

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Adriana BAN

**PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA IONSKIH IZMENJEVALCEV IZ
ODPADNIH RASTLINSKIH MATERIALOV ZA VEZAVO Cu^{2+} IZ
VODNIH RAZTOPIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ION
EXCHANGERS FROM WASTE PLANT MATERIAL FOR Cu^{2+}
BINDING FROM WATER SOLUTIONS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Določanje Cu^{2+} v raztopinah je bilo opravljeno na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Blaža Cigić, za somentorja doc. dr. Rajka Vidrih in za recenzentko doc. dr. Leo Pogačnik.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Somentor: doc. dr. Rajko Vidrih

Recenzentka: doc. dr. Lea Pogačnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Adriana Ban

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 664.764 : 661.183.1 : 546.56 (043)= 163.6
KG ionski izmenjevalci / baker / bakrovi ioni / vezanje bakrovih ionov / otrobi / pšenični otrobi kot izmenjevalci / priprava otrobov / kapaciteta vezave Cu^{2+} / vpliv Cu^{2+} na vsebnost antioksidantov
AV BAN, Adriana
SA CIGIČ, Blaž (mentor) / VIDRIH, Rajko (somentor) / POGAČNIK, Lea (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2008
IN PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA IONSKIH IZMENJEVALCEV IZ ODPADNIH RASTLINSKIH MATERIALOV ZA VEZAVO Cu^{2+} IZ VODNIH RAZTOPIN
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIV, 55 s., 18 preg., 20 slik, 15 pril., 33 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Odpadni rastlinski materiali iz živilsko predelovalne industrije so lahko poceni alternativa komercialnim ionskim izmenjevalcem za vezanje kovinskih ionov iz vodnih raztopin. Iz pšeničnih otrobov smo z obdelavo s citronsko kislino in H_2SO_4 pripravili različne kationske izmenjevalce. Dva izmenjevalca, ki sta pokazala dobre rezultate v rahlo kislem območju pH, smo okarakterizirali glede na kinetiko vezanja Cu^{2+} iz vodnih raztopin, kapaciteto vezave Cu^{2+} na izmenjevalec, vezavo majhnih koncentracij Cu^{2+} z različnimi koncentracijami izmenjevalca, vezavo Cu^{2+} na izmenjevalec v prisotnosti proste citronske kisline ter vezavo Cu^{2+} na izmenjevalec v prisotnosti Ca^{2+} ionov. Koncentracijo prostega Cu^{2+} v raztopini smo določali z atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Na osnovi rezultatov vezave Cu^{2+} v modelnih raztopinah smo izbrali najbolj učinkovit izmenjevalec in ga uporabili za vezavo Cu^{2+} v vzorcu jabolčnega soka. Hoteli smo ugotoviti, ali lahko izmenjevalec uporabimo za vezavo Cu^{2+} v živilu in kako zmanjšana vsebnost Cu^{2+} vpliva na barvo, vsebnost antioksidantov in stabilnost askorbinske kisline, ki smo jo dodali v sok. Ugotovili smo, da je učinkovitost izmenjevalca v soku slabša kot v modelnih raztopinah, hkrati pa smo tudi opazili, da je zmanjšana koncentracija Cu^{2+} prve dni negativno vplivala na barvo, saj je sok skladiščen pri $55\text{ }^\circ\text{C}$ močnejše porjavel. Med skladiščenjem pa so sokovi, katerim je bil dodan Cu^{2+} , postali temnejši. Vsebnost askorbinske kisline se je v prisotnosti Cu^{2+} hitreje zmanjševala, medtem ko večjega vpliva na vsebnost skupnih antioksidantov nismo opazili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 664.764 : 661.183.1 : 546.56 (043)= 163.6
CX ion exchangers / copper / copper ions / copper ions binding / bran / wheat bran as
ions exchangers / bran preparing / capacity of copper ions binding / effect of Cu^{2+} on
antioxidant content
AU BAN, Adriana
AA CIGIĆ, Blaž (supervisor) / VIDRIH, Rajko (co-advisor) / POGAČNIK, Lea
(reviewer)
PP SI-100 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2008
TI PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ION EXCHANGERS FROM
WASTE PLANT MATERIAL FOR Cu^{2+} BINDING FROM WATER
SOLUTIONS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 55 p., 18 tab., 20 fig., 15 ann., 33 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Waste plant material from food processing industry could be inexpensive alternative
to commercial ion exchangers for binding metal ions from water solutions. Wheat
bran was modified with citric acid and H_2SO_4 to prepare various cation exchangers.
Two exchangers that showed good results in slightly acidic pH range were
characterised according to kinetics of Cu^{2+} binding from water solutions, capacity of
 Cu^{2+} binding on exchanger, binding of low concentrations of Cu^{2+} to the varying
concentrations of the exchanger, Cu^{2+} binding on the exchanger in the presence of
free citric acid and Cu^{2+} binding on the the exchanger in the presence of Ca^{2+} ions.
Atomic absorption spectrometry was used to determine the concentration of free
 Cu^{2+} . On the basis of results from the Cu^{2+} binding in model solutions the most
efficient exchanger was chosen for Cu^{2+} binding in a sample of apple juice. The aim
of thesis was to find out, if exchanger from waste plant material can be used in food
matrixes and how reduced Cu^{2+} content influence the colour, antioxidant activity
and stability of ascorbic acid added to the juice. The results showed that the
efficiency of the exchanger in the apple juice was reduced in comparison to model
solutions. It was also observed that in the first days the reduced Cu^{2+} concentration
had negative effect on the colour since the juice stored in 55 °C browned more.
During storage the juices with added Cu^{2+} became darker. The ascorbic acid content
was reduced rapidly in the presence of Cu^{2+} . There was no significant influence of
the exchanger on the antioxidant potential.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJI DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKER (<i>cuprum</i>).....	3
2.1.1 Baker kot katalizator pri reakcijah nastajanja prostih radikalov	3
2.1.2 Vpliv bakra na oksidacijo askorbinske kisline in polifenolov v živilih	4
2.1.3 Baker v živilih	5
2.1.3.1 Baker v prehrani in metabolizmu človeka.....	6
2.1.3.2 Toksičnost bakra.....	6
2.2 PŠENIČNI OTROBI	7
2.2.1 Kemijska sestava	7
2.2.2 Uporabnost	8
2.3 KATIONSKE IZMENJEVALCI.....	8
2.3.1 Tipi izmenjevalcev	9
2.3.1.1 Naravni ionski izmenjevalci.....	9
2.3.1.2 Sintetični ionski izmenjevalci.....	10
2.3.2 Kationski izmenjevalci iz odpadnih rastlinskih materialov.....	11
3 MATERIAL IN METODE	13

3.1	MATERIALI	13
3.2	PRIPRAVA IZMENJEVALCEV	14
3.3	PRIPRAVA VZORCEV	16
3.3.1	Vezava Cu^{2+} na pripravljene izmenjevalce iz pšeničnih otrobov.....	17
3.3.1.1	Vpliv pH na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalca.....	17
3.3.1.2	Kinetika vezave Cu^{2+} na izmenjevalca.....	17
3.3.1.3	Kapaciteta vezave Cu^{2+} na izmenjevalca.....	18
3.3.1.4	Vezava majhne koncentracije Cu^{2+} z različnimi koncentracijami izmenjevalcev	18
3.3.1.5	Vezava Cu^{2+} na izmenjevalca v prisotnosti organskih kislin	19
3.3.1.6	Vezava Cu^{2+} na izmenjevalca v prisotnosti Ca^{2+}	19
3.3.1.7	Vezava Cu^{2+} na izmenjevalec, obdelan z NaOH in modificiran s CA, v jabolčnem soku.....	20
3.3.2	Vpliv izmenjevalca, obdelanega z NaOH in modificiranega s citronsko kislino, dodatka Cu^{2+} in askorbinske kisline na barvo jabolčnega soka.....	21
3.3.2.1	Barva jabolčnega soka po sedmih mesecih skladiščenja.....	22
3.3.3	Vpliv izmenjevalca, obdelanega z NaOH in modificiranega s citronsko kislino, dodatka Cu^{2+} in askorbinske kisline na skupno antioksidativno aktivnost v jabolčnem soku	22
3.3.4	Vpliv izmenjevalca, obdelanega z NaOH in modificiranega s citronsko kislino, in dodatka Cu^{2+} na stabilnost askorbinske kisline v jabolčnem soku.....	22
3.4	INSTRUMENTALNE ANALIZE	23
3.4.1	Merjenje Cu^{2+} z atomsko absorpcijsko spektrometrijo	23
3.4.2	Merjenje barvnega spektra.....	23
3.4.3	Določanje skupnih antioksidantov	24
3.4.4	Določanje askorbinske kisline s HPLC	25
4	REZULTATI.....	26
4.1	KARAKTERIZACIJA IZMENJEVALCEV	26
4.1.1	Vpliv pH na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalce iz pšeničnih otrobov	26
4.1.2	Kinetika vezave Cu^{2+} na izmenjevalca.....	28
4.1.3	Kapaciteta vezave Cu^{2+} na izmenjevalca.....	29

4.1.4	Vezava majhnih koncentracij Cu^{2+} z različnimi koncentracijami izmenjevalcev	31
4.1.5	Vezava majhnih koncentracij Cu^{2+} na izmenjevalca v prisotnosti organskih kislin	33
4.1.6	Vezava majhnih koncentracij Cu^{2+} na izmenjevalca v prisotnosti Ca^{2+}	34
4.1.7	Vezava Cu^{2+} na izmenjevalec, obdelan z NaOH in modificiran s citronsko kislino, v jabolčnem soku	36
4.2	VPLIV IZMENJEVALCA, OBDELANEGA Z NaOH IN MODIFICIRANEGA S CITRONSKO KISLINO, DODATKA Cu^{2+} IN ASKORBINSKE KISLINE NA BARVO JABOLČNEGA SOKA	37
4.2.1	Barva jabolčnega soka po sedmih mesecih skladiščenja	39
4.3	VPLIV IZMENJEVALCA, OBDELANEGA Z NaOH IN MODIFICIRANEGA S CITRONSKO KISLINO, DODATKA Cu^{2+} IN ASKORBINSKE KISLINE NA SKUPNO ANTIOKSIDATIVNO AKTIVNOST JABOLČNEGA SOKA	40
4.4	VPLIV IZMENJEVALCA, OBDELANEGA Z NaOH IN MODIFICIRANEGA S CITRONSKO KISLINO IN DODATKA Cu^{2+} NA STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V JABOLČNEM SOKU	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	44
5.1	RAZPRAVA.....	44
5.2	SKLEPI.....	48
6	POVZETEK.....	50
7	VIRI	52

**ZAHVALA
PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Lastnosti bakra (Lazarini in Brenčič, 1989).....	3
Preglednica 2: Vsebnost bakra v živilih (Barberá in sod., 2003).....	6
Preglednica 3: Kemijska sestava pšeničnih otrobov (Zitterman, 2003).....	8
Preglednica 4: Primeri funkcionalnih skupin za kationske izmenjevalce. V oklepajih so navedene vrednosti pKa (Zagorodni, 2007).....	9
Preglednica 5: Primer priprave 100 ml in 50 ml vodne raztopine z izmenjevalci.....	16
Preglednica 6: Časi injiciranja raztopin jabolčnega soka z dodano askorbinsko kislino na HPLC.....	23
Preglednica 7: Volumni raztopin za pripravo umeritvene krivulje s klorogensko kislino za določanje skupnih antioksidantov.....	24
Preglednica 8: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, spranih z vodo (PO+ H_2O); pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH (PO+NaOH), pšeničnih otrobov spranih z vodo in modificiranih s citronsko kislino (PO+ H_2O +CA); pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA); pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA) in pšeničnih otrobov, dehidriranih s H_2SO_4 (PO+ H_2SO_4).....	27
Preglednica 9: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA), ob različnih časih.....	29
Preglednica 10: Kapaciteta vezave Cu^{2+} iz vodnih raztopin na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (CA) (Cu^{2+} (mg)/ izm. (g)).....	30
Preglednica 11: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA), z začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l.....	32
Preglednica 12: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA) v prisotnosti 3 g/l citronske kisline (PO+CA) in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l.....	34
Preglednica 13: Učinkovitost pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA) v vodnih raztopinah v prisotnosti 3 g/l citronske kisline (CA) (delež vezanih Cu^{2+} (%) v raztopinah z izmenjevalcema v prisotnosti 3 g/l CA in začetno konc. Cu^{2+} 1 mg/l, deljeno z deležem vezanih Cu^{2+} (%) v raztopinah z izmenjevalcema brez dodane CA in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l).....	34
Preglednica 14: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in	

pšeničnih otrobov, modificiranih s citrsko kislino (PO+CA), v prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+} in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l.	35
Preglednica 15: Učinkovitost pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citrsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citrsko kislino (PO+CA), v vodnih raztopinah, v prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+} (delež vezanih Cu^{2+} (%) v raztopinah z izmenjevalcema v prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+} in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l, deljeno z deležem vezanih Cu^{2+} (%) v raztopinah z izmenjevalcema brez dodanih Ca^{2+} in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l).....	36
Preglednica 16: Povprečje nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v raztopinah jabolčnih sokov iz treh embalažnih enot brez dodatkov (JS), z dodatkom izmenjevalca (JS+I); z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I), po stresanju (180 min) s pšeničnimi otrobi, obdelanimi z NaOH in modificiranimi s citrsko kislino (PO+NaOH+CA).....	36
Preglednica 17: Absorbance pri 420 nm za raztopine jabolčnih sokov iz 1. in 2. embalažne enote, glede na različne dodatke, po stresanju (180 min) s pšeničnimi otrobi, modificiranimi s citrsko kislino (PO+NaOH+CA).....	37
Preglednica 18: Skupni antioksidanti (ekvivalent klorogenske kisline (mmol/l)) raztopin jabolčnega soka z različnimi dodatki iz 1. embalažne enote.....	42

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Princip oksidacije askorbinske kisline v dehidroaskorbinsko kislino ob prisotnosti ionov prehodnih kovin, Me (Me^n reducirana oblika prehodne kovine, Me^{n+1} oksidirana oblika prehodne kovine), kot katalizatorjev (Belitz in Grosch, 1999).	4
Slika 2: (a) dolžinski prerez otrobnih plasti (perikarp, semenski ovoj, aleuronska plast); (b) dolžinski prerez pšeničnega zrna (Zitterman, 2003).	7
Slika 3: Citronska kislina (Schröter in sod., 1993).	12
Slika 4: Shema priprave izmenjevalcev.	14
Slika 5: Pripravljeni izmenjevalci iz pšeničnih otrobov (pšenični otrobi sprani z vodo ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$); pšenični otrobi, sprani z vodo in modificirani s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$); pšenični otrobi, modificirani s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$); pšenični otrobi, obdelani z NaOH ($\text{PO}+\text{NaOH}$); pšenični otrobi, obdelani z NaOH in modificirani s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$); pšenični otrobi, dehidrirani s H_2SO_4 ($\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$)) ..	15
Slika 6: Priprava raztopin jabolčnega soka za merjenje barvnega spektra in določanje skupnih fenolnih snovi.	21
Slika 7: Vpliv pH vodnih raztopin na vezavo Cu^{2+} na pšenične otrobe, sprane z vodo ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$); pšenične otrobe, obdelane z NaOH ($\text{PO}+\text{NaOH}$); pšenične otrobe sprane z vodo in modificirane s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$); pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$); pšenične otrobe, modificirane s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$) in pšenične otrobe, dehidrirane s H_2SO_4 ($\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$).	26
Slika 8: Kinetika vezave dodanih Cu^{2+} na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšenične otrobe, modificirane s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$), v vodnih raztopinah v različnih območjih pH.	28
Slika 9: Kinetika vezave dodanih Cu^{2+} na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšenične otrobe, modificirane s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$), v vodnih raztopinah v različnih območjih pH pri kontaktnem času, manjšem od 250 min.	28
Slika 10: Delež vezanih Cu^{2+} (%) iz vodnih raztopin v odvisnosti od začetne koncentracije Cu^{2+} (50, 100 in 200 mg/l Cu^{2+}) pri koncentraciji pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$) 1 g/l.	30
Slika 11: Vodni raztopini pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) po stresanju, pri začetnih pogojih pH 5,0 s 100 mg/l in 200 mg/l Cu^{2+}	31
Slika 12: Vpliv koncentracije pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$), v vodnih raztopinah, na vezavo Cu^{2+} z začetno koncentracijo 1 mg/l.	32
Slika 13: Delež vezanih Cu^{2+} v odvisnosti od koncentracije pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citrsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšeničnih otrobov,	

modificiranih s citronsko kislino (PO+CA), v vodnih raztopinah v prisotnosti 3 g/l citronske kisline.....	33
Slika 14: Delež vezanih Cu^{2+} na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA), v prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+}	35
Slika 15: Barvni spekter raztopin jabolčnega soka iz 1. embalažne enote z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in brez dodatkov (JS) (začetni, 3. in 7. dan).....	38
Slika 16: Diferenčni graf raztopin jabolčnega iz 1. embalažne enote z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in brez dodatkov (JS) (razlika absorbanc tretjega in začetnega dneva ter sedmega in začetnega dneva).	38
Slika 17: Raztopine jabolčnega soka glede na različne dodatke (od leve proti desni: brez dodatkov (JS); z dodatkom askorbinske kisline* (JS+AA); z dodatkom izmenjevalca (JS+I); z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline (JS+I+AA)) po 7 mesecih skladiščenja.....	39
Slika 18: Raztopine jabolčnega soka glede na različne dodatke (od leve proti desni: brez dodatkov (JS); z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}); z dodatkom Cu^{2+} z dodatkom askorbinske kisline* (JS+ Cu^{2+} +AA); z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I); z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline (JS+ Cu^{2+} +I+AA); z dodatkom izmenjevalca (JS+I)) po 7 mesecih skladiščenja.	40
Slika 19: Skupni antioksidanti (ekvivalent klorogenske kisline (mmol/l)) v osmih raztopinah jabolčnega soka iz 1. embalažne enote.....	41
Slika 20: Kinetika razpada askorbinske kisline (% glede na začetno koncentracijo) v raztopinah jabolčnega soka (JS+AA ⁽¹⁾ , JS+I+AA ⁽²⁾ , JS+ Cu^{2+} +AA ⁽³⁾ in JS+ Cu^{2+} +I+AA ⁽⁴⁾) iz 3. embalažne enote z dodano askorbinsko kislino (AA).....	43

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izkoristki pri pripravi izmenjevalcev.

Priloga B: Deleži vezanih Cu^{2+} iz vodnih raztopin na pšenične otrobe, sprane z vodo ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$); pšenične otrobe, obdelane z NaOH ($\text{PO}+\text{NaOH}$); pšenične otrobe sprane z vodo in modificirane s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$); pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$); pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$) in pšenične otrobe, dehidrirane s H_2SO_4 ($\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$), pri različnih pH.

Priloga C: Povprečje in standardni odklon izmerjenih pH-jev v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, spranih z vodo ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$); pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH ($\text{PO}+\text{NaOH}$); pšeničnih otrobov spranih z vodo in modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$); pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$); pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$) in pšeničnih otrobov, dehidriranih s H_2SO_4 ($\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$), po stresanju.

Priloga D: Deleži vezanih Cu^{2+} iz vodnih raztopin na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$), pri različnih časih.

Priloga E: Povprečni pH raztopin po stresanju pri kinetiki vezave Cu^{2+} na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$).

Priloga F: Povprečje nevezanih Cu^{2+} v raztopinah pri kapaciteti vezave Cu^{2+} pri pšeničnih otrobih, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšeničnih otrobih, modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$).

Priloga G: Povprečni pH raztopin po stresanju pri kapaciteti vezave Cu^{2+} pri pšeničnih otrobih, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšeničnih otrobih, modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$).

Priloga H: pH raztopin po stresanju pri vezavi majhnih koncentracij Cu^{2+} z različnimi koncentracijami pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$).

Priloga I: pH raztopin po stresanju jabolčnega soka iz 1. embalažne enote brez dodatkov (JS), z dodatkom izmenjevalca (JS+I), z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I).

Priloga J: pH raztopin po stresanju jabolčnega soka iz 2. embalažne enote brez dodatkov (JS), z dodatkom izmenjevalca (JS+I), z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I).

Priloga K: pH raztopin po stresanju jabolčnega soka iz 3. embalažne enote brez dodatkov (JS), z dodatkom izmenjevalca (JS+I), z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I).

Priloga L: Barvni spekter raztopin jabolčnega iz 2. embalažne enote z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in brez dodatkov (JS) (začetni, 3. in 11. dan).

Priloga M: Diferenčni graf raztopin jabolčnega soka iz 2. embalažne enote z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in brez dodatkov (JS) (razlika absorbanc tretjega in začetnega dneva ter enajstega in začetnega dneva).

Priloga N: Skupni antioksidanti (ekvivalent klorogenske kisline (mmol/l)) raztopin jabolčnega soka iz 2. embalažne enote v preglednici in sliki.

Priloga O: Kinetika razpada askorbinske kisline (% glede na začetno koncentracijo) v raztopinah jabolčnega soka iz 3. embalažne enote z dodano askorbinsko kislino (AA) (JS+AA⁽¹⁾, JS+I+AA⁽²⁾, JS+ Cu^{2+} +AA⁽³⁾ in JS+ Cu^{2+} +I+AA⁽⁴⁾).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	askorbinska kislina
AAS	atomska absorpcijska spektrometrija
CA	citronska kislina
JS	jabolčni sok
JS+AA	jabolčni z dodatkom askorbinske kisline
JS+ Cu^{2+}	jabolčni sok z dodatkom Cu^{2+}
JS+ Cu^{2+} +AA	jabolčni sok z dodatkom Cu^{2+} in askorbinske kisline
JS+ Cu^{2+} +I	jabolčni sok z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca
JS+ Cu^{2+} +I+AA	jabolčni sok z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline
JS+I	jabolčni sok z dodatkom izmenjevalca
JS+I+AA	jabolčni z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline
F-C reagent	Folin-Ciocalteaujev reagent
konc.	koncentracija
PO+CA	pšenični otrobi, modificirani s citronsko kislino
PO+ H_2SO_4	pšenični otrobi, dehidrirani s H_2SO_4
PO+ H_2O	pšenični otrobi, sprani z vodo
PO+ H_2O +CA	pšenični otrobi, sprani z vodo in modificirani s citronsko kislino
PO+NaOH	pšenični otrobi, obdelani z NaOH
PO+PO+NaOH+CA	pšenični otrobi, obdelani z NaOH in modificirani s citronsko kislino
PP	polipropilen

1 UVOD

Redoks aktivni kovinski ioni v živilih vplivajo na njihovo prehransko vrednost, saj so potrebni za normalno delovanje organizma. Najpomembnejši vir ionov, kot sta baker in železo, so živila živalskega izvora. V rastlinskih živilih je njihova vsebnost največkrat manjša in ob normalni prehrani prispeva le manjši delež k skupni zaužiti količini (Otten in sod., 2006). Kljub relativno majhni vsebnosti imajo redoks aktivni ioni velik vpliv na kvaliteto živil rastlinskega izvora, saj vstopajo v redukcijsko oksidacijske reakcije z antioksidanti, kot so polifenoli in askorbinska kislina (AA). Cu^{2+} , prisotni v različnih živilih, pospešijo oksidacijo AA in polifenolov ter tako posredno zmanjšujejo prehransko vrednost med shranjevanjem (Belitz in Grosch, 1999; Parkin in Damodaran, 2003).

