, 2005.

Ramassamy, C: Emerging role of polyphenoloic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets, European Journal of Pharmacology 545: 51-64, 2006.

Shao, X, Bao, N, He, K, Ho, CT, Y, CS, Sang, S: Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species, Chemical Research in Toxicology 21: 2042-2050, 2008.

Singleton LV, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM: Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178, 1999.

Simonsen, HT, Nielsen, MS, Christensen, NJ, Christensen U, La Cour, TV, Motawia, MS, Jespersen, BPM, Engelsen, SB, Moller, BL: Molecular interactions between barley and oat β-glucans and phenolic derivatives,Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 2056-2064, 2009.

Soto, ML, Moure, A, Domínguez, H, Parajó, JC: Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review, Journal of Food Engineering 105: 1-27, 2011.

Queenan, KM, Stewart, ML, Smith, KM, Thomas, W, Fulcher, RG, Slavin, JL: Concentrated oat β-glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial, Nutritional Journal 6: 1-8, 2007.

Quirós-Sauceda AE, Palafox-Carlos H, Sáyago-Ayerdi SG, Ayala-Zavala JF, Bello-Perez LA, Alvarez-Parrilla E, de la Rosa LA, González-Córdova AF,González-Aguilar GA: Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. Food&Function 5: 1063-1072, 2014.

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.