Ena od metod odstranjevanja Cu^{2+} iz vodnih raztopin je uporaba različnih ionskih izmenjevalcev. Med drugimi bi lahko za odstranjevanje uporabljali tudi rastlinske odpadke živilsko predelovalne industrije, ki jih ni mogoče uporabiti v prehrani ljudi in so zato relativno poceni. Ustrezno obdelane odpadne surovine pri predelavi različnih živil bi se lahko uporabilo za vezavo kovinskih ionov iz industrijskih odplak (Ahmedna in sod., 2003; Marshall in sod., 1998; Ravat in sod., 1999). Prav tako bi jih lahko uporabili v živilski industriji za odstranjevanje neželenih kovinskih ionov iz npr. sadnih sokov in s tem pozitivno vplivali na kemično stabilnost živila.

1.1 CILJI DELA

- Pripraviti ustrezne ionske izmenjevalce iz pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (CA) in H_2SO_4 .
- Testirati, kako vpliva pH na učinkovitost ionskih izmenjevalcev v modelnih raztopinah.
- Pri izmenjevalcih, ki so bili najbolj učinkoviti pri nižjih vrednostih pH, testirati, kako vpliva koncentracija Cu^{2+} , količina dodanega ionskega izmenjevalca, prisotnost dodanih Ca^{2+} in prisotnost dodane CA na njihovo učinkovitost.
- Uporabiti najbolj učinkovit ionski izmenjevalec za zmanjšanje koncentracije Cu^{2+} v jabolčnem soku.
- Ugotoviti, ali uporaba ionskega izmenjevalca vpliva na barvo ter na skupno antioksidativno aktivnost jabolčnega soka med shranjevanjem.
- Ugotoviti, ali uporaba ionskega izmenjevalca vpliva na stabilnost AA v jabolčnem soku.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bomo z obdelavo pšeničnih otrobov s CA in s H_2SO_4 ter z naknadnim spiranjem z vodo uspeli pripraviti ionske izmenjevalce, ki bodo imeli veliko afiniteto do Cu^{2+} ionov. Znano je, da učinkovitost izmenjevalcev pada s pH, zato bomo le-te testirali v območju od pH 3 do pH 6 in tako ugotovili, ali so ti primerni tudi za uporabo pri relativno nizkem pH.

Predvidevamo, da bomo z uporabo ustreznega ionskega izmenjevalca uspeli odstraniti del Cu^{2+} iz jabolčnega soka.

Pričakujemo, da bo uporaba ionskega izmenjevalca vplivala na barvo ter na skupno antioksidativno aktivnost jabolčnega soka med shranjevanjem.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKER (*cuprum*)

Latinska beseda *cuprum* izvira iz imena Cipra, (latinsko *Cyprium*), kjer so bila v antičnih časih velika nahajališča bakrove rude.

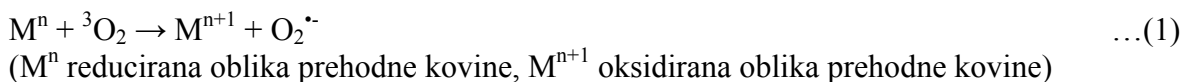
Baker spada v 1. (stransko) skupino periodnega sistema (prehodne kovine). Najpomembnejši oksidacijski števili sta + 1 in + 2. Ion Cu^{3+} je obstojen le v redkih koordinacijskih spojinah. Bakrove (II) spojine so obstojne v vodnih raztopinah. Iz vodnih raztopin se lahko izkristalizirajo modro obarvane soli z različnimi anioni ali pa koordinacijske spojine. Bakrove (I) spojine pa v vodnih raztopinah disproporcionirajo v bakrove (II) spojine in baker. Bakrove (I) spojine oksidira kisik v bakrove (II) spojine. Bakrov (I) ion tvori številne koordinacijske spojine, ki so obstojnejše od bakrovih (II) koordinacijskih spojin (Lazarini in Brenčič, 1989).

Preglednica 1: Lastnosti bakra (Lazarini in Brenčič, 1989).

	Cu
vrstno število	29
relativna atomska masa	63,54
elektronska konfiguracija	$4s^1 3d^{10}$
elektronegativnost (Alred- Rochow)	1,75
ionski radij M^+ (Å)	0,77
tališče (°C)	1083
vrelišče (°C)	2350
gostota (g/cm^3)	8,92

2.1.1 Baker kot katalizator pri reakcijah nastajanja prostih radikalov

Cu^{2+} kot prehodne kovine sodelujejo kot katalizatorji pri reakcijah nastajanja prostih radikalov. Lahko sodelujejo v redoks reakciji pri pretvorbi kisika v tripletnem stanju ($^3\text{O}_2$) v singletni kisik (Parkin in Damodaran, 2003):



Singletni kisik lahko sproži reakcije oksidacije. Reagira lahko z mnogimi organskimi molekulami ob nastanku peroksidov in drugih oksidiranih produktov, vendar je dokaj selektiven in reagira predvsem z molekulami z dvojnimi vezmi (karotenoidi, klorofil, maščobne kisline) (Cigič in Rudan Tasič, 2006).

Prehodne kovine lahko porušijo zgradbo lipidnih hidroperoksidov (LOOH) (enačba 2). Nastali aloksi radikali (LO^\bullet) pa lahko povzročijo nadaljnje oksidacije.



Ioni prehodnih kovin lahko sodelujejo pri pretvorbah aktivnih oblik kisika kot v Haber-Weiss reakciji:



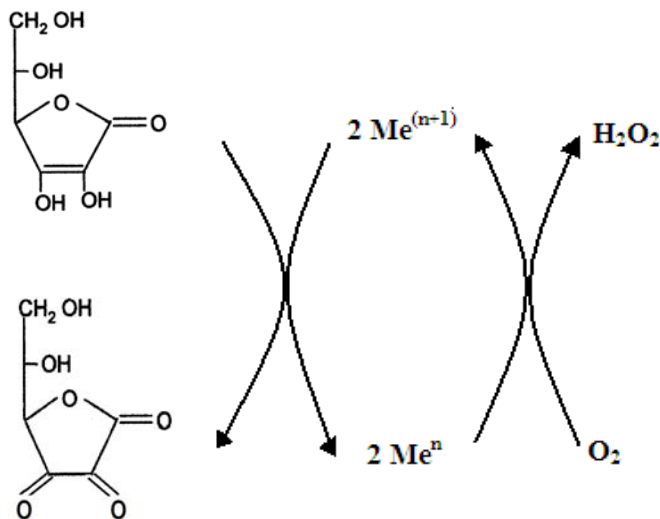
V tej reakciji lahko ioni prehodnih kovin posredujejo s tremi delnimi reakcijami:



V zadnji reakciji (Fentonova reakcija) reduciran ion prehodne kovine donira elektron vodikovemu peroksidu (H_2O_2) in nastane zelo reaktiven hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$). Ponovno oksidiran ion prehodne kovine lahko ponovno sodeluje v ciklu treh delnih reakcij (Parkin in Damodaran, 2003). Hidroksilni radikali zaradi svoje velike reaktivnosti neselektivno reagirajo z okolico (sladkorji, aminokislinami, fosfolipidi, npr. lecitin, nukleotidi, organskimi kislinami) (Cigić in Rudan Tasič, 2006).

2.1.2 Vpliv bakra na oksidacijo askorbinske kisline in polifenolov v živilih

AA se v aerobnih razmerah oksidira v dehidroaskorbinsko kislino. Prisotnost Cu^{2+} pa to reakcijo pospeši (Belitz in Grosch, 1999). Na sliki 1 vidimo princip oksidacije AA v prisotnosti ionov prehodnih kovin kot katalizatorjev. Dehidroaskorbinska kislina je zelo dovzetna za neencimske reakcije porjavenja, ki vodijo do obarvanja, v nekaterih primerih pa tudi do motnosti raztopin. Treoza, razpadni produkt AA, sodeluje v reakcijah porjavenja Maillard-ovega tipa. Reagirala naj bi z dušik vsebujočimi molekulami, kot so aspartam, niacin in pantotenska kislina. Nastali produkti lahko prav tako povzročijo obarvanje in motnost raztopin (Morello in Franz, 2005).



Slika 1: Princip oksidacije askorbinske kisline v dehidroaskorbinsko kislino ob prisotnosti ionov prehodnih kovin, Me (Me^n reducirana oblika prehodne kovine, Me^{n+1} oksidirana oblika prehodne kovine), kot katalizatorjev (Belitz in Grosch, 1999).

Polifenoli so znani kot antioksidanti in en način antioksidativnega delovanja je keliranje ionov prehodnih kovin. Zelo dober kelator je kvercetin (Murkovič, 2003), ki je prisoten tudi v lupini jabolk ($(62,3 \pm 11,4)$ mg/100g svežega sadja) (Hagen in sod., 2007). Ko fenoli vežejo ione prehodnih kovin, se ti reducirajo in v takšni obliki so bolj aktivni pri katalizi razpada hidroperoksidov v proste radikale, kar poveča oksidativne reakcije (Paiva-Martins in sod., 2006). Polifenoli v sadnih produktih se s časom spreminjajo v reakcijah oksidacij in polimerizacij, ki med drugim vodijo tudi do porjavenja. V modelnih raztopinah so ugotovili (Es-Safi in sod., 2003; Gülşen in sod., 2007), da je nastajanje pigmentov ob prisotnosti Cu^{2+} potekalo intenzivneje in v drugačnih obsegih. Gülşen in sod. (2007) so oksidirali kvercetin v prisotnosti Cu^{2+} in odkrili, da je novonastali produkt derivat benzofuranona, ki je imel v dveh od treh testov za določanje antioksidativne aktivnosti, boljše rezultate kot sam kvercetin. Ocenili so, da oksidacija v prisotnosti Cu^{2+} poteka do določene mere v isti smeri kot encimska oksidacija. Es-Safi in sod. (2003) so v modelnih raztopinah (+)-katehina v 20 % v/v alkohola spremljali oksidacijo ob prisotnosti Cu^{2+} . Ugotovili so, da je prisotnost Cu^{2+} pospešila porjavenje raztopin, nastali pigmenti pa so imeli absorpcijski maksimum pri 440-460 nm. V kontrolnih raztopinah brez dodatka Cu^{2+} je večina nastalih pigmentov imela absorpcijski maksimum pri 385 nm. Analize na HPLC so pokazale, da so kontrolne raztopine poleg produktov, ki so nastajali tudi v prisotnosti Cu^{2+} , vsebovale druge produkte, kar je nakazovalo, da so v raztopinah brez prisotnosti Cu^{2+} potekale drugačne reakcije. Piva in sod. (2008) so spremljali spremembe grozdnega mošta med kuhanjem pri 95 °C. Mošt, ki so ga kuhali v bakrenem kotlu, je vseboval več Cu^{2+} (1.33 mg/l) kot mošt, kuhan v nerjavečem jeklenem kotlu (0,91 mg/l). Slednji je po kuhanju vseboval več skupnih fenolov kot mošt, ki je bil kuhan v bakrenem kotlu.

2.1.3 Baker v živilih

Vsebnost bakra v živilih je odvisna od samega živila, od kraja in načina pridelave ter predelave hrane. Razlike v vsebnosti so lahko posledica sestave zemlje, tipa gnojila in drugih agrikolturnih kemikalij, vremena, časa žetve in nadaljnjega procesiranja. Najvišje koncentracije bakra se nahajajo v jetrih, stročnicah, orehih in lupinarjih. Odstranitev kalčka in otrobov pri čiščenju moke zniža vsebnost bakra v žitnih živilih.

V pitni vodi koncentracije bakra kar precej nihajo in so odvisne od vsebnosti mineralov, pH-ja in od tega, ali so vodovodne cevi bakrene. Voda s kislim pH deluje korozivno in lahko topi baker iz bakrenih cevi (Barberá in sod., 2003).

Preglednica 2: Vsebnost bakra v živilih (Barberá in sod., 2003).

živilo	vsebnost bakra (mg/kg)	živilo	vsebnost bakra (mg/kg)
sir	0,4-0,8	koruza	0,1-0,4
kravje mleko	0,02-0,08	makaroni (kuhani)	0,6-1
jajca	0,4-0,8	fižol (kuhan ali pečen)	1-4
morski rakci	2-3	kikiriki (svež ali pražen)	3-10
jabolka (rdeča, z olupkom, surova)	0,1-0,4	meso mišic (kuhano: govedina, svinjina ali perutnina)	0,7-1,4
jabolčni sok (konzerviran)	0,02-0,2	jetra (kuhana: govedina, svinjina ali perutnina)	20-180
grozdje (črno ali zeleno, surovo)	0,4-1,4	orehi in semena (mandlji, brazilski oreščki, lešniki, oreh, pistacija ali semena sončnic)	8-18
grozdni sok (konzerviran)	0,01-0,13	zelje (sveže ali kuhano)	0,1-0,2
pomaranča (surova, vseh vrst)	0,1-1	korenje (surovo ali kuhano)	0,5-1
pomarančni sok	0,2-0,3	krompir (pečen z olupkom)	0,6-1,8
suho sadje (rozine, dateljni, fige ali slive)	1-5	krompir (kuhan, brez olupka)	0,3-1
bel kruh	1-1,2	špinača (konzervirana, sveža, zmrznjena ali kuhana)	0,6-1,2
kruh iz polnozrnate moke	2-3	paradižnik (surov, konzerviran ali v soku)	0,3-1,4

2.1.3.1 Baker v prehrani in metabolizmu človeka

Baker spada v skupino esencialnih mineralov v sledovih. Je komponenta (kofaktor) številnih oksidoreduktaznih encimov kot so: citokrom c-oksidaža, ki je pomembna kot terminalni encim v transportni verigi elektronov pri mitohondrijski respiraciji; superoksid dismutaza z močnim antioksidativnim mehanizmom; tirozianaza, ki je pomembna pri sintezi melanina; dopamin B-hidroksilaza, ki je potrebna pri sintezi kateholamina; lizil oksidaza, ki je odgovorna za povezave med kolagenom in elastinom... V krvni plazmi je vezan na ceruloplazmin, ki katalizira oksidacijo Fe^{2+} v Fe^{3+} . To je pomembna reakcija saj je Fe^{3+} dostopen proteinu transferinu, ki ga prenese v jetra (Belitz in Grosch, 1999; Xu in sod., 2005). Pomanjkanje bakra pri človeku je redko (Otten in sod., 2006). Premajhen vnos bakra lahko povzroči hipokromno mikrocitarno anemijo ob enem visoki koncentraciji železa v jetrih. Nadaljnji simptomi pomanjkanja so: levkocitopenija, granulocitopenija, pojavljanje zlomov kosti zaradi osteoporoze, spontane rupture žil in anavrizme zaradi motene sinteze kolagena in elastina, zmanjšana pigmentacija las in kože in v napredovalnem stadiju nevrološke motnje. Izgube krvi so vedno povezane tudi z izgubljanjem bakra. Ocenjena vrednost za primeren vnos bakra pri mladostnikih in odraslih je 1,0-1,5 mg bakra/dan (Referenčne vrednosti..., 2004).

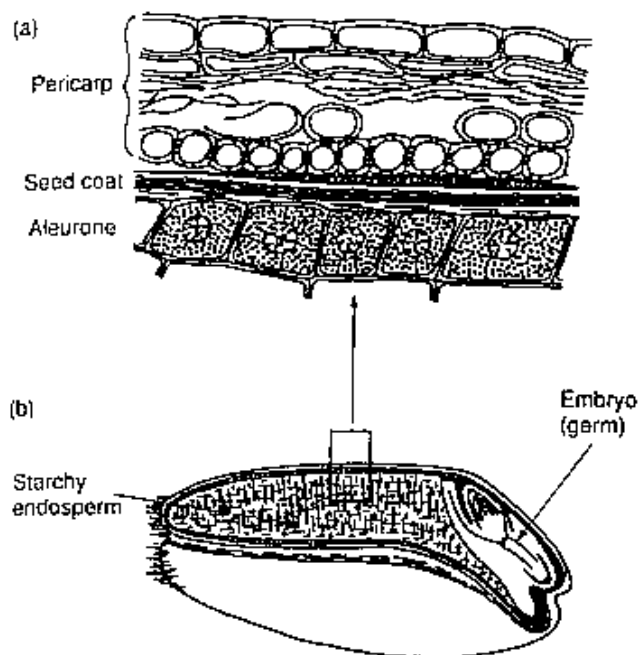
2.1.3.2 Toksičnost bakra

Previsoki vnosi bakra so lahko toksični. Akutna toksičnost pri ljudeh je redka in je običajno posledica slučajnega ali namernega zaužitja bakrovih soli. Simptomi so slinjenje, slabost, bljuvanje, bolečine v požiralniku in diareja. V Indiji so znani primeri kronične izpostavljenosti višjim vnosom bakra. Izpostavljeni so bili otroci, ki so jim matere

pogrevale mleko v bakrenih ali bronastih loncih. Simptomi so bili napihovanje trebuha, neenakomerna telesna temperatura, prekomerno jokanje in motnje v apetitu. Brez zdravljenja je bolezen v nekaj mesecih hitro napredovala in lahko končala z odpovedjo jeter in smrtjo. Vzrok za prekomerno zaužije bakra je lahko pitna voda, ki, če je kislá, deluje korozivno na bakrove cevi. Prekomerno uživanje bakrovih prehranskih dodatkov lahko tudi deluje toksično. Za določitev varne zgornje meje zaužitja bakra je bilo narejenih premalo raziskav (Barberá in sod., 2003; Xu in sod., 2005).

2.2 PŠENIČNI OTROBI

Otrobi so zunanji plašč ovojnice semena. Sestavljeni so iz perikarpa, semenskega ovoja in aleuronske plasti. Otrobi predstavljajo 15 % celega pšeničnega zrna (Zitterman, 2003).



Slika 2: (a) dolžinski prerez otrobnih plasti (perikarp, semenski ovoj, aleuronska plast); (b) dolžinski prerez pšeničnega zrna (Zitterman, 2003).

2.2.1 Kemijska sestava

Sestava otrobov je odvisna od različnih faktorjev: vrste in sorte žita, zrna (velikost, oblika, zrelost, velikost kalčka, debelina zunanjih plasti), časa skladiščenja žita, sistema procesiranja v mlinu, tipa moke... V preglednici 3 je kemijska sestava pšeničnih otrobov. Večina proteinov se nahaja v aleuronski plasti. Celične stene otrobov vsebujejo celulozo, necelulozne polisaharide in lignin. Lignoceluloza in netopni arabinoksilani (hemiceluloza) sestavljajo večino zrele celične stene, semenski ovoj pa vsebuje še kutin (tridimenzionalni poliester), ki ima podobne lastnosti kot lignin. Na celične stene je vezana tudi ferulična kislina, ki je glavni predstavnik fenolnih kislin v otrobih. Otrobi lahko vsebujejo še topne

arabinoksilane in β -glukane. Slednje najdemo predvsem v aleuronski plasti. Pomembna sestavina otrobov je fitinska kislina (heksafosfat mio-inozitola), ki predstavlja kar 5 % mase pri pšeničnih otrobih (Zitterman, 2003). Večinoma je prisotna v obliki K^+ , Mg^{2+} ter Ca^{2+} soli in se med zorenjem akumulira v semenih (Konietezug in Greiner, 2003). Fitinska kislina je močen kelator pozitivno nabitih multivalentnih kovin. Lahko jo hidrolizira encim fitaza, ki se pri pšeničnih otrobih nahaja predvsem v aleuronski plasti (Zitterman, 2003).

Preglednica 3: Kemijska sestava pšeničnih otrobov (Zitterman, 2003).

pšenični otrobi	g/100g suhe teže
proteini	13-18
maščobe	3-6
pepel	6-7
vlaknine	35-58
topne vlaknine	2-5
netopne vlaknine	32-53
celuloza	6-12
hemiceluloza	19-31
lignin	2-8

2.2.2 Uporabnost

Otrobe, kot stranski produkt pri mletju moke, se večinoma uporablja za živalsko krmo, nekaj pa tudi za živila kot so žitni zajtrki (kosmiči, mussli) in žitne izdelke z visoko vsebnostjo vlaknin (Dexter in Sarkar, 2003). Obstajajo tudi tablete iz pšeničnih otrobov za prehranske namene (Zitterman, 2003).

2.3 KATIONSKE IZMENJEVALCI

Ionski izmenjevalci so netopni materiali, ki imajo kovalentno vezane nabite skupine. Nabite skupine izmenjujejo mobilne ione z nasprotnim nabojem (counter-ions), pri tem pa izmenjevalec ne spremeni svoje strukture (DuHamel in Graczyx, 1997; Amersham Biosciences, 2008). Kationski izmenjevalec nosi negativno nabite funkcionalne skupine, ki izmenjujejo katione (Zagorodni, 2007).

Princip ionske izmenjave pri kationskem izmenjevalcu:



Črta nad znaki v enačbi 7 in 8 nakazuje izmenjevalec. R v enačbah je strukturna enota izmenjevalca z eno funkcionalno skupino. Kationski izmenjevalec z Na^+ ioni v raztopini s K^+ ioni zamenja Na^+ s K^+ (7). Lahko pa se izmenjujejo kationi z drugačnim nabojem:



Za vezavo Ca^{2+} sta potrebni dve funkcionalni skupini (8) (Zagorodni, 2007).

Funkcionalne skupine so nabite kisle, bazične ali kelirajoče skupine, ki so vezane na polimerni matriks izmenjevalca. Naboj vsake skupine je običajno kompenziran z izmenljivim ionom. Anorganski ionski izmenjevalci ne vsebujejo funkcionalnih skupin.

Osnovne celice njihove kristalične strukture predstavljajo nabita mesta katerih naboji nadomeščajo izmenljive ione. Funkcionalni predeli so širši izraz kot funkcionalne skupine. Vključujejo vezane skupine, nabite atome vključene v polimernih verigah, nabita mesta v kristaličnih strukturah anorganskih ionskih izmenjevalcev...(Zagorodni, 2007). Primeri funkcionalnih skupin za kationske izmenjevalce so podani v preglednici 4.

Preglednica 4: Primeri funkcionalnih skupin za kationske izmenjevalce. V oklepajih so navedene vrednosti pKa (Zagorodni, 2007).

negativno nabite skupine pri kationskih izmenjevalcih	
$-\text{SO}_3^- (\leq 1)$	$-\text{PO}_3^{2-} (2,0-4,5; 6,5-9,5)$
$-\text{COOH} (3,5-8)$	$-\text{HPO}_2$
$-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} (\approx 10)$	$-\text{SH} (> 10)$
$-\text{AsO}_3$	$-\text{SeO}_3$

Glede na različne lastnosti disociacije skupin poznamo močne in šibke izmenjevalce podobno kot močne in šibke elektrolite. Npr. kisline, ki se popolnoma ionizirajo v vodni raztopini, so močne. Tako je funkcionalna skupina $-\text{SO}_3\text{H}$, kot analog žveplove kisline, popolnoma ionizirana v raztopini. Ionski izmenjevalci, ki nosijo te skupine, so močni kationski izmenjevalci. Pod šibke ionske izmenjevalce pogosto upoštevamo materiale z obsegi delovnih pH-jev, kar pomeni, da lahko izmenjujejo ione samo v pH območjih kjer se ionizirajo njihove funkcionalne skupine. Sem spadajo tudi izmenjevalci s karboksilnimi funkcionalnimi skupinami ($-\text{COO}^-$) (Zagorodni, 2007).

2.3.1 Tipi izmenjevalcev

Od prve uporabe naravnih in sintetičnih anorganskih izmenjevalcev je sledilo konstanto izboljšanje materialov za ionske izmenjevalce. Žveplan premog, izmenjevalci na bazi stirenov, fenolni in akrilni tipi izmenjevalcev so nekateri izmed materialov, ki so bili razviti za kationsko izmenjavo (Ion exchange processes, 1998).

2.3.1.1 Naravni ionski izmenjevalci

Naravni anorganski ionski izmenjevalci

Veliko naravnih mineralov, kot so gline (npr. bentonit) in zeoliti (npr. klinoptilolit), je sposobnih izmenjave ionov. Kristalni aluminosilikati so najbolj pogosti minerali s kationsko izmenjevalnimi lastnostmi. Zeoliti imajo odprto tridimenzionalno ogrodje s porami (kanali) in medsebojno povezane luknje v aluminosilikatni mreži. Gline imajo bolj rahlo plastno strukturo (Inglezakis in Pouloupoulos, 2006).

Slabosti naravnih anorganskih izmenjevalcev so:

- majhna kapaciteta izmenjave,
- kratka mehanska dolgotrajnost,
- majhna odpornost na razjedanje,
- velikost por se ne more prilagoditi,
- glineni minerali se nagibajo k preoblikovanju v koloidno obliko,
- lahko se delno razgradijo v kisline in baze (Inglezakis in Pouloupoulos, 2006).

Kot dobra kationska izmenjevalca sta se izkazala kalcijev in magnezijev karbonat (CaCO_3 , MgCO_3). Iz destilirane žgane pijače iz sladkornega trsa sta učinkovito vezala Cu^{2+} (Almeida Neves in sod., 2007).

Naravni organski ionski izmenjevalci

- polisaharidi (celuloza, šota)
- proteini (kazein, keratin, kolagen)
- ogljikovi materiali (ogljje, ligniti, premog)

V industrijske namene se uporablja samo ogljje, premog, lignit in šoto. Niso tako učinkoviti kot sintetični organski izmenjevalci, so pa cenejši.

Slabosti naravnih organskih izmenjevalcev:

- majhna kapaciteta izmenjave,
- nagibajo se k nabrekanju in preoblikovanju v koloidno obliko,
- imajo rahlo fizično strukturo,
- njihove fizične lastnosti niso poenotene,
- niso selektivni,
- so pH-občutljivi (Inglezakis in Pouloupoulos, 2006).

2.3.1.2 Sintetični ionski izmenjevalci

Sintetični anorganski ionski izmenjevalci

Zeoliti- Prednost pred naravnimi zeoliti je ta, da se lahko proizvajajo s široko raznovrstnostjo fiziokemičnih lastnosti. Njihove slabosti so:

- visoka cena v primerjavi z naravnimi zeoliti,
- pH-senzibilnost,
- omejena mehanska stabilnost.

Titanati in siliko-titanati- Oksidi in hidroksidi titana so učinkoviti pri odstranjevanju kovinskih ionov iz vod.

Heksacianoferati prehodnih kovin- Te kovine so zelo učinkovite v ekstrahiranju radioaktivnega cezija iz raztopin (Inglezakis in Pouloupoulos, 2006).

Sintetični organski ionski izmenjevalci

Sintetične organski izmenjevalci so danes največja razpoložljiva skupina ionskih izmenjevalcev. Matriks teh ionskih izmenjevalcev je tridimenzionalna polimerna struktura iz ogljikovodikov, na katero so običajno vezane nabite skupine ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2\dots$). Nabite skupine so lahko tudi vključene v polimerne verige (npr. $-\text{NH}-$). Najpogosteje so v uporabi izmenjevalci iz stiren-divinilbenzena zaradi njihove mehanske in kemične stabilnosti. Široko v uporabi so tudi kopolimeri fenola s formaldehidom ter poliakrila ali polimetakrila z divinilbenzenom (Zagorodni, 2007). Glavne prednosti teh izmenjevalcev so:

- velika kapaciteta izmenjave,
- široka uporabnost,
- so cenejši v primerjavi z nekaterimi sintetičnimi anorganskimi mediji (Inglezakis in Pouloupoulos, 2006).

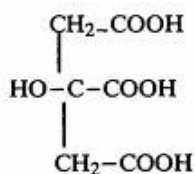
2.3.2 Kationski izmenjevalci iz odpadnih rastlinskih materialov

Za odstranjevanje težkih kovin iz vodnih raztopin je poznanih več metod: ionska izmenjava, kemično usedanje, membranska filtracija, adsorpcija... Odstranjevanje težkih kovin je predvsem potrebno v industrijskih odplakah in kontaminiranih vodah. Filtrni sistemi z aktivnim ogljem in drugimi ionskimi izmenjevalci so široko v uporabi za vezavo težkih kovin v sledovih, vendar so neučinkoviti v popolnem odstranjevanju rizičnih kontaminantov in predvsem dragi. Kot poceni alternativo zadnja leta raziskujejo na izmenjevalcih iz rastlinskih odpadnih materialov, saj je rastlinskih odpadnih materialov v obilju in so lahko dosegljivi. Sorpcijsko kapaciteto teh materialov se lahko izboljša s kemijskimi modifikacijami (Low in sod., 2004; Ahmedna in sod., 2004).

Ahmeda in sod. (2004) so iz orehovich (ameriški oreh, laški oreh in mandelj) lupin, aktiviranih s fosforno kislino in obdelanih s paro, naredili naravne filtre in jih primerjali s komercialnimi filtri za čiščenje vode v vezanju bakrovih, svinčevih in cinkovih ionov iz vodnih raztopin. Najbolj učinkoviti so bili filtri iz mandljevih lupin, aktiviranih s fosforno kislino in orehovich (ameriških ali laških) lupin, aktiviranih s paro, ki so v razmerju 1:1 vezali veliko bolje kot posamezno, kar je nakazovalo na sinergistični učinek teh materialov. V razmerju 1:1 so iz vodne raztopine z začetno koncentracijo kovin 3,0 ppm ($\mu\text{g/g}$) Cu^{2+} , 0,150 ppm Pb^{2+} in 10,0 ppm Zn^{2+} , vezali skoraj 100 % svinca, 90-95 % bakra in 80-90 % cinka. Koncentracija filtra je bila 120 g/l vodne raztopine. Pripravljeni filtri so bili z manjšo koncentracijo izmenjevalca na vodno raztopino enako učinkoviti kot komercialni filtri. Binarna zmes materialov, pripravljenih iz orehovich lupin, se je tako izkazala kot dober filter za majhne koncentracije težkih kovin.

Ravat in sod. (2000) so iz pšenični otrobov pripravili lignocelulozni ekstrakt za vezavo Cu^{2+} ionov iz vodnih raztopin. Pšenične otrobe so pri visoki temperaturi hidrolizirali s H_2SO_4 , nato pa obdelali s NaOH. Tako pripravljen lignocelulozni substrat je s koncentracijo 1 g/l iz raztopine z začetno koncentracijo Cu^{2+} 13,3 mg/l vezal pri pH 5,6 po 18 urah približno 66 % Cu^{2+} . Ugotovili so tudi, da na vezavo Cu^{2+} zelo vpliva pH, saj se z večanjem pH veča tudi vezava Cu^{2+} na substrat. Maksimum absorpcije je bil med pH 5 in pH 6. Z nižanjem koncentracije substrata se je višal pH največje absorpcije. Preverili so tudi, kako prisotnost Ca^{2+} vpliva na vezavo Cu^{2+} na substrat in ugotovili, da imajo Cu^{2+} ioni večjo afiniteto do lignoceluloznega substrata kot Ca^{2+} . Pri pH 6,5 so večali koncentracije Ca^{2+} , kar ni imelo večjega vpliv na vezanje Cu^{2+} na substrat.

Marshall in sod. (1999) so razvili metodo za izboljšavo vezave kovinskih ionov na sojine tropine. Sojine tropine so obdelali z NaOH in modificirali pri 120 °C za 90 min z raztopinami, ki so vsebovale različne koncentracije CA (0,1-1,2 mol/l) (slika 3). Pri taki temperaturi se CA spremeni v anhidrid, ki s hidrosilnimi skupinami polisaharidov tvori estrske vezi. Tako celulozni material dobi karboksilne funkcionalne skupine, kar poveča količino negativnega naboja in izboljša možnost vezanja Cu^{2+} (Low in sod., 2004).



Slika 3: Citronska kislina (Schröter in sod., 1993).

Pripravljene ionske izmenjevalce iz sojinih tropin so s koncentracijo 10 g/l v raztopini s 300 ali 600 mg/l Cu^{2+} pri pH 4,8 mešali 24 ur. Rezultati so pokazali, da je pri višji koncentraciji CA za modifikacijo, izmenjevalec vezal več Cu^{2+} . Kapaciteta vezave pri tropinah, modificiranih z 1,2 mol/l CA je bila ($155,1 \pm 4,4$) mg/g Cu^{2+} , medtem ko so luščine brez obdelave vezale ($20,4 \pm 1,6$) mg/g Cu^{2+} .

Z 0,6 mol/l CA so modificirali tudi lanene in bombažne netkane materiale (Marshall in sod., 2007). Modificirane materiale so pripravili v različnih razmerjih (100 % lan, lan/bombaž: 75/25, lan/bombaž: 50/50, 100 % bombaž) in jih s koncentracijo 10 g/l pri 300 ali 600 mg/l Cu^{2+} pri pH 4,8 mešali 24 ur. Najbolje se je izkazala kombinacija modificiranih materialov lan/bombaž: 75/25, ki je vezala ($73,7 \pm 3,8$) mg/g Cu^{2+} , nemodificirana kombinacija pa je vezala le 8,3 mg/g Cu^{2+} . Večje količine bombaža v materialih so zmanjšale absorpcijo Cu^{2+} . Avtorji so predpostavljali, da CA ni učinkovito reagirala z bombažem, ker naj bi vosek na neočiščenem bombažu oviral dostop CA do vlakna in posledično zmanjšal njeno reakcijo s celuloznimi komponentami.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

Pšenični otrobi

Pšenični otrobi: Mlinarstvo Kralj, Prešernova cesta 20, 1235 Radomlje

Jabolčni sok

Sok 1. embalažne enote: Mercatorjev 100 % jabolčni sok, polnjen 3. 10. 2007

Sok 2. embalažne enote: Mercatorjev 100 % jabolčni sok, polnjen 3. 10. 2007

Sok 3. embalažne enote: Mercatorjev 100 % jabolčni sok, polnjen 3. 10. 2007

Pribor in oprema

- mini sekljalnik Moulinex Y92
- sušilnik
- analitska tehtnica Mettler Toledo
- magnetni mešalnik
- Vibromix 104 EV
- centrifuga Centric 322B
- centrifugirke (1,5 in 2 ml)
- vodna kopel Julabo SW-21C
- štoparica
- filtri CA Milipore (0,45 μm)
- insulinske injekcije (1 ml)
- vakuumski rotacijski sušilnik Univapo 100H
- UV- Vis spektrofotometer Hewlett PaCAard
- atomski absorpcijski spektrometer Perkin Elmer 1100B
- tekočinski kromatograf z diodno matriko Agilent 1100

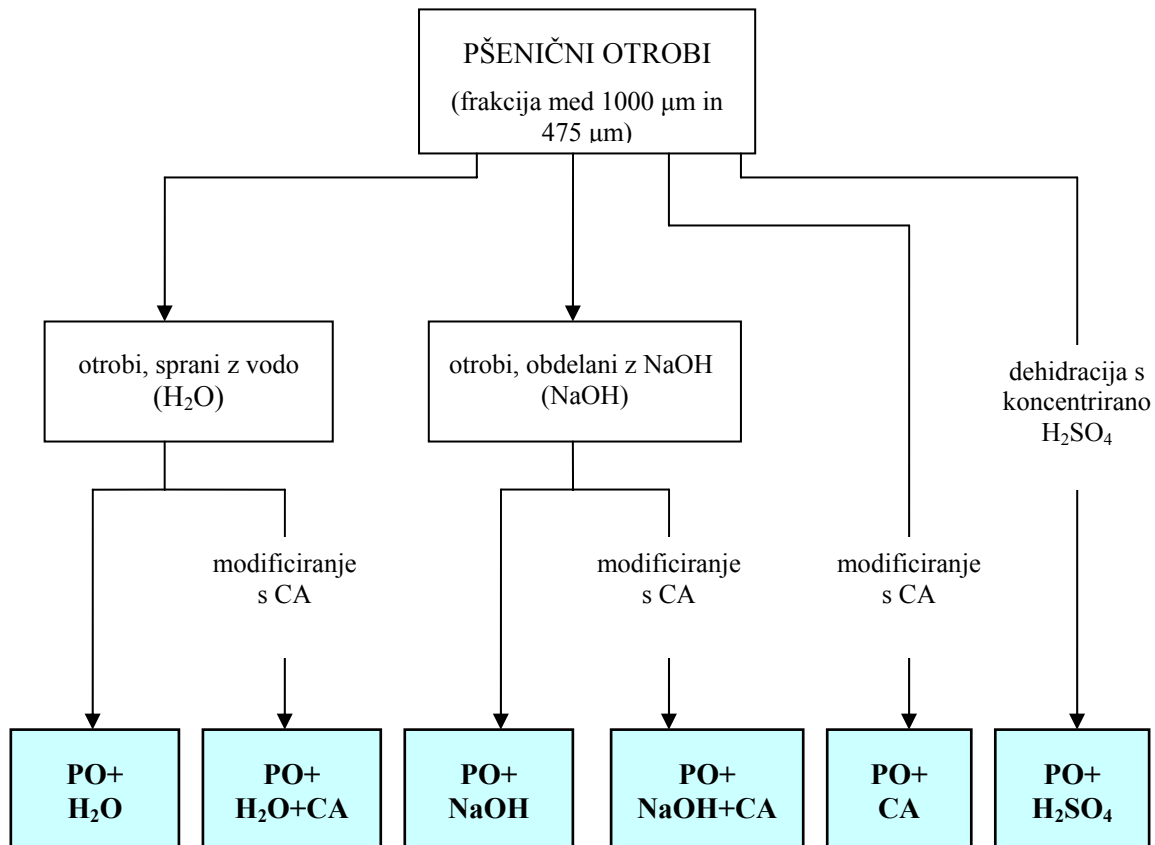
Reagenti in raztopine

- NaOH
- citronska kislina
- koncentrirana H_2SO_4
- acetatni pufri
- fosfatni pufri
- $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
- CaCl_2
- askorbinska kislina
- HCl
- Folin-Ciocalteaujev reagent
- Na_2CO_3
- metafosforna kislina

3.2 PRIPRAVA IZMENJEVALCEV

Izmenjevalce smo pripravili iz pšeničnih otrobov iz Mlinarstva Kralj. Da smo dobili manjše delce, smo pšenične otrobe zmleli v mini sekljalniku za živila. Ostanke moke in večje delce otrobov smo odstranili s presajanjem skozi siti za moko. Vzeli smo frakcijo med siti s premerom sitnih rež 1000 μm in 475 μm .

Slika 4 prikazuje shemo priprave izmenjevalcev iz pšeničnih otrobov.



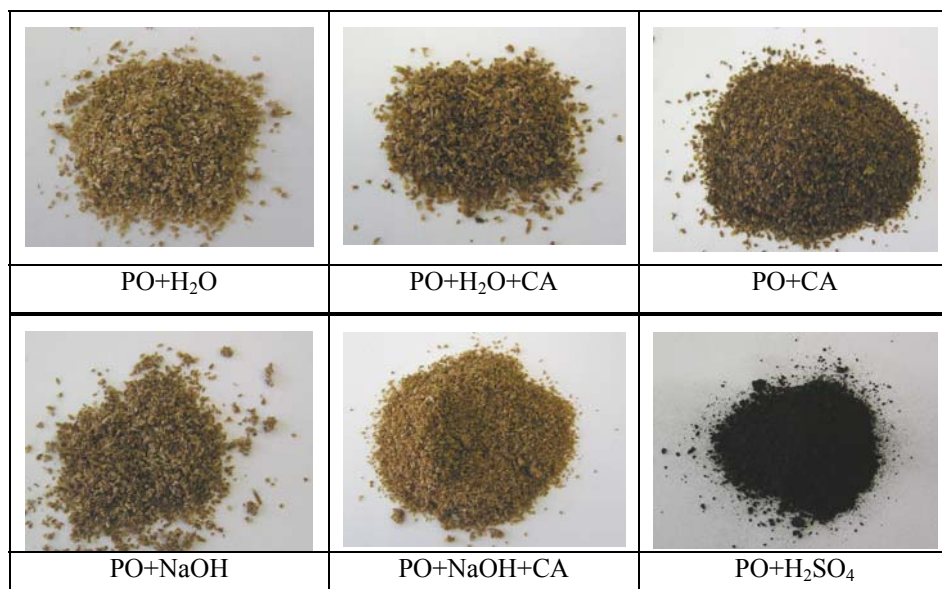
Slika 4: Shema priprave izmenjevalcev.

Priprava izmenjevalcev:

- **PO+H₂O**: Pšenične otrobe smo večkrat dekantirali z destilirano vodo pri sobni temperaturi in sušili v sušilniku.
- **PO+H₂O+CA**: Pšenične otrobe, sprane z vodo, smo mešali z 1 mol/l CA 40 minut pri sobni temperaturi ($m_{\text{otrobi}} [\text{g}] : V_{\text{CA}} [\text{ml}] = 1 : 7$). Nato smo jih dekantirali in sušili čez noč pri 50 °C. Posušene otrobe smo modificirali v sušilniku 90 minut pri 120 °C. Modificirane otrobe smo večkrat dekantirali z destilirano vodo, dokler ni bil pH dekantirane vode, ki ga smo ga merili s pH lističi, med pH 4 in pH 5. Otrobe smo sušili čez noč.
- **PO+CA**: Pšenične otrobe smo mešali z 1 mol/l CA 40 min pri sobni temperaturi. Razmerje in nadaljnji postopki so bili isti kot pri otrobih PO+H₂O+CA.

- **PO+NaOH:** Pšenične otrobe smo mešali z 1 mol/l NaOH 1 uro pri sobni temperaturi ($m_{\text{otrobi}} [\text{g}] : V_{\text{NaOH}} [\text{ml}] = 1 : 20$). Nastalo gosto zmes smo nato redčili z destilirano vodo in ločili sluz od otrobov skozi en sloj hidrofilne gaze. Zmes smo večkrat po manjših delih položili v en sloj gaze, zavili in stiskali, da se je izločila sluz. Otrobe smo nato večkrat dekantirali z destilirano vodo. Sledilo je stiskanje in spiranje otrobov z destilirano vodo skozi dva sloja hidrofilne gaze, dokler ni bil pH vode po spiranju, ki smo ga merili s pH lističi, blizu 7. Otrobe smo sušili čez noč.
- **PO+NaOH+CA:** Pšenične otrobe, obdelane z NaOH, smo mešali z 1 mol/l CA 40 minut pri sobni temperaturi. Razmerje in nadaljnji postopki so bili isti kot pri otrobih PO+H₂O+CA.
- **PO+H₂SO₄:** Koncentrirano H₂SO₄ smo po kapljicah ob mešanju dodajali pšeničnim otrobam spranim z vodo (sobna temperatura, digestorij, zaščita) ($m_{\text{otrobi}} [\text{g}] : V_{\text{H}_2\text{SO}_4} [\text{ml}] = 1 : 1,33$). Nastala je črna zmes, ki smo jo pustili čez noč v digestoriju. Zmes smo raztopili v destilirani vodi (po kapljicah, sobna temperatura, digestorij, zaščita) in spirali z destilirano vodo čez nučo, dokler ni bil pH vode po spiranju, ki smo ga merili s pH lističi, med pH 3 in pH 4. Nato smo še enkrat spirali z MQ vodo. Sušili smo čez noč v sušilniku.

Pšenične otrobe smo stehali na začetku in na koncu priprave izmenjevalca ter izračunali izkoristek (priloga A). Pri dekantiranju je prihajalo do manjših izgub. Večina izmenjevalcev je bila po sušenju prhka, zato je bilo boljše sušenje v sušilnikih brez ventilacije. Otrobe smo zaradi hitrejšega odparevanja sušili v odprtem sušilniku. Temperatura je bila konstantna 50 °C. Nekateri izmenjevalci so bili po sušenju zlepljeni v grudice, ki smo jih strli v terilnici, tako da so bili delci čim bolj homogeni. Na sliki 5 vidimo pripravljene izmenjevalce.



Slika 5: Pripravljene izmenjevalci iz pšeničnih otrobov (pšenični otrobi sprani z vodo (PO+H₂O); pšenični otrobi, sprani z vodo in modificirani s citrsko kislino (PO+H₂O+CA); pšenični otrobi, modificirani s citrsko kislino (PO+CA); pšenični otrobi, obdelani z NaOH (PO+NaOH); pšenični otrobi, obdelani z NaOH in modificirani s citrsko kislino (PO+NaOH+CA); pšenični otrobi, dehidrirani s H₂SO₄ (PO+H₂SO₄))

3.3 PRIPRAVA VZORCEV

Splošni pogoji:

- Izmenjevalce smo zatehtali na analitski tehtnici na 0,5 mg natančno.
- V erlenmajerice (sprane z MQ vodo) smo zatehtali MQ vodo.
- S pipeto smo dodali pufer.
- S pipeto smo dodali raztopino Cu^{2+} . Raztopino smo pripravili iz $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.
- Izmenjevalce smo stresli v erlenmajerice, premešali ter začeli meriti čas. Erlenmajerice smo zaprli s parafilmom in jih dali v stresalnik. Temperatura kopeli je bila 25 °C. Frekvenca stresanja 180 obratov/minuto je omogočala konstantno mešenje izmenjevalca v raztopini. Potrebno je bilo redno preverjanje, da otrobi niso obtičali v grlu erlenmajerice.
- Po stresanju smo izmerili pH raztopin in vzeli vzorec 2× po 1,5 ml v mikrocentrifugirke in jih zavrteli za 3 minute v centrifugi, da so se morebitni delci izmenjevalca posedli na dno. Če se je pojavila usedlina, smo s pipeto ločili vzorec od usedline v drugo mikrocentrifugirko.
- Vzorce smo do analize na ASS shranili v hladilniku.

Če ni drugače navedeno, smo vsak eksperiment izvedli dvakrat in iz vsake raztopine vzeli po en vzorec za meritve. Meritve smo tako delali v dveh paralelkah. Dobljenim podatkom smo določili aritmetično sredino in absolutno napako.

Preglednica 5: Primer priprave 100 ml in 50 ml vodne raztopine z izmenjevalci.

raztopina (ml)	100	50
izmenjevalec (mg)	100	50
10 g/l Cu^{2+} (μl)	200	100
1 mol/l pufer (ml)	5	2,5
MQ voda (g)	94,8	47,4

Za 100 ml vodne raztopine smo uporabljali 300 ml erlenmajerice, za 50 ml vodne raztopine pa 100 ml erlenmajerice (preglednica 5).

3.3.1 Vezava Cu^{2+} na pripravljene izmenjevalce iz pšeničnih otrobov

3.3.1.1 Vpliv pH na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalce

Območja pH, v katerih izmenjevalci najbolj vežejo Cu^{2+} , smo določili:

- pšeničnim otrobom, spranim z vodo ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$),
- pšeničnim otrobom, spranim z vodo in modificiranim s CA ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$),
- pšeničnim otrobom, modificiranim s CA ($\text{PO}+\text{CA}$),
- pšeničnim otrobom, obdelanim z NaOH ($\text{PO}+\text{NaOH}$),
- pšeničnim otrobom, obdelanim z NaOH in modificiranim s CA ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$),
- pšeničnim otrobom, dehidriranim s H_2SO_4 ($\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$).

Pogoji:

- 1 g/l izmenjevalec
- 20 mg/l Cu^{2+}
- 50 mmol/l pufer
- skupni volumen raztopin: 50 ml ali 100 ml
- čas stresanja 90 min
- dve paralelki

Vsak izmenjevalec smo testirali v naslednjih območjih pH:

- pH 3,25 (50 mmol/l fosfatni pufer)
- pH 3,6 (50 mmol/l acetatni pufer)
- pH 4,0 (50 mmol/l acetatni pufer)
- pH 5,0 (50 mmol/l acetatni pufer)
- pH 5,6 (50 mmol/l acetatni pufer)
- pH 6,7 (50 mmol/l fosfatni pufer)

Kot je napisano v splošnih pogojih (glej 3.3) smo raztopine zamešali, stresali in vzorčili.

3.3.1.2 Kinetika vezave Cu^{2+} na izmenjevalca

Na podlagi rezultatov vpliva pH na vezavo Cu^{2+} smo za nadaljnje eksperimente izbrali modificirane pšenične otrobe $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$ in $\text{PO}+\text{CA}$. Kinetiko vezave Cu^{2+} na izmenjevalca smo spremljali pri:

- pH 5,0, kjer sta izmenjevalca najbolj vezala Cu^{2+} ,
- pH 3,6, ki je zanimiv iz živilsko tehnološkega vidika,
- pH 6,7 pri izmenjevalcu $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$.

Pogoji:

- 1 g/l izmenjevalca
- 20 mg/l Cu^{2+}
- 50 mmol/l pufer
- skupni volumen raztopine: 100 ml
- časi vzorčenja: (5, 10, 20, 40, 90, 180, 360, 1440) min
- dve paralelki

Raztopine smo zamešali in stresali, kot je napisano v splošnih pogojih (glej 3.3). Da je vzorčenje imelo minimalen vpliv na razmerje otrobi : raztopina, smo delali samo s skupnim volumnom raztopine 100 ml in ob določenih časih jemali le po 1,5 ml vzorca.

3.3.1.3 Kapaciteta vezave Cu^{2+} na izmenjevalca

S konstantno koncentracijo izmenjevalca in višanjem koncentracije Cu^{2+} smo preverjali, kakšna je kapaciteta vezave Cu^{2+} pri naslednjih izmenjevalcih in pH vrednostih:

- PO+NaOH+CA, pH 3,6, pH 5,0,
- PO+CA, pH 5,0.

Pogoji:

- 1 g/l izmenjevalec,
- (50, 100, 200) mg/l Cu^{2+}
- 50 mmol/l pufer
- skupni volumen raztopine: 100 ml
- dve paralelki

Izmenjevalce smo dodali v raztopine s 50, 100 in 200 mg/l Cu^{2+} . Na podlagi rezultatov kinetike vezave Cu^{2+} na izmenjevalca (glej 3.3.1.2) smo pri tem in nadaljnjih eksperimentih podaljšali čas stresanja na 180 min.

Kot je napisano v splošnih pogojih (glej 3.3) smo raztopine zamešali, stresali ter vzorčili.

3.3.1.4 Vezava majhne koncentracije Cu^{2+} z različnimi koncentracijami izmenjevalcev

Pri majhni koncentraciji Cu^{2+} smo preverjali, ali večanje koncentracij izmenjevalca dodatno znižuje koncentracijo nevezanih Cu^{2+} v raztopini. Eksperiment smo izvedli z izmenjevalcema in naslednjimi vrednostmi pH:

- PO+NaOH+CA, pH (3,6; 5,0),
- PO+CA, pH 5,0.

Pogoji:

- (1, 2, 4) g/l izmenjevalec
- 1 mg/l Cu^{2+}
- 50 mmol/l pufer
- skupni volumen raztopine: 100 ml
- čas stresanja 180 min
- dve paralelki

Raztopine smo zamešali in stresali kot je navedeno v splošnih pogojih (glej 3.3).

Koncentriranje

Po končanem stresanju smo vzeli $5\times$ po 1,2 ml vzorca iz raztopin s koncentracijami izmenjevalca 1 g/l in 2 g/l, ter $8\times$ po 1,2 ml iz raztopin s koncentracijo izmenjevalca 4 g/l. Pri tem eksperimentu je bil koncentracija Cu^{2+} v vzorcih manjša kot je meja detekcije atomskega absorpcijskega spektrometra (AAS), s katerim smo merili nevezane Cu^{2+} v vzorcih, zato je bilo potrebno vzorce koncentrirati. Najprej smo vzorce hranjene v mikrocentrifugirkah posušili v vakuumskem rotacijskem sušilniku. Nato smo jih v mikrocentrifugirkah raztopili z 0,1 mol/l HCl. Posamezno sušino vzorcev iz raztopin z 1 g/l in 2 g/l izmenjevalca smo raztopili z 240 μl 0,1 mol/l HCl, kar predstavlja 5-kratno koncentriranje. Posamezno sušino vzorcev iz raztopin s 4 g/l izmenjevalca pa smo raztopili s 150 μl 0,1 mol/l HCl, kar predstavlja 8-kratno koncentriranje. Nato smo raztopine istega vzorca združili v eno mikrocentrifugirko in dobili po 1,2 ml posameznega vzorca. Vzorce smo do analize na ASS hranili v hladilniku.

3.3.1.5 Vezava Cu^{2+} na izmenjevalca v prisotnosti organskih kislin

Preverili smo, ali prisotnost organskih kislin v raztopini vpliva na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalec. Za organsko kislino smo izbrali CA, ki se nahaja v večini sadja in je dober kelator. Koncentracija le-te v raztopini je bila višja kot v nekaterem sadju. Eksperimente smo izvedli z naslednjimi izmenjevalci in pH vrednostmi:

- PO+NaOH+CA, pH (3,6; 5,0),
- PO+CA, pH 5,0.

Pogoji:

- (1, 2, 4) g/l izmenjevalec
- 1 mg/l Cu^{2+}
- 3 g/l CA (pH 3,6 ali pH 5,0)
- 50 mmol/ pufer
- skupni volumen raztopine : 100 ml
- čas stresanja 180 min
- dve paralelki

Kot je napisano v splošnih pogojih (glej 3.3) smo raztopine zamešali, stresali in vzorčili.

3.3.1.6 Vezava Cu^{2+} na izmenjevalca v prisotnosti Ca^{2+}

Ali prisotnost Ca^{2+} v koncentracijah, ki jih imajo nekatera živila, vpliva na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalec smo preverili z:

- PO+NaOH+CA, pH 3,6, pH 5,0,
- PO+CA, pH 5,0.

Pogoji:

- (1, 2, 4) g/l izmenjevalec
- 1 mg/l Cu^{2+}
- 500 mg/l Ca^{2+}

- skupni volumen raztopine: 100 ml
- čas stresanja 180 min
- dve paralelki

Raztopino Ca^{2+} , ki smo jo dodajali v vodne raztopine z izmenjevalci, smo pripravili iz CaCl_2 . V raztopini z izmenjevalcem se Ca^{2+} vežejo na stranske skupine izmenjevalca, kar sprosti vodikove ione iz stranskih skupin in zniža pH raztopine. Da bi ugotovili kakšne koncentracije pufru so potrebne za ohranitev začetnih pH, smo pripravili raztopine z PO+NaOH+CA pri pH 3,6 in pH 5,0 pod danimi pogoji, le čas stresanja smo skrajšali na 90 min. Da smo ohranili pH na začetni ravni, je bilo potrebno zvišati koncentracijo pufru v raztopinah:

- v raztopini z 1 g/l izmenjevalca: 100 mmol/l pufer (10 ml 1 mol/l pufru v 100 ml raztopine),
- v raztopini z 2 g/l in 4 g/l izmenjevalca: 200 mmol/l pufer (20 ml 1 mol/l pufru v 100 ml raztopine).

Za izvedbo eksperimenta smo upoštevali dane pogoje. Raztopinam s PO+NaOH+CA in PO+CA smo dodali pufre, kot je navedeno v zgornjih alinejah. Stresali in vzorčili smo kot je opisano v splošnih pogojih (glej 3.3). Koncentriranje ni bilo potrebno.

3.3.1.7 Vezava Cu^{2+} na izmenjevalec, obdelan z NaOH in modificiran s CA, v jabolčnem soku

Za stresanje smo pripravili **4 osnovne raztopine jabolčnega soka**:

1. brez dodatkov (**JS**),
2. z dodatkom izmenjevalca (**JS+I**),
3. z dodatkom Cu^{2+} (**JS+Cu²⁺**),
4. z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (**JS+Cu²⁺+I**).

Pogoji:

- 100 ml sok (100% Mercatorjev jabolčni sok)
- 4 g/l izmenjevalec
- 1 mg/l Cu^{2+} (dodali smo 1 ml 100 mg/l Cu^{2+} , ko ni bilo dodatka Cu^{2+} , smo dodali 1 ml MQ vode),
- čas stresanja 180 min

Kot je napisano v splošnih pogojih (glej 3.3) smo raztopine zamešali, stresali in vzorčili. Izmenjevalci v raztopinah jabolčnega soka znižajo pH, zato smo po eni uri stresanja umerili pH osnovnih jabolčnih raztopin z 2 mol/l NaOH na pH jabolčnega soka.

Eksperiment smo ponovili 3×. Vsakič smo uporabili sveže odprt sok. Skupaj smo uporabili 3 embalažne enote. Vsi sokovi so bili polnjeni na isti dan.

Osnovne 4 raztopine posameznega jabolčnega soka smo uporabili za nadaljnje raziskave.

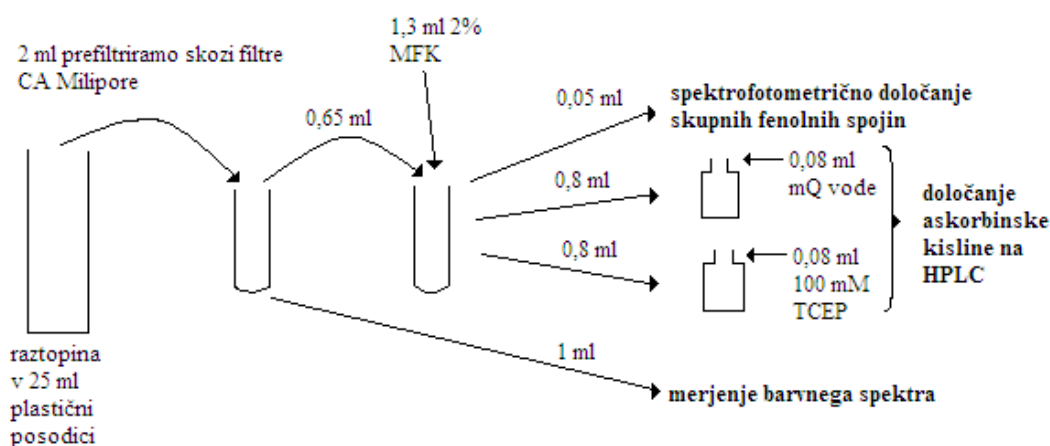
3.3.2 Vpliv izmenjevalca, obdelanega z NaOH in modificiranega s citronsko kislino, dodatka Cu^{2+} in askorbinske kisline na barvo jabolčnega soka

Z merjenjem barvnega spektra jabolčnih raztopin smo spremljali, kako vezanje Cu^{2+} na izmenjevalec ter dodatek AA v jabolčnih raztopinah vpliva na neencimsko porjavenje soka.

4 osnovne raztopine jabolčnega soka iz eksperimenta 3.3.1.7. smo po odvzemu vzorcev za merjenje Cu^{2+} natočili $2 \times$ po 25 ml v 45 ml plastične posodice s pokrovčkom. Tako je bila vsaka raztopina v dveh posodicah, skupaj smo imeli 8 posodic. V eno posodico posamezne raztopine smo dodali 0,5 ml 5 g/l AA (100 mg/l AA v jabolčni raztopini), v drugo pa 0,5 ml MQ vode in dobro premešali. V osmih posodicah smo tako imeli raztopine jabolčnega soka:

1. JS (brez dodatkov),
2. JS+AA (z dodatkom askorbinske kisline),
3. JS+I (z dodatkom izmenjevalca),
4. JS+I+AA (z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline),
5. JS+ Cu^{2+} (z dodatkom Cu^{2+}),
6. JS+ Cu^{2+} +AA (z dodatkom Cu^{2+} in askorbinske kisline),
7. JS+ Cu^{2+} +I (z dodatkom Cu^{2+} izmenjevalca),
8. JS+ Cu^{2+} +I+AA (z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline).

2 ml posamezne raztopine smo prefiltrirali skozi filtre CA Milipore in uporabili 1 ml filtrata za merjenje barvnega spektra v PP kivetah na UV-VIS spektrofotometru (slika 6). Dobro zaprte posodice z raztopinami jabolčnega soka smo nato hranili pri 55 °C, da pospešimo procese oksidacije in porjavenja. Eksperiment smo izvedli na jabolčnem soku iz 1. in 2. embalažne enote. Pri soku iz 1. embalažne enote smo ponovno izmerili barvne spektre raztopin 3. in 7. dan skladiščenja. Pri soku iz 2. embalažne enote pa smo meritve ponovili 3. in 11. dan skladiščenja.



Slika 6: Priprava raztopin jabolčnega soka za merjenje barvnega spektra in določanje skupnih fenolnih snovi.

3.3.2.1 Barva jabolčnega soka po sedmih mesecih skladiščenja

Dobro zaprte posodice z raztopinami jabolčnega soka smo po končanih analizah skladiščili pri 55 °C 1 mesec ter nato pri sobni temperaturi še 6 mesecev. Barve raztopin jabolčnega soka po sedmih mesecih smo ocenili s prostim očesom.

3.3.3 Vpliv izmenjevalca, obdelanega z NaOH in modificiranega s citronsko kislino, dodatka Cu^{2+} in askorbinske kisline na skupno antioksidativno aktivnost v jabolčnem soku

Da bi ugotovili, kako vezanje Cu^{2+} na izmenjevalec ter dodatek AA vpliva na antioksidante v raztopinah jabolčnega soka, smo spremljali antioksidativno aktivnost v osmih raztopinah jabolčnega soka. Za analizo smo uporabili iste raztopine jabolčnega soka kot pri merjenju barvnega spektra (glej 3.3.2). Ko smo 2 ml posamezne raztopine prefiltrirali skozi filtre CA Milipore, smo vzeli po 0,65 ml posameznega filtrata ter mu dodali 1,3 ml 2 % metafosforne kisline (MFK) in dobro premešali. MFK je upočasnila nadaljnje procese oksidacije. 50 μl tako razredčenega vzorca z MFK smo uporabili za določanje skupnih fenolov s spektrofotometrično metodo z uporabo Folin-Ciocalteaujevega (F-C) reagenta (slika 6). Meritve smo ponovili na skladiščenih raztopinah (glej 3.3.2) jabolčnega soka iz 1. embalažne enote 3. in 7. dan, iz druge embalažne enote pa 3. in 11. dan.

3.3.4 Vpliv izmenjevalca, obdelanega z NaOH in modificiranega s citronsko kislino, in dodatka Cu^{2+} na stabilnost askorbinske kisline v jabolčnem soku

Na osnovnih štirih raztopinah jabolčnega soka smo spremljali, ali vezanje Cu^{2+} iz raztopin na izmenjevalce vpliva na oksidacijo po stresanju dodane AA.

Štiri osnovne raztopine jabolčnega soka 3. embalažne enote, ki so opisane v 3.3.1.7. smo po odvzemu vzorcev za merjenje Cu^{2+} odpipetirali po 14 ml v plastične epruvete s pokrovčkom. Vsaki raztopini smo dodali po 280 μl 5 g/l AA (100 mg/l AA v jabolčni raztopini) in dobro premešali. Dobili smo štiri raztopine:

1. JS+AA
2. JS+I+AA
3. JS+ Cu^{2+} +AA
4. JS+ Cu^{2+} +I+AA

Skozi filtre CA Milipore smo prefiltrirali po 10 ml vsake raztopine z dodano AA. Za vsako raztopino smo pripravili po 12 vial (4 \times 12 vial) in v vsako odpipetirali po 900 μl prefiltrirane raztopine. Čas smo začeli meriti, ko smo raztopini dodali AA. V preglednici 6 vidimo po kakšnem času od dodatka AA v jabolčni sok je bil posamezni vzorec analiziran na HPLC. Razpad AA smo na HPLC spremljali približno 16 ur.

Preglednica 6: Časi injiciranja raztopin jabolčnega soka z dodano askorbinsko kislino na HPLC.

viala	čas injiciranja (min)
1	3
2	52
3	101
4	150
5	213
6	304
7	393
8	482
9	585
10	714
11	843
12	971

3.4 INSTRUMENTALNE ANALIZE

3.4.1 Merjenje Cu^{2+} z atomsko absorpcijsko spektrometrijo

Vsebnost Cu^{2+} v raztopinah smo merili s atomsko absorpcijsko spektrometrijo (ASS) na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko BF.

Naprava za ASS je sestavljena iz 4 glavnih enot:

- votle katodne žarnice, ki emitira svetlobo z valovno dolžino specifično za analiziran element,
- aspiratorja za vsesavanje in razprševanje vzorca,
- plamena,
- fotodetektorja.

Votlo katodno žarnico izberemo glede na element, katerega analiziramo. Raztopino z vzorcem aspirator vsesa in razprši v plamen, kjer vzorec razpade na atome. Žarek svetlobe iz žarnice je usmerjen skozi plamen v monokromator in na detektor, ki meri količino absorbirane svetlobe. Absorpcija je odvisna od prisotnosti Cu^{2+} v plamenu in je proporcionalna koncentraciji Cu^{2+} ionov v vzorcu.

Vsebnost Cu^{2+} smo določali z merjenjem absorpcije monokromatske svetlobe pri razprševanju vzorca v plamen acetilen zrak pri 327,4 nm. Koncentracije Cu^{2+} v vzorcu smo odčitali iz umeritvene krivulje. Za umeritveno krivuljo smo pripravili raztopine z (0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0) mg/l Cu^{2+} .

3.4.2 Merjenje barvnega spektra

Pri jabolčnem soku smo spremljali, kako se s časom spreminja barva v osmih raztopinah (JS, JS+AA, JS+I, JS+I+AA, JS+ Cu^{2+} , JS+ Cu^{2+} +AA, JS+ Cu^{2+} +I, JS+ Cu^{2+} +I+AA). Spekter smo merili v polipropilen (PP) kivetah na UV-Vis spektrofotometru. Da bi pospešili oksidacijo in porjavenje, smo vzorce po prvem merjenju na začetni dan

skladiščili pri 55 °C. Pri soku iz 1. embalažne enote smo ponovili merjenje 3. in 7. dan, pri soku iz 2. embalažne enote pa 3. in 11. dan skladiščenja.

3.4.3 Določanje skupnih antioksidantov

Skupne antioksidante (fenolne snovi in AA) smo določali s spektrofotometrično metodo z uporabo Folin-Ciocalteaujevega (F-C) reagenta, ki v alkalni raztopini oksidira antioksidante. Absorbanco reduciranih komponent F-C reagenta smo merili pri 746 nm. Koncentracija teh komponent je premo sorazmerna s koncentracijo antioksidantov v vzorcu. Velja Beer-Lamberov zakon. Iz umeritvene krivulje smo odčitali skupno koncentracijo antioksidantov v vzorcih.

Vzorec:

Vzeli smo 50 μl vzorca, razredčenega z 2 % MFK (1:2). Vzorce v mikrocentrifugirkah smo razredčili z MQ vodo do skupnega volumna 725 μl in dobro premešali. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 125 μl razredčenega F-C reagenta (1:2), takoj premešali in po 5 minutah odpipetirali še 125 μl 20 % raztopine Na_2CO_3 ter ponovno premešali. Po 60 minutah na sobni temperaturi smo izmerili absorbanco pri 746 nm. Za vsako od osmih raztopin (JS, JS+AA, JS+I, JS+I+AA, JS+ Cu^{2+} , JS+ Cu^{2+} +AA, JS+ Cu^{2+} +I, JS+ Cu^{2+} +I+AA) iz 1. in 2. embalažne enote jabolčnega soka smo pripravili in merili vzorce v dveh paralelkah. Dobljenim meritvam smo izračunali aritmetično sredino.

Umeritvena krivulja:

S standardnimi raztopinami klorogenske kisline (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35) $\mu\text{mol/l}$ smo pripravili umeritveno krivuljo, iz katere smo odčitali skupno koncentracijo antioksidantov v vzorcih. Slepi vzorec smo pripravili tako, da smo namesto vzorca dodali MQ vodo.

Preglednica 7: Volumni raztopin za pripravo umeritvene krivulje s klorogensko kislino za določanje skupnih antioksidantov.

končna koncentracija klorogenske kisline ($\mu\text{mol/L}$)	klorogenska kislina 17 mg/l (μl)	MQ voda (μl)	F-C reagent (μl)	20 % raztopina Na_2CO_3 (μl)
5	100	625	125	125
10	200	525	125	125
15	300	425	125	125
20	400	325	125	125
25	500	225	125	125
30	600	125	125	125
35	700	25	125	125

V preglednici 7 so navedeni volumni raztopin za pripravo umeritvene krivulje s klorogensko kislino. Ko smo zamešali klorogensko kislino in MQ vodo, smo dodali 125 μl F-C reagenta in nadaljevali kot pri vzorcu.

3.4.4 Določanje askorbinske kisline s HPLC

Za določanje vsebnosti AA v raztopinah jabolčnega soka smo uporabili HPLC. Vzorec se s črpalko pod visokim tlakom potiska skozi kolono (stacionarna faza) s pomočjo mobilne faze. Čas, v katerem se snov zadržuje v koloni, je odvisen od lastnosti snovi, stacionarne in mobilne faze. Vsaka snov ima karakteristični retenzijski čas, ko se le-ta eluira iz kolone. Površina vrha je premosorazmerna s koncentracijo posamezne snovi.

Pogoji merjenja:

- gradientna črpalka Maxi Start, Knauer
- kolona Synergie C_{18} 250 nm × 4 mm
- mobilna faza 2,5 mM H_2SO_4
- pretok mobilne faze 1 ml/min
- volumen injiciranja 20 μl
- detektor UV-Vis, 260 nm, Knauer

Vzorec:

Po stresanju smo prefiltrirali 14 ml vsake osnovne raztopine jabolčnega soka iz 3. embalažne enote (JS, JS+I, JS+ Cu^{2+} , JS+ Cu^{2+} +I) v plastične epruvete in v vsako epruveto dodali po 280 μl 5 g/l sveže pripravljene AA ter dobro premešali. Za vsako raztopino smo pripravili po 12 vial (4 × 12 vial) in v vsako odpipetirali po 900 μl prefiltrirane raztopine. Razpad AA smo spremljali na HPLC približno 16 ur. Prvo injiciranje je bilo 3 minute po dodatku AA. Sledila so injiciranja po 52, 101, 150, 213, 304, 393, 482, 585, 714, 843 ter 971 minutah

Umeritvena krivulja:

Za pripravo umeritvene krivulje smo pripravili sveže raztopine AA s koncentracijami (10, 20, 40, 60, 80, 100) mg/l. S pomočjo le-te smo določili koncentracije AA v vzorcih.

4 REZULTATI

4.1 KARAKTERIZACIJA IZMENJEVALCEV

4.1.1 Vpliv pH na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalce iz pšeničnih otrobov

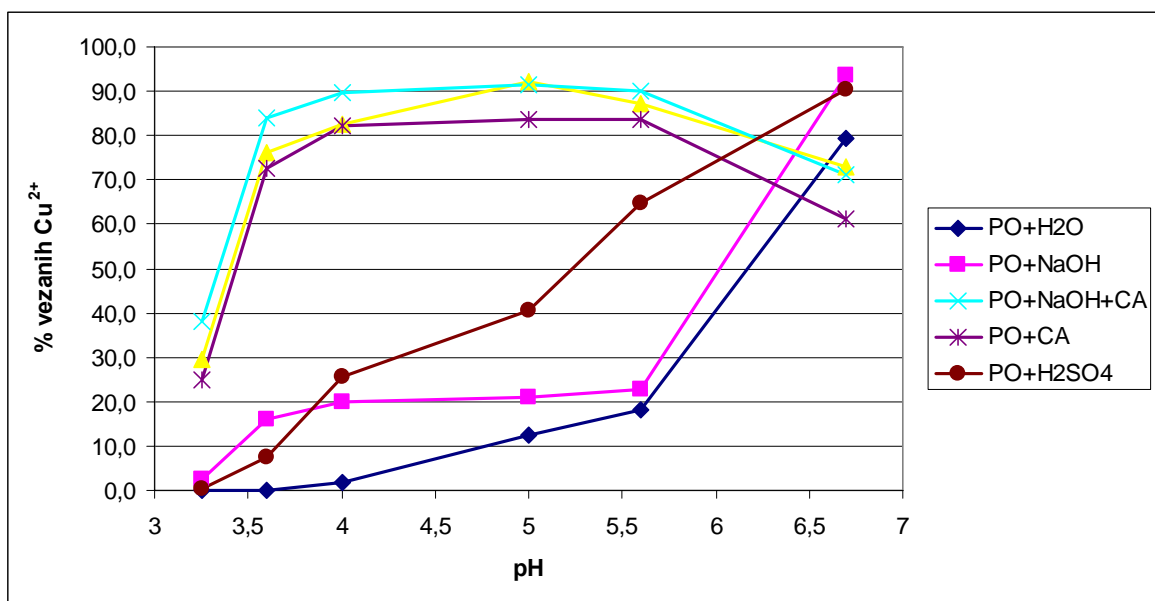
Zanimalo nas je, kako je učinkovit posamezen izmenjevalec v različnih območjih pH. Izmenjevalce s koncentracijo 1 g/l in pri začetni koncentraciji Cu^{2+} 20 mg/l smo stresali 90 minut pri naslednjih pH-jih: 3,25; 3,6; 4,0; 5,0; 5,6; 6,7.

Preglednica 8 prikazuje povprečje koncentracij nevezanih Cu^{2+} v raztopinah po stresanju, slika 7 pa grafični prikaz deleža vezanih Cu^{2+} (enačba 9, priloga B) na posamezen izmenjevalec pri različnih pH-jih.

$$\frac{(20 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{l}) - x}{20 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{l}} = \% \text{ vezanih Cu}^{2+} \quad \dots (9)$$

x... nevezani Cu^{2+} (mg/l) v raztopinah z izmenjevalci po stresanju

Po koncu stresanja smo izmerili pH (priloga C). Zaradi preglednosti so na sliki 7 in v preglednici 8 prikazani začetni pH-ji, ki so se v večini primerov le malo razlikovali od končnih vrednosti.



Slika 7: Vpliv pH vodnih raztopin na vezavo Cu^{2+} na pšenične otrobe, sprane z vodo (PO+H₂O); pšenične otrobe, obdelane z NaOH (PO+NaOH); pšenične otrobe sprane z vodo in modificirane s citronsko kislino (PO+H₂O+CA); pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA); pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA) in pšenične otrobe, dehidrirane s H₂SO₄ (PO+H₂SO₄).

Preglednica 8: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, spranih z vodo ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$); pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH ($\text{PO}+\text{NaOH}$), pšeničnih otrobov spranih z vodo in modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$); pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$); pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino ($\text{PO}+\text{CA}$) in pšeničnih otrobov, dehidriranih s H_2SO_4 ($\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$).

pH	Cu^{2+} (mg/l)					
	$\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$	$\text{PO}+\text{NaOH}$	$\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$	$\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$	$\text{PO}+\text{CA}$	$\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$
3,25	$20,9 \pm 0,5$	$19,5 \pm 0,2$	$14,1 \pm 1,0$	$12,4 \pm 1,0$	$15,0 \pm 0,7$	$19,9 \pm 0,6$
3,6	$20,4 \pm 0,1$	$16,8 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,5$	$18,5 \pm 1,2$
4,0	$19,7 \pm 0,4$	$16,0 \pm 1,0$	$3,5 \pm 1,7$	$2,0 \pm 0,0$	$3,6 \pm 0,3$	$14,9 \pm 0,1$
5,0	$17,5 \pm 2,1$	$15,8 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,8$	$11,9 \pm 0,5$
5,6	$16,4 \pm 0,5$	$15,5 \pm 0,8$	$2,6 \pm 0,9$	$2,0 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,4$
6,7	$4,1 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,4$	$7,7 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,1$

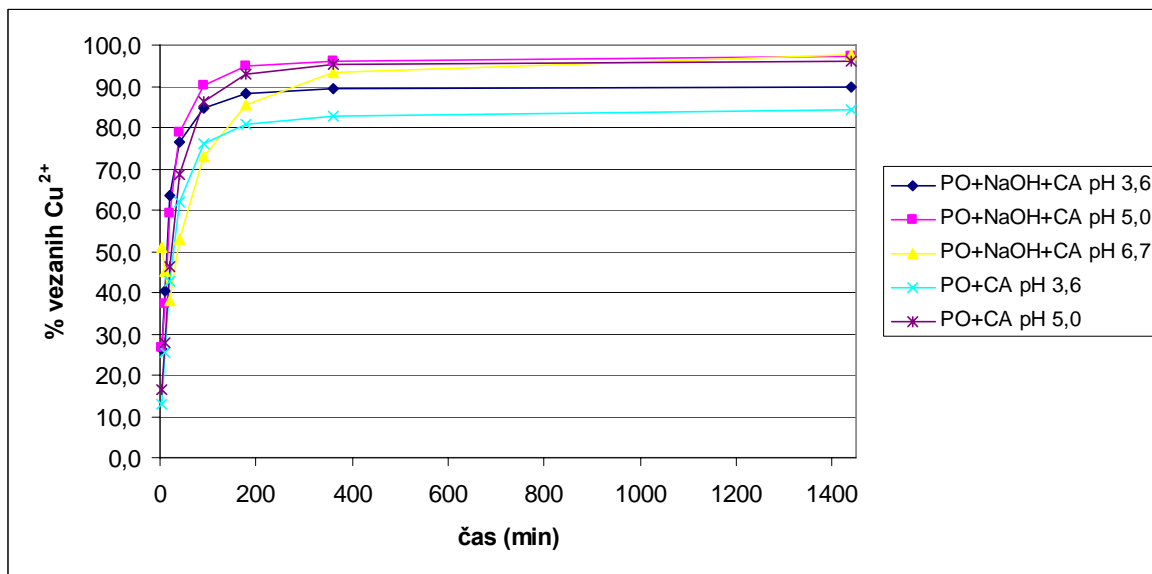
Iz slike 7 je razvidno, da so imeli izmenjevalci, modificirani s CA ($\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$, $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$, $\text{PO}+\text{CA}$), v različnih območjih pH podobne deleže vezanih Cu^{2+} . Najbolje so vezali ione v območju pH od 3,6 do 5,6 in sicer od 73 % do 90 % dodanih Cu^{2+} . Najboljši v tem območju je bil izmenjevalec $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$, saj je od 20 mg/l Cu^{2+} v raztopinah ostalo po stresanju pri pH 3,6 ($3,2 \pm 0,1$) mg/l Cu^{2+} , pri pH 4,0 je ostalo ($2,0 \pm 0,0$) mg/l Cu^{2+} , pri pH 5,0 pa ($1,7 \pm 0,2$) mg/l Cu^{2+} (preglednica 8). Pri pH 3,25 se je delež vezanih Cu^{2+} v primerjavi s pH 3,6 zmanjšal za 57 % pri $\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$, za 46 % pri $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$ ter za 48 % pri $\text{PO}+\text{CA}$ kar nakazuje, da je učinkovitost izmenjevalcev modificiranih s CA pri pH 3,25 zelo padla. Pri pH 6,7 so izmenjevalci, modificirani s CA, tudi slabše vezali Cu^{2+} , vendar ne tako kot pri pH 3,25. Delež vezanih Cu^{2+} je bil 61 % za $\text{PO}+\text{CA}$, 71 % za $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$ in 73 % za $\text{PO}+\text{H}_2\text{O}+\text{CA}$.

Pri izmenjevalcih $\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$, $\text{PO}+\text{NaOH}$ in $\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$ je z naraščanjem pH naraščal delež vezanih Cu^{2+} na posamezen izmenjevalec. Pri pH 3,25 je bil delež vezanih Cu^{2+} blizu 0. Izmenjevalca $\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$ in $\text{PO}+\text{NaOH}$ sta do pH 5,6 vezala manj kot 23 % Cu^{2+} . Izmenjevalec $\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$ je bil v primerjavi z slednjima boljši pri pH 5,0 in pH 5,6. Pri pH 5,0 je vezal 41 %, pri pH 5,6 pa 65 % Cu^{2+} . Pri pH 6,7 so izmenjevalci $\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$, $\text{PO}+\text{NaOH}$ in $\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$ v primerjavi z izmenjevalci, modificiranimi s CA, bolje vezali Cu^{2+} . $\text{PO}+\text{H}_2\text{O}$ je vezal 79 %, $\text{PO}+\text{NaOH}$ 94 % ter $\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$ 90 % Cu^{2+} .

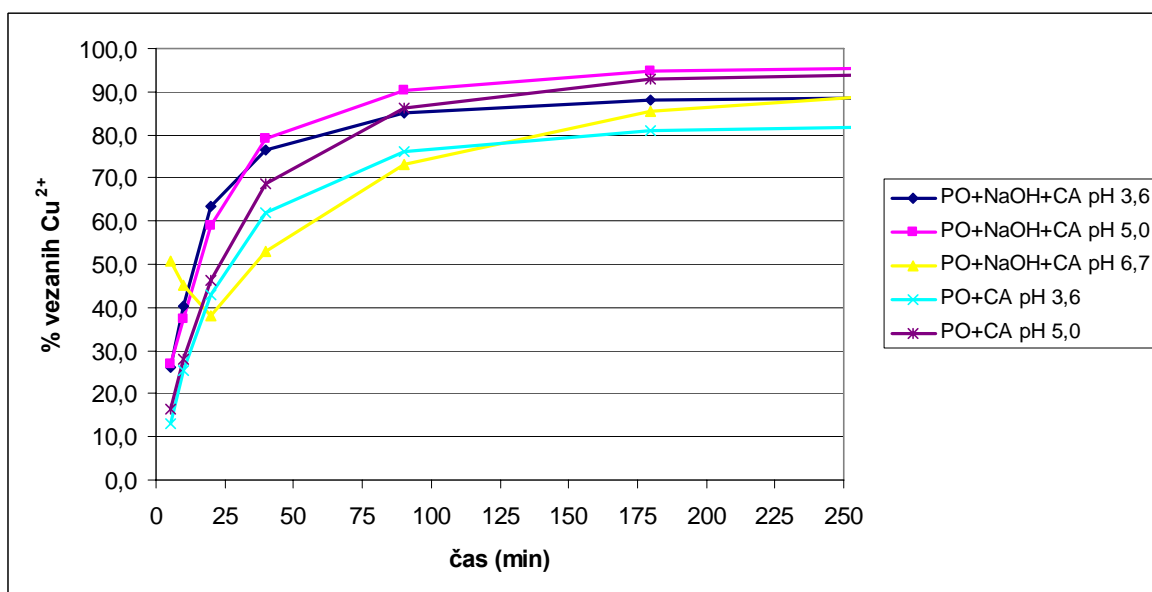
Iz živilsko-tehnološkega vidika so nas zanimali predvsem izmenjevalci, ki najbolj vežejo Cu^{2+} v rahlo kislem območju. Eksperiment je pokazal, da pri pH med 3,6 in 5,6 najbolj delujejo izmenjevalci, modificirani s CA. Zato smo se pri naslednjih eksperimentih omejili na izmenjevalca $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$, ki je v območju med pH 3,6 in 5,6 pokazal najboljše rezultate in $\text{PO}+\text{CA}$, katerega priprava je bila najmanj zahtevna.

4.1.2 Kinetika vezave Cu^{2+} na izmenjevalca

Pri izmenjevalcih PO+NaOH+CA in PO+CA smo preverili, kakšna je kinetika vezave dodanih Cu^{2+} v raztopini, pri začetni koncentraciji Cu^{2+} 20 mg/l in koncentraciji izmenjevalca 1 g/l. Preglednica 9 prikazuje povprečje nevezanih Cu^{2+} v raztopinah po stresanju, sliki 8 in 9 pa grafični prikaz deleža vezanih Cu^{2+} na izmenjevalce v odvisnosti od kontaktnega časa. Na koncu eksperimenta, po 1440 min, smo izmerili še pH raztopin (priloga E).



Slika 8: Kinetika vezave dodanih Cu^{2+} na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA), v vodnih raztopinah v različnih območjih pH.



Slika 9: Kinetika vezave dodanih Cu^{2+} na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA), v vodnih raztopinah v različnih območjih pH pri kontaktnem času, manjšem od 250 min.

Iz slike 8 je razvidno, da sta imela izmenjevalca pri različnih pH približno enako kinetiko vezave Cu^{2+} iz raztopin. Le pri PO+NaOH+CA pri pH 6,7 je bila kinetika vezave počasnejša. Prvih 20 min so deleži vezanih Cu^{2+} celo padali, potem pa naraščali (slika 9). Po 180 min se je v raztopinah z izmenjevalcema pri pH 3,6 in pH 5,0 vzpostavilo ravnotežje saj se je po tem času koncentracija Cu^{2+} le malo spreminjala (preglednica 9). Zato smo pri naslednjih eksperimentih podaljšali čas stresanja na 180 min. Ker nas je zanimalo predvsem delovanje izmenjevalcev v rahlo kislem območju, nismo več izvajali eksperimentov pri pH 6,7. Pri izmenjevalcu PO+CA pa smo opravili meritve le pri pH 5,0.

Preglednica 9: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA), ob različnih časih.

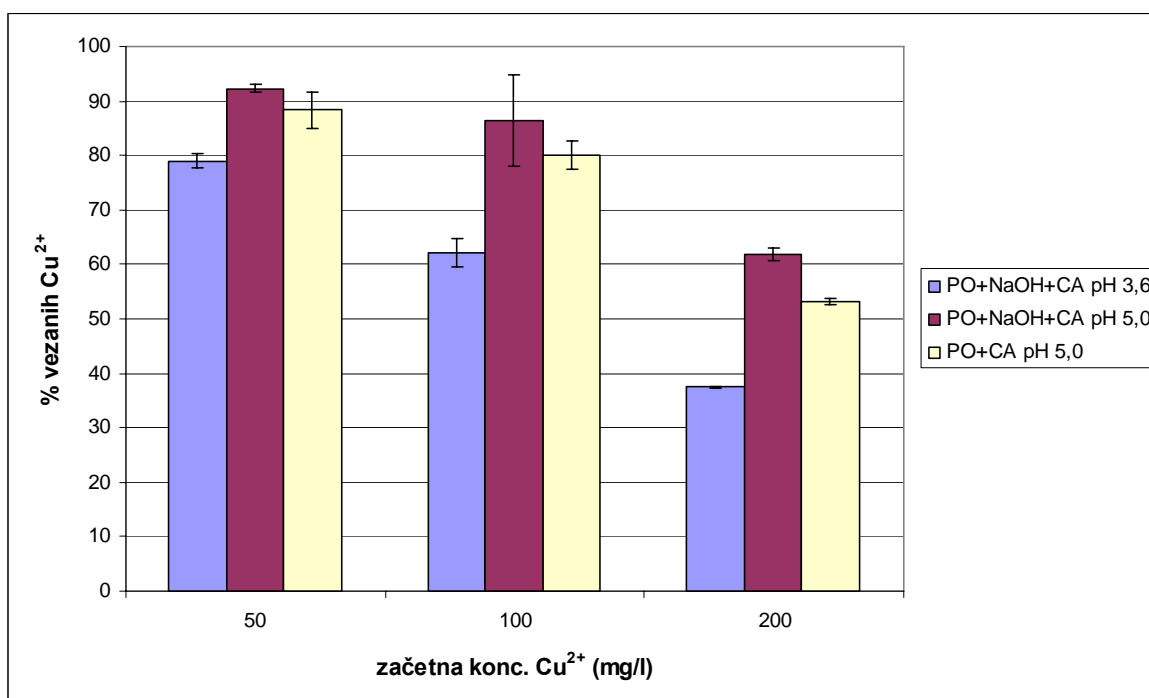
čas (min)	Cu^{2+} (mg/l)				
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+NaOH+CA pH 6,7	PO+CA pH 3,6	PO+CA pH 5,0
5	14,8 ± 0,4	14,6 ± 0,4	9,8 ± 1,1	17,4 ± 0,2	16,7 ± 0,3
10	11,9 ± 0,2	12,6 ± 0,3	11,0 ± 1,2	14,9 ± 0,2	14,4 ± 0,3
20	7,3 ± 0,3	8,2 ± 0,3	12,4 ± 0,5	11,4 ± 0,4	10,7 ± 0,2
40	4,7 ± 0,1	4,2 ± 0,1	9,4 ± 0,1	7,6 ± 0,3	6,3 ± 0,3
90	3,0 ± 0,1	1,9 ± 0,0	5,4 ± 0,1	4,8 ± 0,1	2,8 ± 0,2
180	2,4 ± 0,1	1,0 ± 0,0	2,9 ± 0,1	3,8 ± 0,0	1,4 ± 0,1
360	2,1 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,1	3,4 ± 0,0	1,0 ± 0,1
1440	2,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,2	3,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1

4.1.3 Kapaciteta vezave Cu^{2+} na izmenjevalca

Pri koncentraciji izmenjevalcev PO+NaOH+CA in PO+CA 1 g/l smo z večanjem koncentracije Cu^{2+} ugotavljali, kakšna je kapaciteta vezave Cu^{2+} ionov na izmenjevalec. V prilogi F je prikazano povprečje izmerjenih koncentracij nevezanih Cu^{2+} , na sliki 10 pa so izračunani deleži vezanih Cu^{2+} na izmenjevalca.

Preglednica 10 prikazuje koliko mg Cu^{2+} se veže iz raztopine na g izmenjevalca.

Izmerjeni pH-ji po končanem stresanju so v prilogi G.



Slika 10: Delež vezanih Cu^{2+} (%) iz vodnih raztopin v odvisnosti od začetne koncentracije Cu^{2+} (50, 100 in 200 mg/l Cu^{2+}) pri koncentraciji pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA) 1 g/l.

Iz slike 10 in preglednice 10 vidimo, da je imel izmenjevalec PO+NaOH+CA pri pH 5,0 najboljšo kapaciteto vezave Cu^{2+} . Pri 200 mg Cu^{2+} /l je vezal 62 % Cu^{2+} iz raztopine, kar je $(123,5 \pm 2,3)$ mg Cu^{2+} na g izmenjevalca. Blizu mu je bil izmenjevalec PO+CA pri pH 5,0, ki je vezal le do 9 % manj Cu^{2+} . Pri pH 3,6 je bila kapaciteta vezave za PO+NaOH+CA precej nižja. Večja je bila začetna koncentracija Cu^{2+} , manjši je bil delež vezanih Cu^{2+} in večja je bila kapaciteta vezave Cu^{2+} na testirana izmenjevalca.

Preglednica 10: Kapaciteta vezave Cu^{2+} iz vodnih raztopin na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA) (Cu^{2+} (mg)/ izm. (g)).

začetna konc. Cu^{2+} (mg/l)	Cu^{2+} (mg)/(izm. (g))		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
50	$39,5 \pm 0,7$	$46,2 \pm 0,3$	$44,2 \pm 1,7$
100	$62,2 \pm 2,6$	$86,5 \pm 8,3$	$80,1 \pm 2,6$
200	$75,0 \pm 0,4$	$123,5 \pm 2,3$	$106,4 \pm 1,3$

Na sliki 11 vidimo, kako se je po stresanju izmenjevalec PO+NaOH+CA pri koncentraciji Cu^{2+} 100 mg/l in 200 mg/l obarval zeleno. Barva je izrazitejša pri 200 mg/l Cu^{2+} .



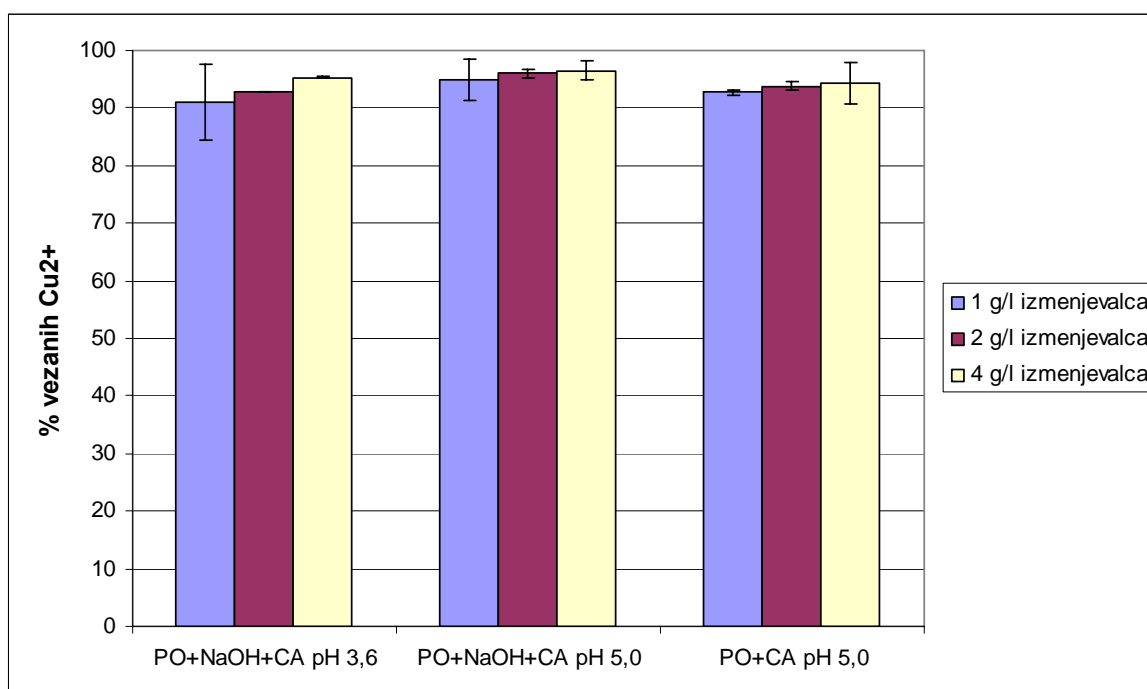
Slika 11: Vodni raztopini pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) po stresanju, pri začetnih pogojih pH 5,0 s 100 mg/l in 200 mg/l Cu^{2+} .

V prilogi G vidimo, da se je z večanjem začetne koncentracije Cu^{2+} znižal končni pH raztopin. Največji padec pH je bil pri pH 3,6 pri koncentraciji Cu^{2+} 200 mg/l, ko je pH padel na $3,29 \pm 0,04$, kar je lahko vplivalo na slabšo vezavo Cu^{2+} na izmenjevalec (glej sliko 7). Pri pH 5,0 so bili padci manjši in pH-ji še vedno v območju optimalnega delovanja izmenjevalcev, zato lahko sklepamo, da to ni vplivalo na učinkovitost izmenjevalcev.

4.1.4 Vezava majhnih koncentracij Cu^{2+} z različnimi koncentracijami izmenjevalcev

Pri majhni koncentraciji Cu^{2+} 1 mg/l smo preverili, ali z večanjem koncentracije izmenjevalcev PO+NaOH+CA in PO+CA v raztopinah dodatno znižamo koncentracijo nevezanih Cu^{2+} . Zaradi majhnih koncentracij Cu^{2+} , ki jih ASS ne zazna, je bilo potrebno vzorce koncentrirati (glej 3.3.1.4).

V preglednici 11 so prikazane koncentracije nevezanih Cu^{2+} po stresanju, na sliki 12 pa vidimo izračunane deleže vezanih Cu^{2+} na izmenjevalca. Izmerjeni pH-ji raztopin po stresanju so v prilogi H.



Slika 12: Vpliv koncentracije pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA), v vodnih raztopinah, na vezavo Cu^{2+} z začetno koncentracijo 1 mg/l.

Na sliki 12 vidimo, da večanje koncentracije izmenjevalca pri majhni začetni koncentraciji Cu^{2+} ni imelo velikega vpliva na deleže vezanih Cu^{2+} . Največja razlika je pri izmenjevalcu PO+NaOH+CA pri pH 3,6, ko se delež vezanih Cu^{2+} zviša iz 91 % pri koncentraciji izmenjevalca 1 g/l na 95 % pri koncentraciji izmenjevalca 4 g/l.

Preglednica 11: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA), z začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l.

izmenjevalec (g/l)	Cu^{2+} (mg/l)*		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
1	0,090 ± 0,007	0,050 ± 0,001	0,073 ± 0,001
2	0,061 ± 0,002	0,040 ± 0,001	0,063 ± 0,001
4	0,047 ± 0,001	0,035 ± 0,001	0,057 ± 0,002

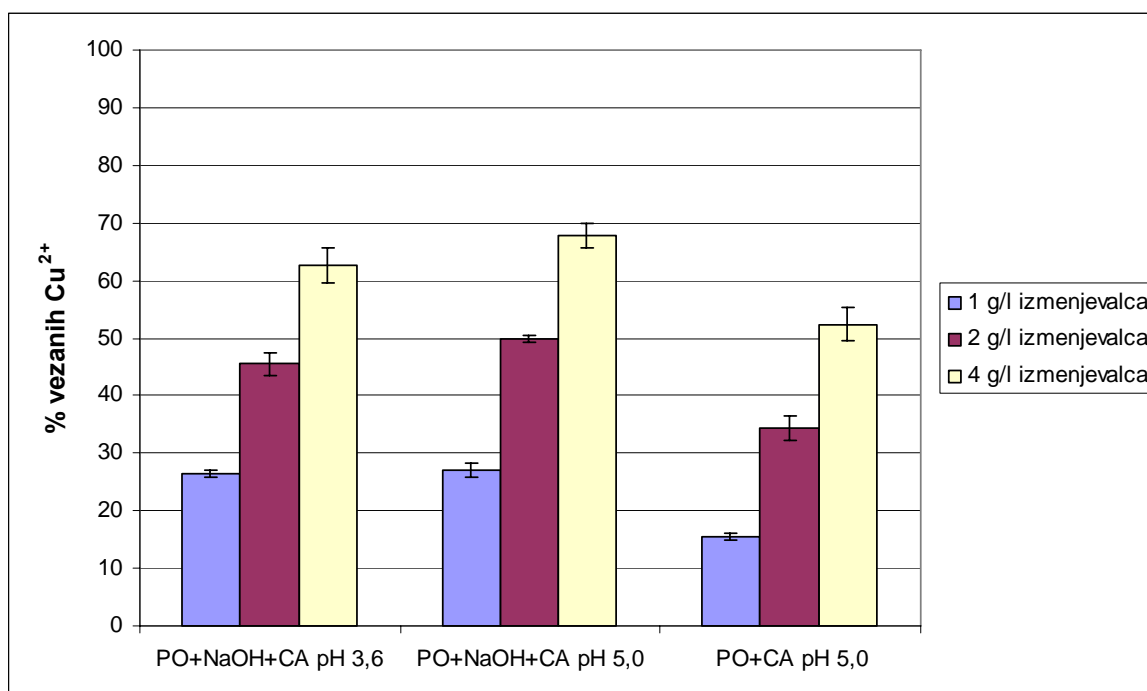
* prikazane so izračunane vrednosti ob upoštevanju faktorja koncentriranja

4.1.5 Vezava majhnih koncentracij Cu^{2+} na izmenjevalca v prisotnosti organskih kislin

Namen eksperimenta je bil ugotoviti, kako prisotnost organskih kislin v velikih koncentracijah vpliva na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalca PO+NaOH+CA in PO+CA. Za organsko kislino smo izbrali CA, ker se nahaja v večini sadja in je dober kelator. Stresali smo pripravljene raztopine z začetno majhno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l ter s 3 g/l CA pri koncentracijah izmenjevalcev 1 g/l, 2 g/l in 4 g/l. V preglednici 12 so prikazane koncentracije nevezanih Cu^{2+} po koncu stresanja, slika 13 pa prikazuje izračunane deleže vezanih Cu^{2+} na izmenjevalca. Izmerjeni pH-ji raztopin po stresanju so v prilogi I. V preglednici 13 so izračuni učinkovitosti izmenjevalcev za vezavo Cu^{2+} v prisotnosti CA v primerjavi z vezavo Cu^{2+} brez dodane CA. Učinkovitost smo izračunali (enačba 10):

$$\frac{\% \text{ vezanih } \text{Cu}^{2+} \text{ v prisotnosti CA}}{\% \text{ vezanih } \text{Cu}^{2+} \text{ brez dodane CA}} = \text{učinkovitost izmenjevalca v prisotnosti organskih kislin (\%)} \quad \dots (10)$$

Za rezultate deleža vezanih Cu^{2+} brez dodane CA smo uporabili rezultate, ki so prikazani v 4.1.4.



Slika 13: Delež vezanih Cu^{2+} v odvisnosti od koncentracije pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA), v vodnih raztopinah v prisotnosti 3 g/l citronske kisline.

V prisotnosti 3 g/l CA v raztopinah je bilo vezanje Cu^{2+} učinkoviteje pri večjih koncentracijah izmenjevalca (slika 13, preglednica 12). Delež vezanih Cu^{2+} se je pri koncentraciji izmenjevalca 4 g/l v primerjavi z 1 g/l izmenjevalca zvišal pri PO+NaOH+CA pri pH 3,6 za 36 %, pri pH 5,0 za 41 % ter pri PO+CA pri pH 5,0 za 37 %. V prisotnosti CA je najslabše vezal Cu^{2+} izmenjevalec PO+CA pri pH 5,0. Najbolje je

vezal Cu^{2+} izmenjevalec PO+NaOH+CA, ki je pri pH 5,0 s koncentracijo 4 g/l vezal 68 % na začetku dodanih Cu^{2+} . Njegova učinkovitost je bila v primerjavi brez dodane CA 70,2 % (preglednica 13).

Lahko sklepamo, da bi bilo za vezavo Cu^{2+} v živilih z višjo vsebnostjo kelatorskih organskih kislin, smiselna uporaba večjih koncentracij izmenjevalca (4 g/l), da dosežemo zadovoljiv učinek.

Preglednica 12: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA) v prisotnosti 3 g/l citronske kisline (PO+CA) in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l.

izmenjevalec (g/l)	Cu^{2+} (mg/l)		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
1	0,74 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,84 ± 0,01
2	0,55 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,66 ± 0,01
4	0,37 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,48 ± 0,02

Preglednica 13: Učinkovitost pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA) v vodnih raztopinah v prisotnosti 3 g/l citronske kisline (CA) (delež vezanih Cu^{2+} (%) v raztopinah z izmenjevalcema v prisotnosti 3 g/l CA in začetno konc. Cu^{2+} 1 mg/l, deljeno z deležem vezanih Cu^{2+} (%) v raztopinah z izmenjevalcema brez dodane CA in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l).

izmenjevalec (g/l)	(% vezanih Cu^{2+} v prisotnosti CA) / (% vezanih Cu^{2+} brez dodane CA)		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
1	29,0	28,5	16,8
2	48,9	51,9	36,6
4	65,8	70,2	55,6

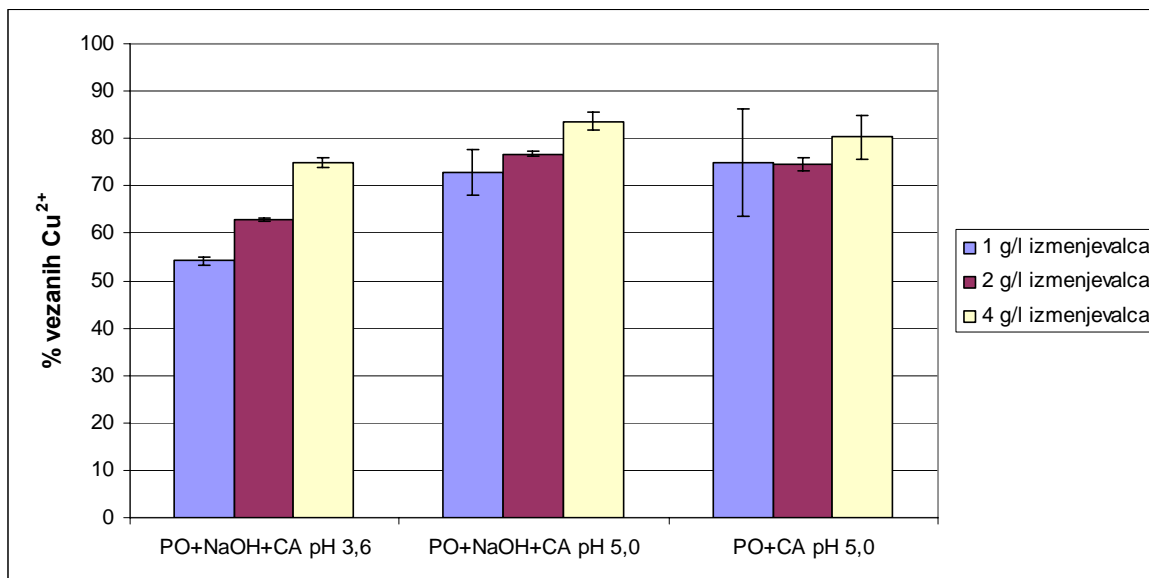
4.1.6 Vezava majhnih koncentracij Cu^{2+} na izmenjevalca v prisotnosti Ca^{2+}

V eksperimentu Ca^{2+} delujejo kot konkurent Cu^{2+} za vezavo na izmenjevalec. Z dodatkom Ca^{2+} smo simulirali živila, v katerih bi prisotni ioni tekmovali z majhnimi koncentracijami Cu^{2+} za vezavna mesta na izmenjevalcu. Stresali smo pripravljene raztopine z majhno začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l ter s 500 mg/l Ca^{2+} pri koncentracijah izmenjevalcev PO+NaOH+CA in PO+CA 1 g/l, 2 g/l in 4 g/l.

V preglednici 14 so prikazane koncentracije nevezanih Cu^{2+} po koncu stresanja, slika 14 pa prikazuje izračunane deleže vezanih Cu^{2+} na izmenjevalca. Izmerjeni pH-ji po stresanju raztopin so v prilogi J. V preglednici 15 so izračuni učinkovitosti izmenjevalcev za vezavo Cu^{2+} v prisotnosti Ca^{2+} v primerjavi z vezavo Cu^{2+} brez dodanih Ca^{2+} . Učinkovitost smo izračunali (enačba 11):

$$\frac{\% \text{ vezanih } \text{Cu}^{2+} \text{ v prisotnosti } \text{Ca}^{2+}}{\% \text{ vezanih } \text{Cu}^{2+} \text{ brez dodanih } \text{Ca}^{2+}} = \frac{\text{učinkovitost izmenjevalca}}{\text{v prisotnosti } \text{Ca}^{2+} \text{ (\%)}} \quad \dots (11)$$

Za rezultate deleža vezanih Cu^{2+} brez dodanih Ca^{2+} smo uporabili rezultate, ki so prikazani v 4.1.4.



Slika 14: Delež vezanih Cu^{2+} na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA), v prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+} .

V prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+} se je delež vezanih Cu^{2+} pri koncentraciji izmenjevalca 4 g/l v primerjavi z 1 g/l izmenjevalca zvišal pri PO+NaOH+CA pri pH 3,6 za 21 %, pri pH 5,0 za 11 % ter pri PO+CA pri pH 5,0 za 5 %. Lahko trdimo, da pri izmenjevalcu PO+CA pri pH 5,0, večanje koncentracije le-tega ni imelo večjega vpliva na učinkovitost vezanja Cu^{2+} v prisotnosti dodanih Ca^{2+} . To vidimo tudi iz preglednice 14. Pri izmenjevalcu PO+NaOH+CA se je pri koncentraciji izmenjevalca 4 g/l v primerjavi z 1 g/l izmenjevalca povečala učinkovitost pri pH 3,6 za 19,0 %, pri pH 5,0 pa za 10,1 %. Če primerjamo preglednico 15 s preglednico 13 opazimo, da je bil izmenjevalec PO+CA v prisotnosti Ca^{2+} precej bolj učinkovit kot v prisotnosti CA. Pri koncentraciji izmenjevalca 1 g/l je imel izmenjevalec PO+CA pri pH 5,0 kar 80,7 % učinkovitost in je vezal 75 % začetnih dodanih Cu^{2+} . Moramo pa upoštevati, da je pri tej meritvi odklon velik in dobljeni izračuni niso zanesljivi.

Preglednica 14: Koncentracija nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA), v prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+} in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l.

izmenjevalec (g/l)	Cu^{2+} (mg/l) ⁺		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
1	0,46 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,04
2	0,37 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,01
4	0,25 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,20 ± 0,01

Preglednica 15: Učinkovitost pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citrsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citrsko kislino (PO+CA), v vodnih raztopinah, v prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+} (delež vezanih Cu^{2+} (%) v raztopinah z izmenjevalcema v prisotnosti 500 mg/l Ca^{2+} in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l, deljeno z deležem vezanih Cu^{2+} (%) v raztopinah z izmenjevalcema brez dodanih Ca^{2+} in začetno koncentracijo Cu^{2+} 1 mg/l).

izmenjevalec (g/l)	(% vezanih Cu^{2+} v prisotnosti Ca^{2+})/(% vezanih Cu^{2+} brez dodanih Ca^{2+})		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
1	59,6	76,6	80,7
2	67,7	80,0	79,6
4	78,6	86,7	85,2

4.1.7 Vezava Cu^{2+} na izmenjevalec, obdelan z NaOH in modificiran s citrsko kislino, v jabolčnem soku

Preverili smo, kako naš izmenjevalec deluje v živilu. Izbrali smo pakiran 100 % jabolčni sok. Za izvedbo eksperimenta smo uporabili izmenjevalec PO+NaOH+CA, ki je v prejšnjih eksperimentih pokazal najboljše rezultate.

Za stresanje smo pripravili štiri osnovne raztopine jabolčnega soka:

1. brez dodatkov (JS),
2. z dodatkom izmenjevalca (JS+I),
3. z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}),
4. z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I),

katerim smo po vzorčenju izmerili pH-je (priloga I, J, K). Meritve smo izvedli na jabolčnih sokovih iz treh embalažnih enot. Vrednost pH jabolčnih sokov pred stresanjem je bil 3,47. V preglednici 16 so povprečja nevezanih Cu^{2+} v raztopinah po stresanju.

Preglednica 16: Povprečje nevezanih Cu^{2+} (mg/l) v raztopinah jabolčnih sokov iz treh embalažnih enot brez dodatkov (JS), z dodatkom izmenjevalca (JS+I); z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I), po stresanju (180 min) s pšeničnimi otrobi, obdelanimi z NaOH in modificiranimi s citrsko kislino (PO+NaOH+CA).

raztopine jabolčnega soka	Cu^{2+} (mg/l)
JS	0,10 ± 0,01
JS+I	0,09 ± 0,01
JS+ Cu^{2+}	1,10 ± 0,09
JS+ Cu^{2+} +I	0,86 ± 0,11

Jabolčni sokovi so imeli v povprečju (0,10 ± 0,01) mg/l Cu^{2+} ionov. Po stresanju z izmenjevalcem pa so imeli v povprečju (0,09 ± 0,01) mg/l Cu^{2+} kar nakazuje, da je izmenjevalec iz sokov vezal 10 % Cu^{2+} (preglednica 16). V raztopinah s dodatkom 1 mg/l Cu^{2+} je od začetnih (1,10 ± 0,09) mg/l skupnih Cu^{2+} ostalo (0,86 ± 0,11) mg/l skupnih Cu^{2+} kar nakazuje, da je izmenjevalec vezal 22 % Cu^{2+} . Koncentracije Cu^{2+} v jabolčnih raztopinah so bile na meji detekcije, zato tudi rezultati niso zanesljivi.

4.2 VPLIV IZMENJEVALCA, OBDELANEGA Z NaOH IN MODIFICIRANEGA S CITRONSKO KISLINO, DODATKA Cu^{2+} IN ASKORBINSKE KISLINE NA BARVO JABOLČNEGA SOKA

Z namenom spremljati potek neencimskega porjavenja smo osmim raztopinam jabolčnega soka z različnimi dodatki (JS, JS+AA, JS+I, JS+I+AA, JS+ Cu^{2+} , JS+ Cu^{2+} +AA, JS+ Cu^{2+} +I, JS+ Cu^{2+} +I+AA) (glej 3.3.2) v PP kivetah na UV-Vis spektrofotometru merili absorbanco. Po meritvah na začetni dan smo vzorce skladiščili pri 55 °C ter ponovili meritve pri soku iz 1. embalažne enote 3. in 7. dan, pri soku iz 2. embalažne enote pa 3. in 11. dan.

V preglednici 17 vidimo absorbance jabolčnih raztopin pri 420 nm. Slika 15 prikazuje absorbance raztopin 0 in Cu^{2+} soka iz 1. embalažne enote med 360 in 480 nm. Pri teh raztopinah smo absorbance začetnega dneva odšteli od absorbanc naslednjih dni in rezultate prikazali v diferenčnem grafu (slika 16). Za sok iz 2. embalažne enote so rezultati prikazani v prilogi L in M.

Preglednica 17: Absorbance pri 420 nm za raztopine jabolčnih sokov iz 1. in 2. embalažne enote, glede na različne dodatke, po stresanju (180 min) s pšeničnimi otrobi, modificiranimi s citronsko kislino (PO+NaOH+CA).

raztopine soka 1. embalažne enote	JS ⁽¹⁾	JS+AA ⁽²⁾	JS+I ⁽³⁾	JS+I+AA ⁽⁴⁾	JS+ Cu^{2+} ⁽⁵⁾	JS+ Cu^{2+} +AA ⁽⁶⁾	JS+ Cu^{2+} +I ⁽⁷⁾	JS+ Cu^{2+} +I+AA ⁽⁸⁾
dan 0	0,370	0,361	0,376	0,365	0,360	0,350	0,372	0,353
3. dan	0,642	0,614	0,680	0,657	0,458	0,455	0,483	0,474
7. dan	0,733	0,732	0,752	0,748	0,512	0,534	0,533	0,555

raztopine soka 2. embalažne enote	JS	JS+AA	JS+I	JS+I+AA	JS+ Cu^{2+}	JS+ Cu^{2+} +AA	JS+ Cu^{2+} +I	JS+ Cu^{2+} +I+AA
dan 0	0,366	0,355	0,369	0,366	0,367	0,362	0,373	0,365
3. dan	0,584	0,520	0,638	0,573	0,441	0,452	0,466	0,454
11. dan	0,712	0,709	0,742	0,767	0,571	0,602	0,586	0,594

⁽¹⁾ raztopina jabolčnega soka brez dodatkov

⁽²⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom askorbinske kisline*

⁽³⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca

⁽⁴⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline

⁽⁵⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+}

⁽⁶⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in askorbinske kisline

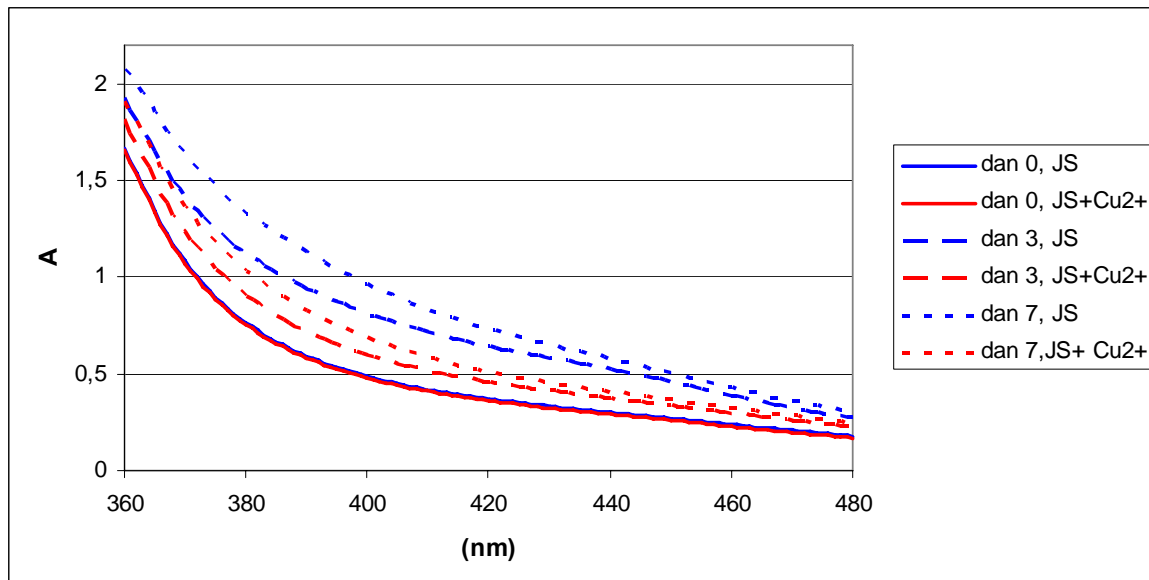
⁽⁷⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca

⁽⁸⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline

* askorbinska kislina je bila pri vseh jabolčnih raztopinah, z dodano askorbinsko kislino, dodana po stresanju

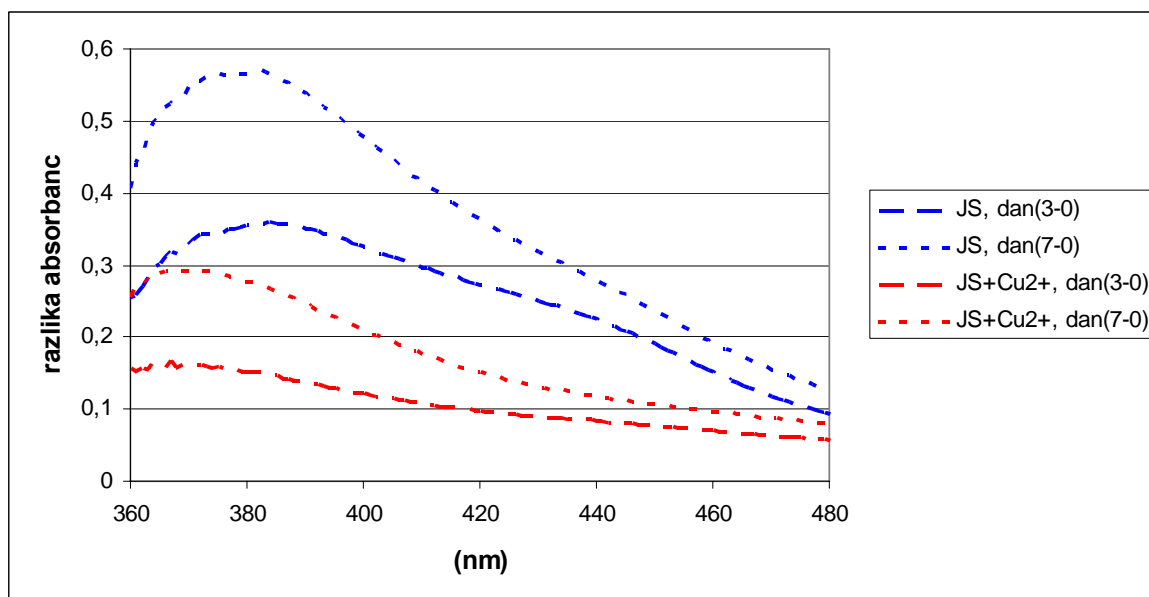
Na začetni dan so imele raztopine jabolčnih sokov pri 420 nm približno isto absorbanco. 3. dan so imele raztopine z dodatkom Cu^{2+} pri soku iz 1. in 2. embalažne enote nižje absorbance v primerjavi z raztopinami brez dodatka Cu^{2+} . Tako je imela raztopina JS+ Cu^{2+} pri soku iz 1. embalažne enote absorbanco 0,458, raztopina JS pa 0,642 (preglednica 13). Po 3. dnevu so se razlike povečale. Pri soku iz 1. embalažne enote je imela raztopina JS+ Cu^{2+} 7. dan absorbanco 0,512, raztopina JS pa absorbanco 0,733. Pri obeh sokovih je

imela najnižjo absorbanco raztopina $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$, najvišji pa raztopini $\text{JS}+\text{I}$ in $\text{JS}+\text{I}+\text{AA}$. V raztopinah z izmenjevalci so bile absorbance, v primerjavi s pari raztopin brez izmenjevalcev, višje (npr. $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$ nasproti $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}+\text{I}$).



Slika 15: Barvni spekter raztopin jabolčnega soka iz 1. embalažne enote z dodatkom Cu^{2+} ($\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$) in brez dodatkov (JS) (začetni, 3. in 7. dan).

Na sliki 15 vidimo prikaz barvnih spektrov raztopin JS in $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$. Na začetni dan (dan 0) sta se spektra raztopin prekrivala. 3. dan je imela raztopina JS v primerjavi z raztopino $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$ višje absorbance. 7. dan je bila razlika absorbanc med $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$ in JS še večja. Razlika je bila vidna tudi s prostim očesom na vzorcih. Raztopina $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$ je bila v primerjavi z raztopino JS svetlejša.

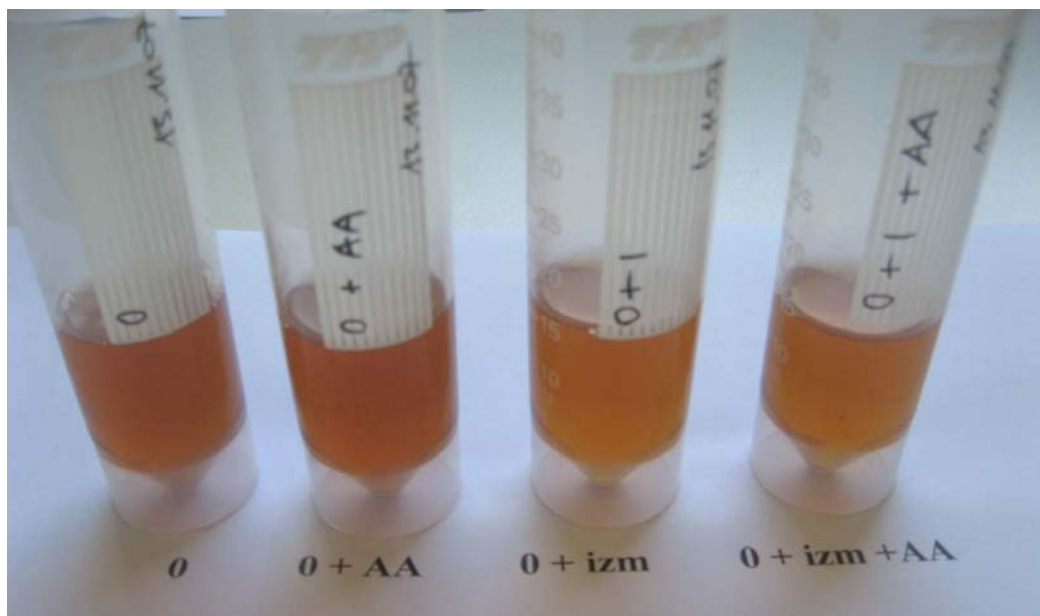


Slika 16: Diferenčni graf raztopin jabolčnega iz 1. embalažne enote z dodatkom Cu^{2+} ($\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$) in brez dodatkov (JS) (razlika absorbanc tretjega in začetnega dneva ter sedmega in začetnega dneva).

Razlike absorbanca so imele za raztopino JS vrhova pri 380 in 440 nm, medtem ko je imela raztopina $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$ vrh samo pri 380 nm. 7. dan, so se razlike v absorbancah še povečale. V nasprotju s splošnim prepričanjem so rezultati v našem primeru pokazali, da Cu^{2+} zavira neencimsko porjavenje. Iz slike 16 lahko sklepamo, da je Cu^{2+} upočasnjeval nastanek snovi, ki imajo absorpcijski maksimum pri 380 in 440 nm.

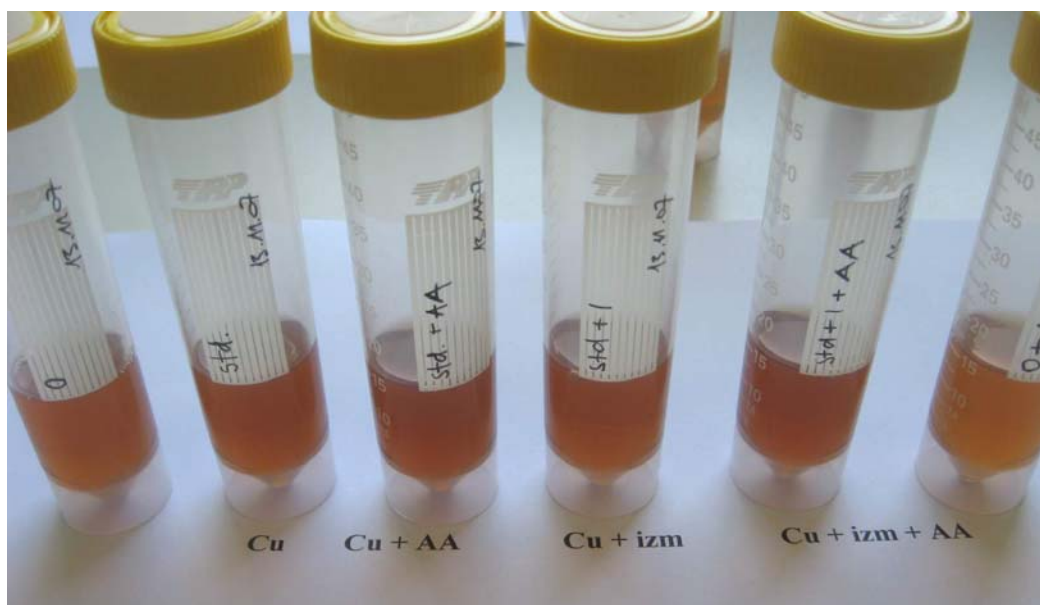
4.2.1 Barva jabolčnega soka po sedmih mesecih skladiščenja

Po sedmih mesecih skladiščenja raztopin jabolčnega soka (1. mesec pri 55 °C, nato pri sobni temperaturi) smo s prostim očesom ocenili spremembo barve. Na sliki 17 so prikazane raztopine jabolčnega soka JS, JS+AA, JS+I, JS+I+AA, na sliki 18 pa raztopine JS, $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}$, $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}+\text{AA}$, $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}+\text{I}$, $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}+\text{I}+\text{AA}$ in JS+I.



Slika 17: Raztopine jabolčnega soka glede na različne dodatke (od leve proti desni: brez dodatkov (JS); z dodatkom askorbinske kisline* (JS+AA); z dodatkom izmenjevalca (JS+I); z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline (JS+I+AA)) po 7 mesecih skladiščenja.

* askorbinska kislina je bila pri vseh jabolčnih raztopinah, z dodano askorbinsko kislino, dodana po stresanju



Slika 18: Raztopine jabolčnega soka glede na različne dodatke (od leve proti desni: brez dodatkov (JS); z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}); z dodatkom Cu^{2+} in z dodatkom askorbinske kisline* (JS+ Cu^{2+} +AA); z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I); z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline (JS+ Cu^{2+} +I+AA); z dodatkom izmenjevalca (JS+I)) po 7 mesecih skladiščenja.

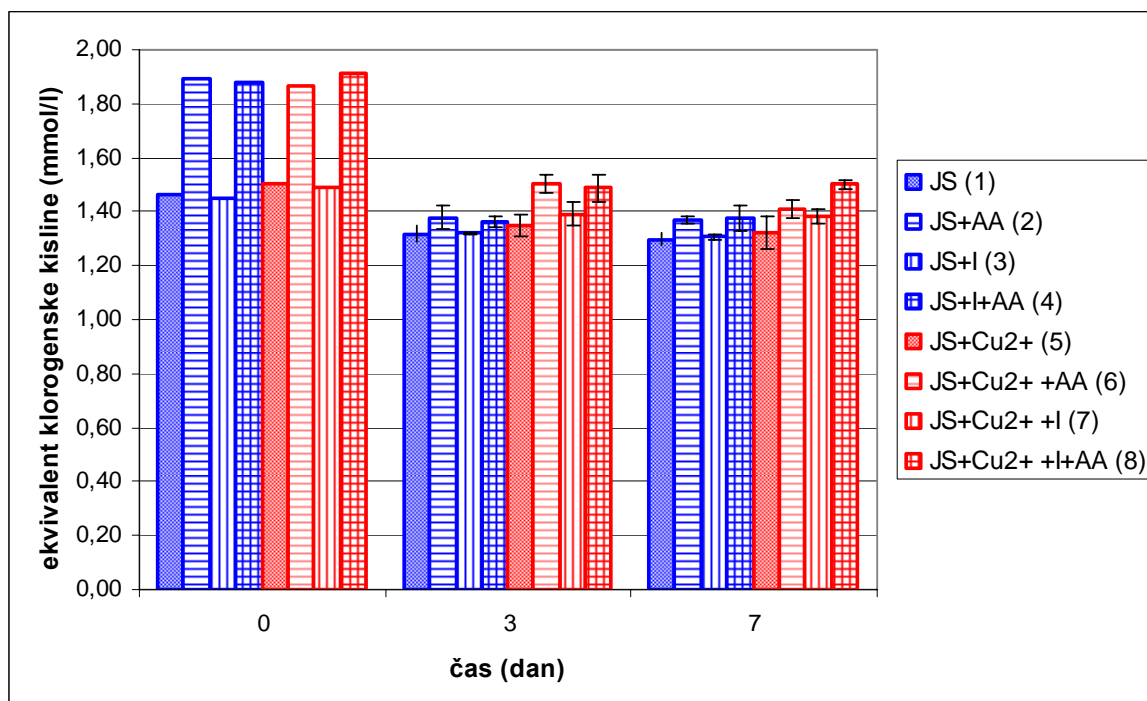
* askorbinska kislina je bila pri vseh jabolčnih raztopinah, z dodano askorbinsko kislino, dodana po stresanju

Iz slike 17 in 18 vidimo, da so po 7 mesecih skladiščenja raztopine jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} postale temnejše od raztopin brez dodatka Cu^{2+} . Raztopini JS+I in JS+I+AA sta bili za odtenek svetlejši kot raztopini JS in JS+AA (slika 17). Raztopine brez dodatka Cu^{2+} so imele opazno usedlino. Dolgoročno je dodatek Cu^{2+} slabo vplival na barvo. Najmanj pa sta potemneli raztopini z dodatkom izmenjevalca (JS+I in JS+I+AA).

4.3 VPLIV IZMENJEVALCA, OBDELANEGA Z NaOH IN MODIFICIRANEGA S CITRONSKO KISLINO, DODATKA Cu^{2+} IN ASKORBINSKE KISLINE NA SKUPNO ANTIOKSIDATIVNO AKTIVNOST JABOLČNEGA SOKA

Kako izmenjevalec z vezanjem Cu^{2+} vpliva na skupno antioksidativno aktivnost v raztopinah jabolčnega soka z različnimi dodatki (JS, JS+AA, JS+I, JS+I+AA, JS+ Cu^{2+} , JS+ Cu^{2+} +AA, JS+ Cu^{2+} +I, JS+ Cu^{2+} +I+AA), smo ugotavljali z merjenjem skupnih antioksidantov s spektrofotometrično metodo z uporabo Folin-Ciocalteaujevega (F-C) reagenta.

Slika 19 in preglednica 18 prikazujeta skupne antioksidante za posamezne raztopine jabolčnega soka iz 1. embalažne enote tekom časa izražene kot ekvivalent mmol/l klorogenske kisline. Rezultati za raztopine jabolčnega soka iz 2. embalažne enote so prikazani v prilogi M.



Slika 19: Skupni antioksidanti (ekvivalent klorogenske kisline (mmol/l)) v osmih raztopinah jabolčnega soka iz 1. embalažne enote.

- (1) raztopina jabolčnega soka brez dodatkov
- (2) raztopina jabolčnega soka z dodatkom askorbinske kisline*
- (3) raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca
- (4) raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline
- (5) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+}
- (6) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in askorbinske kisline
- (7) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca
- (8) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline

* askorbinska kislina je bila pri vseh jabolčnih raztopinah, z dodano askorbinsko kislino, dodana po stresanju

Na začetni dan priprav raztopin jabolčnega soka iz 1. embalažne enote je opazna razlika v skupnih antioksidantih med raztopinami z dodano AA po stresanju (od 1,86 do 1,91 mol/l klorogenske kisline) in raztopinami brez (od 1,45 do 1,50 mmol/l klorogenske kisline). 3. dan se je koncentracija skupnih antioksidantov znižala na 1,32 do 1,39 mmol/l klorogenske kisline, le raztopini $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}+\text{AA}$ in $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}+\text{I}+\text{AA}$ sta izstopali z 1,50 in 1,49 mmol/l klorogenske kisline. Raztopina $\text{JS}+\text{Cu}^{2+}+\text{I}+\text{AA}$ je imela 7. dan tudi višje skupne antioksidante od ostalih raztopin. Če na sliki 19 primerjamo pare rdečih (z dodatkom Cu^{2+}) in modrih (brez dodatka Cu^{2+}) stolpcev na posamezen dan, opazimo, da je v paru vedno višji rdeči stolpec. Se pravi, da imajo v parih raztopine z dodatkom Cu^{2+} vedno večje koncentracije skupnih antioksidantov, vendar so razlike v koncentracijah zelo majhne (slika 19, preglednica 18).

Preglednica 18: Skupni antioksidanti (ekvivalent klorogenske kisline (mmol/l)) raztopin jabolčnega soka z različnimi dodatki iz 1. embalažne enote.

klorogenska kislina (mmol/l) raztopine	dan 0**	dan3	dan 7
JS+Cu ²⁺ (5)	1,50	1,35 ± 0,04	1,32 ± 0,06
JS+Cu ²⁺ + AA (6)	1,86	1,50 ± 0,04	1,41 ± 0,03
JS+Cu ²⁺ + I (7)	1,49	1,39 ± 0,04	1,39 ± 0,03
JS+Cu ²⁺ + I+ AA (8)	1,91	1,49 ± 0,05	1,50 ± 0,02
JS ⁽¹⁾	1,46	1,32 ± 0,03	1,30 ± 0,02
JS+AA ⁽²⁾	1,89	1,38 ± 0,04	1,37 ± 0,01
JS+I ⁽³⁾	1,45	1,32 ± 0,01	1,31 ± 0,01
JS+I + AA ⁽⁴⁾	1,88	1,37 ± 0,02	1,37 ± 0,05

(1) raztopina jabolčnega soka brez dodatkov

(2) raztopina jabolčnega soka z dodatkom askorbinske kisline*

(3) raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca

(4) raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline

(5) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+}

(6) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in askorbinske kisline

(7) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca

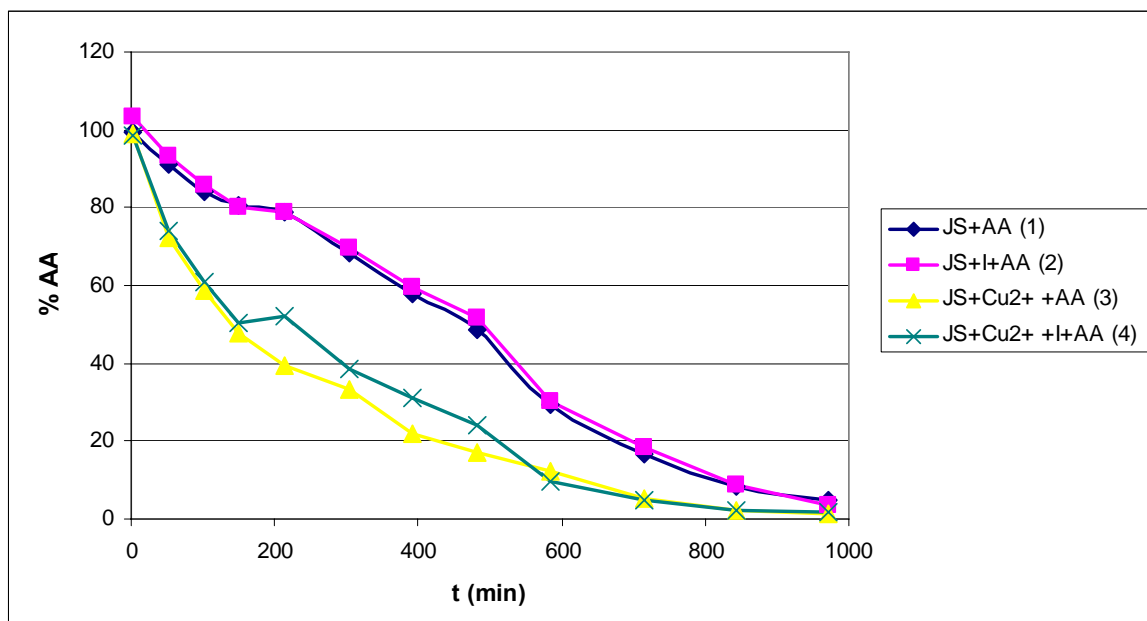
(8) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline

* askorbinska kislina je bila pri vseh jabolčnih raztopinah, z dodano askorbinsko kislino, dodana po stresanju

** na začetni dan pri merjenju skupnih antioksidantov v raztopinah jabolčnega soka nismo pripravili dveh paralelk

4.4 VPLIV IZMENJEVALCA, OBDELANEGA Z NaOH IN MODIFICIRANEGA S CITRONSKO KISLINO IN DODATKA Cu^{2+} NA STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V JABOLČNEM SOKU

Namen eksperimenta je bil ugotoviti, kako izmenjevalec z vezavo Cu^{2+} vpliva na obstojnost AA v jabolčnem soku. Zato smo osnovnim štirim raztopinam jabolčnega soka (JS, JS+I, JS+Cu²⁺, JS+Cu²⁺+I) dodali sveže pripravljeno AA ter spremljali razpad le-te. Začetna koncentracija AA v raztopinah je bila 100 mg/l. Slika 20 (priloga O) prikazuje deleže neoksidirane AA tekom časa.



Slika 20: Kinetika razpada askorbinske kisline (% glede na začetno koncentracijo) v raztopinah jabolčnega soka (JS+AA ⁽¹⁾, JS+I+AA ⁽²⁾, JS+Cu²⁺+AA ⁽³⁾ in JS+Cu²⁺+I+AA ⁽⁴⁾) iz 3. embalažne enote z dodano askorbinsko kislino (AA).

- ⁽¹⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom askorbinske kisline
- ⁽²⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline
- ⁽³⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in askorbinske kisline
- ⁽⁴⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline

Po dodatku AA raztopinam je le-ta razpadla v 16 urah. Pri raztopinah brez dodatka Cu^{2+} je bil razpad počasnejši (slika 20, priloga O). Izmenjevalec ni imel večjega vpliva na razpad AA.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Iz pšeničnih otrobov smo z obdelavo s H_2SO_4 in NaOH ter z modifikacijo s CA pripravili različne ionske izmenjevalce. Izkoristki pri pripravi izmenjevalcev so bili zelo različni (priloga A). Pri otrobih, modificiranih s CA, so bili izkoristki nad 100 %. Lahko sklepamo, da je to posledica vezane CA, ki je povečala težo otrobom. Pri izmenjevalcu $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$ je bil izkoristek največji (149 %), verjetno ker je predhodna obdelava z NaOH dala več prostih mest za vezavo CA na hidroksilne skupine polisaharidov. Pri otrobih, obdelanih samo z NaOH , je bil izkoristek samo 26 %, ker je prihajalo do velikih izgub pri spiranju, stiskanju in dekantiranju.

Otrobi, modificirani s CA, so imeli optimalno območje vezave Cu^{2+} pri pH 5,0 (slika 7), kar se ujema tudi z rezultati drugih raziskav (Low in sod., 2004; Sessa in Wing, 1999). Lahko predpostavljamo, da se je tem izmenjevalcem pri pH pod 3,5 zmožnost vezave zelo zmanjšala, ker so vodikovi ioni obdali površino izmenjevalcev in otežili dostop Cu^{2+} do vezavnih mest (Low in sod., 2004). Tudi pK_{a1} za CA je 3,15, zato je pri pH pod 3,5 malo karboksilnih skupin ioniziranih. pK_{a2} CA je 4,77, pK_{a3} pa 6,40, zato bi se moralo z višanjem pH ionizirati vedno več karboksilnih skupin in izmenjevalec bi moral vezati več Cu^{2+} . Pri pH 6,7 so izmenjevalci, modificirani s CA, slabše vezali Cu^{2+} , vendar so lahko ti rezultati nepravilni, saj smo opazili, da je kinetika vezave pri tem pH-ju počasnejša in je bilo zato 90 minut stresanja premalo, da bi dosegli ravnotežno stanje. Pri otrobih, ki niso bili obdelani s CA, se je delež vezanih Cu^{2+} večal s pH-jem. Izmenjevalec $\text{PO}+\text{H}_2\text{SO}_4$ je v primerjavi z izmenjevalcem $\text{PO}+\text{NaOH}$ pokazal boljše rezultate pri pH nad 4. Ravat in sod. (1999) ter Özer in sod. (2003), ki so karakterizirali dehidrirane pšenične otrobe s H_2SO_4 , so prav tako ugotovili, da se vezanje Cu^{2+} na pripravljene materiale večja z višanjem pH. Dehidrirani otrobi imajo dva večja tipa funkcionalnih skupin, ki lahko vežejo kovinske ione: karboksilne in fenolne funkcionalne skupine. Lignin je bogat s fenolnimi spojinami, vsebuje pa malo karboksilnih skupin (Ravat in sod., 1999). Mogoče se z višanjem pH fenolne skupine ionizirajo in vežejo Cu^{2+} . Pri pH 6,7 je morda prišlo do delnega usedanja Cu^{2+} v obliki bakrovega hidroksida, kateremu se z višanjem pH topnost manjša (Low in sod., 2004; Ravat in sod., 1999), zato so lahko podatki pri tem pH artefakti.

Izmenjevalca $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$ in $\text{PO}+\text{CA}$ sta imela pri različnih pH približno enako kinetiko vezave Cu^{2+} iz raztopin (slika 8 in 9). Le pri izmenjevalcu $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$ pri pH 6,7 je bila kinetika počasnejša. V prvih minutah so koncentracije nevezanega Cu^{2+} celo naraščale (preglednica 9). Vzrok za takšno delovanje izmenjevalca je lahko kompleksen in se naslanja na več dejavnikov, kot je topnost Cu^{2+} in nihanje pH-ja kot posledica obarjanja Cu^{2+} in vezanja Cu^{2+} na izmenjevalec in s tem sproščanja vodikovih ionov v raztopino (Low in sod., 2004; Toles in sod., 1997; Ravat in sod., 1999). Rezultati iz tega eksperimenta so pokazali, da 90 minut stresanja ni dovolj, zato smo podaljšali čas stresanja na 180 min, saj je iz slike razvidno, da so se deleži vezanega Cu^{2+} po tem času le malo

spreminjali. Ker nas je zanimalo predvsem delovanje izmenjevalcev v rahlo kislem območju, nismo več izvajali eksperimentov pri pH 6,7.

Iz slike 10 in preglednice 10 vidimo, da je imel izmenjevalec PO+NaOH+CA s koncentracijo 1 g/l (pH 5,0) najboljšo kapaciteto vezave Cu^{2+} . Pri koncentraciji Cu^{2+} 200 mg/l je vezal 62 % Cu^{2+} iz raztopine, kar je $(123,5 \pm 2,3)$ mg Cu^{2+} na g izmenjevalca. Za primerjavo lahko vidimo, da je kombinacija modificiranih materialov lan/bombaž : 75/25 pri raziskovanju Marshall in sod. (2006) s koncentracijo 10 g/l, pri 300 mg/l ali 600 mg/l Cu^{2+} , pri pH 4,8 vezala $(73,7 \pm 3,8)$ mg Cu^{2+} na g izmenjevalca. Moramo upoštevati, da so bili v tem raziskovanju materiali modificirani z 0,6 mol/l CA, medtem ko v našem primeru pa z 1 mol/l CA. Prejšnje raziskave so pokazale, da pri večji koncentraciji CA, ki jo uporabimo za modificiranje materialov, dosežemo večjo kapaciteto vezave na izmenjevalec. Kapaciteta vezave pri sojinih tropinah modificiranih z 1,2 mol/l CA je bila $(155,1 \pm 4,4)$ mg Cu^{2+} na g izmenjevalca (Marshall in sod., 1999), pogoji eksperimenta pa so bili enaki kot pri raziskovanju Marshall in sod. (2006). Sessa in Wing (1999) sta pripravila ionski izmenjevalec iz posušenih zrn koruze po destilaciji. Zrna sta modificirala s CA. Pri koncentraciji izmenjevalca 10 g/l, 100 mg/l Cu^{2+} in pH 4,5 je izmenjevalec vezal $(66,1 \pm 9,5)$ mg Cu^{2+} na g izmenjevalca. Padec kapacitete vezave je bil najbolj opazen pri pH 3,6, kar je najverjetneje posledica tega, da je pri tem pH-ju najmanj ioniziranih skupin.

Pri majhni koncentraciji Cu^{2+} 1 mg/l sta izmenjevalca PO+NaOH+CA in PO+CA ne glede na pH učinkovito vezala Cu^{2+} , in sicer od 91 % do 97 % (slika 12). Večanje koncentracije izmenjevalcev ni imelo velikega vpliva na deleže vezanih Cu^{2+} . Za bolj kvalitetne rezultate bi potrebovali boljši instrument z nižjo mejo detekcije, saj smo pri tem eksperimentu morali vzorce koncentrirati, kar je zagotovo vplivalo na pravilnost meritev.

CA je prisotna v živilskih matriksih, predvsem sadju. Ker je dober kelator, smo preverili, ali bi lahko konkurirala izmenjevalcu za vezavo Cu^{2+} . V prisotnosti proste CA sta tako izmenjevalca slabše vezala Cu^{2+} (slika 13, preglednica 12). Učinkovitost izmenjevalca PO+NaOH+CA je bila pri koncentraciji 1 g/l in pH 5,0 le 28,5 % v primerjavi z izmenjevalcem brez dodane proste CA (preglednica 13). Vezanje Cu^{2+} je bilo učinkoviteje pri večjih koncentracijah izmenjevalca (slika 13, preglednica 12). Iz rezultatov lahko sklepamo, da imata izmenjevalca večjo afiniteto do Cu^{2+} kot prosta CA. To vidimo, ko je bilo pri koncentraciji izmenjevalca PO+NaOH+CA 2 g/l z dodatkom CA 3 g/l, vezanih približno 50 % Cu^{2+} na izmenjevalec, čeprav je bila koncentracija CA na izmenjevalcu zagotovo precej manjša kot pa koncentracija proste CA. Lahko se Cu^{2+} močneje vežejo na CA vezano na izmenjevalcu kot na prosto CA ali pa se je CA kovalentno vezani na izmenjevalec spremenil pKa in ima pri določenem pH več ioniziranih karboksilnih skupin kot prosta CA. Dobro bi bilo določiti dejanski delež CA, vezane na izmenjevalec npr. titrimetrično. Znani koncentraciji izmenjevalca v MQ vodi bi dodali določeno količino NaOH. pH ne bi smel presežati 10,5, saj bi lahko prihajalo do deesterifikacije CA na izmenjevalcu. Po vzpostavljenem ravnotežju bi titriral raztopino s HCl do nevtralizacije (Sessa in Wing, 1999). Kot standard bi vzeli CA. Kot kontrolo bi imeli izmenjevalec NaOH.

Prisotnost Ca^{2+} v raztopini je na izmenjevalca PO+CA in PO+NaOH+CA drugače vplivala kot pa prisotnost CA (sliki 13 in 14). Opazno je, da so imeli Ca^{2+} večji vpliv na vezavo

Cu^{2+} pri izmenjevalcu PO+NaOH+CA (pH 3,6) kot pri izmenjevalcu PO+CA (pH 5,0). Morda ima izmenjevalec PO+CA pri pH 5,0 še kakšna druga vezavna mesta (npr. proteine) za vezavo Ca^{2+} , tako da je bila koncentracija Ca^{2+} v raztopini manjša in je ta manj vplival na vezavo Cu^{2+} . Če bi določili koncentracijo prostega Ca^{2+} po dodatku izmenjevalcev, bi morda lahko to hipotezo potrdili.

Izbran izmenjevalec PO+NaOH+CA, ki je pokazal najboljše rezultate, smo preizkusili na jabolčnem soku. Jabolčni sok je vseboval zelo malo Cu^{2+} ($0,10 \pm 0,01$) mg/l (preglednica 16), kar je na meji detekcije za ASS. Za bolj natančne meritve pri tem eksperimentu bi potrebovali boljšo metodo ali boljši instrument za merjenje Cu^{2+} . Je pa izmerjena vrednost po dodatku ustrezala dejanskemu dodatku Cu^{2+} 1 mg/l. Z izmenjevalcem smo uspeli vezati pri sokovih z dodatkom Cu^{2+} 22 % le-tega, pri sokovih brez dodatka Cu^{2+} pa 10 % Cu^{2+} . Vzroki za tako majhne vezave so lahko prisotna CA in ostali kovinski ioni v jabolčnem soku, ki vplivajo na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalec ter nekoliko nižji pH soka (3,47), kot je bil tisti, pri katerem smo delali v modelnih raztopinah.

Pričakovali smo, da bo Cu^{2+} zaradi pospeševanja oksidacije pospešil neencimsko porjavenje jabolčnega soka. Raziskave so bile že narejene na modelnih raztopinah (Es-Safi in sod., 2002; Gülşen in sod., 2006) in ugotovili so, da so reakcije porjavenja ob prisotnosti Cu^{2+} potekale intenzivneje. Znano je tudi, da se polifenoli v sadnih produktih med staranjem spreminjajo v reakcijah oksidacij in polimerizacij, ki med drugim vodijo tudi do porjavenja. V prvih dneh skladiščenja jabolčnega soka pri 55 °C so rezultati meritev absorbanc pokazali, da je dodatek Cu^{2+} v veliki meri upočasnjeval porjavenje soka (preglednica 17, slika 15). Viden je bil tudi učinek izmenjevalca, ki smo ga dodali v jabolčni sok. Tako je bila v primerih z dodanim izmenjevalcem in posledično najmanjšo koncentracijo Cu^{2+} hitrost porjavenja največja. Dodatek AA ni značilno vplival na hitrost porjavenja. Po več mesecih skladiščenja pa so sokovi, katerim je bil dodan Cu^{2+} , postali temnejši (slika 17 in 18). Pri sokovih brez dodatka Cu^{2+} pa se je pojavila oborina. Lahko bi preverili, kako bi potekalo porjavenje pri nižjih oziroma višjih (pasterizacija) temperaturah skladiščenja. Potrebno bi bilo tudi identificirati, katere so barvne komponente, ki so hitreje nastajale, ko je bilo prisotnega manj Cu^{2+} . To bi lahko naredili s pomočjo HPLC. Iz slike 16 lahko bi lahko sklepali, da so snovi, ki so hitreje nastajale brez prisotnosti dodanih Cu^{2+} imele absorpcijske maksimume pri 380 in 440 nm. Morda je Cu^{2+} inhibiral polimerizacijo barvnih komponent soka, ki so na začetku v sokovih brez dodatka Cu^{2+} temneje obarvale sok, kasneje pa so se ti polimeri oborili, medtem ko so nastale barvne komponente v sokovih z dodatkom Cu^{2+} ostale topne. Za bolj podrobno študijo bi morali spremljati obarvanost in antioksidante med celotnim skladiščenjem.

Dodatek Cu^{2+} ni vplival na zmanjševanje vsebnosti antioksidantov v jabolčnem soku. Med 7- oziroma 11-dnevnim skladiščenjem pri 55 °C (slika 19, preglednica 18, priloga M) se vsebnost antioksidantov ni bistveno spremenila. Izjema so raztopine soka, katerim smo dodali AA. Pri teh raztopinah smo opazili hitro zmanjševanje antioksidativne aktivnosti. Pri spremljanju kinetike razpada dodane AA v raztopinah jabolčnega soka, se je AA oksidirala v 16 urah, tako v primerih, ko smo dodali Cu^{2+} , ali ko jih nismo (slika 20, priloga O). To se tudi ujema z raziskovanjem Poredoš (2006), kjer se je 528 mg/l AA pri pH 3 in ob prisotnosti 0,6 mg/l Cu^{2+} oksidiralo v roku 24 ur. V našem primeru so

oksidacijo pospešile še druge prisotne kovine. V primerih, ko smo dodali Cu^{2+} je oksidacija potekala hitreje. Izmenjevalec ni imel večjega vpliva.

Kljub relativno majhnim razlikam med posameznimi meritvami pa je zanimivo, da smo v primerljivih parih (z in brez dodatka Cu^{2+}) po koncu inkubacije določili večjo antioksidativno aktivnost v primerih, ko so bili dodani Cu^{2+} (slika 19, preglednica 18, priloga M). Da bi to zanesljivo potrdili, bi morali pripraviti več paralelk.

5.2 SKLEPI

Na osnovi opravljenega dela lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Otrobi, modificirani s CA, so bili v rahlo kislem območju pH bolj učinkoviti kot ostali izmenjevalci. Lahko sklepamo, da je to posledica karboksilnih funkcionalnih skupin, ki so jih otrobi pridobili s kovalentnim vezanjem CA. Optimalen pH za vezavo Cu^{2+} je bil pri pH 5,0, kjer so vezali od 84 % do 92 % Cu^{2+} .
- Učinkovitost otrobov, ki niso bili obdelani s CA, se je večala s pH. Pri pH 6,7 so vezali od 79 % do 94 % Cu^{2+} . Pri tem pH je morda prišlo do delnega usedanja Cu^{2+} v obliki bakrovega hidroksida, zato so lahko podatki pri tem pH artefakti.
- Izmenjevalca PO+NaOH+CA in PO+CA sta imela pri pH 3,6 in pH 5,0 približno enako kinetiko vezave Cu^{2+} iz raztopin. Pri izmenjevalcu PO+NaOH+CA (pH 6,7) je bila kinetika počasnejša.
- Izmenjevalec PO+NaOH+CA (pH 5,0) je imel najboljšo kapaciteto vezave Cu^{2+} . Večjo kapaciteto vezave smo dosegli pri večji koncentraciji Cu^{2+} . Pri koncentraciji Cu^{2+} 200 mg/l je vezal ($123,5 \pm 2,3$) mg Cu^{2+} na g izmenjevalca. Pri pH 3,6 je bila kapaciteta vezave precej nižja, kar je najverjetneje posledica tega, da je pri tem pH manj ioniziranih karboksilnih skupin.
- Pri majhni koncentraciji Cu^{2+} 1 mg/l sta izmenjevalca PO+NaOH+CA in PO+CA, ne glede na pH, učinkovito vezala Cu^{2+} . Večanje koncentracije izmenjevalcev ni imelo večjega vpliva.
- V prisotnosti proste CA, ki je dober kelator kovinskih ionov, sta izmenjevalca slabše vezala. Najbolj učinkovit je bil izmenjevalec PO+NaOH+CA (pH 5,0). Vezanje Cu^{2+} je bilo učinkoviteje pri večjih koncentracijah izmenjevalca. Izmenjevalca sta imela večjo afiniteto do Cu^{2+} kot prosta CA.
- Prisotnost Ca^{2+} je zmanjšala učinkovitost izmenjevalcev, saj so ti ioni tekmovali z Cu^{2+} za vezavna mesta. Najboljše rezultate je pokazal izmenjevalec PO+NaOH+CA (pH 5,0). Kljub precej višji koncentraciji Ca^{2+} v primerjavi s koncentracijo Cu^{2+} je uspel pri 4 g/l izmenjevalca vezati 84 % Cu^{2+} .
- Izmenjevalec PO+NaOH+CA je iz jabolčnega soka s majhno koncentracijo Cu^{2+} (0,10 mg/l) uspel vezati 10 % Cu^{2+} . Vzroki za tako majhne vezave so lahko prisotna CA in ostali kovinski ioni v jabolčnem soku, ki vplivajo na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalec in nekoliko nižji pH soka (3,47), kot je bil tisti, pri katerem smo delali v modelnih raztopinah.
- V prvih dneh skladiščenja jabolčnega soka pri 55 °C, je dodatek Cu^{2+} v jabolčnih raztopinah v veliki meri upočasnjeval porjavenje soka. V primerih z dodanim izmenjevalcem in posledično najmanjšo koncentracijo Cu^{2+} je bila hitrost porjavenja največja. Dodatek AA ni značilno vplival na hitrost porjavenja. Med večmesečnim skladiščenjem pa so sokovi, katerim je bil dodan Cu^{2+} , postali temnejši. Pri sokovih brez dodatka Cu^{2+} se je pojavila oborina. Za bolj podrobno analizo bi morali spremljati absorbance in antioksidante med celotnim skladiščenjem.

- Dodatek Cu^{2+} ni vplival na zmanjševanje vsebnosti antioksidantov v jabolčnem soku. Med 7- oziroma 11-dnevnim skladiščenjem pri $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ se vsebnost antioksidantov ni bistveno spremenila. Le pri raztopinah, katerim smo dodali AA, smo opazili hitro zmanjševanje antioksidativne aktivnosti.
- Pri spremljanju kinetike razpada dodane AA v raztopinah jabolčnega soka smo ugotovili, da se je le-ta v vseh primerih oksidirala v 16-ih urah.

6 POVZETEK

Odpadni rastlinski materiali iz živilsko predelovalne industrije so lahko z ustrezno obdelavo poceni alternativa komercialnim ionskim izmenjevalcem za vezanje kovinskih ionov iz vodnih raztopin.

Iz pšeničnih otrobov smo z obdelavo s CA in H_2SO_4 pripravili različne kationske izmenjevalce in izračunali izkoristke pri pripravi. Pri eksperimentih smo koncentracijo prostih Cu^{2+} v raztopini določali z AAS.

Preverili smo, kako na delovanje pripravljenih izmenjevalcev vpliva pH. Iz živilsko-tehnološkega vidika so nas zanimali predvsem tisti, ki so dobro delovali v rahlo kislem pH in tu so dobre rezultate pokazali otrobi, modificirani s CA, saj so pri pH 5,0 vezali od 84 % do 92 % Cu^{2+} . Dobro delovanje v nižjem pH lahko pripišemo karboksilnim funkcionalnim skupinam, ki so jih otrobi pridobili s kovalentnim vezanjem CA. Pri naslednjih eksperimentih smo se omejili na izmenjevalca PO+NaOH+CA, ki je v območju med pH 3,6 in pH 5,6 pokazal najboljše rezultate in PO+CA, katerega priprava je bila najmanj zahtevna.

Izmenjevalca sta imela pri pH 3,6 in pH 5,0 približno enako kinetiko vezave Cu^{2+} iz raztopin.

Izmenjevalec PO+NaOH+CA je imel pri pH 5,0 najboljšo kapaciteto vezave Cu^{2+} . Pri začetni koncentraciji Cu^{2+} 200 mg/l je vezal ($123,5 \pm 2,3$) mg Cu^{2+} na g izmenjevalca. Pri pH 3,6 je bila kapaciteta vezave precej nižja, kar je najverjetneje posledica tega, da je pri tem pH manj ioniziranih skupin.

Pri majhnih začetnih koncentraciji Cu^{2+} 1 mg/l sta izmenjevalca PO+NaOH+CA in PO+CA, ne glede na pH, učinkovito vezala Cu^{2+} . Večanje koncentracije izmenjevalcev ni imelo večjega vpliva.

V prisotnosti proste CA ali Ca^{2+} je učinkovitost izmenjevalcev padla, kar smo tudi pričakovali saj je CA dober kelator in je tekmovala z izmenjevalcem za vezanje Cu^{2+} , Ca^{2+} pa so kot dvovalentni ioni tekmovali z Cu^{2+} za vezavna mesta na izmenjevalcu. Najbolj učinkovit je bil izmenjevalec PO+NaOH+CA pri pH 5,0. Rezultati so pokazali, da je imel izmenjevalec večjo afiniteto do Cu^{2+} kot CA. V prisotnosti velike koncentracije Ca^{2+} je izmenjevalec PO+NaOH+CA pri koncentraciji 4 g/l uspel vezati 84 % Cu^{2+} .

Izmenjevalec PO+NaOH+CA, ki se je izkazal kot najbolj učinkovit, smo preizkusili na jabolčnem soku. Iz jabolčnega soka s majhno koncentracijo Cu^{2+} (0,10 mg/l) je uspel vezati 10 % Cu^{2+} , kar je bilo v okviru pričakovanj. Vzroki za tako majhne vezave so lahko prisotna CA in ostali kovinski ioni v jabolčnem soku, ki vplivajo na vezavo Cu^{2+} na izmenjevalec in nekoliko nižji pH soka (3,47), kot je bil tisti, pri katerem smo delali v modelnih raztopinah.

V prvih dneh skladiščenja jabolčnega soka pri 55 °C je dodatek Cu^{2+} v jabolčnih raztopinah v veliki meri upočasnjeval porjavenje soka. Porjavenje soka smo spremljali na UV-vis spektrofotometru. V primerih z dodanim izmenjevalcem in posledično najmanjšo koncentracijo Cu^{2+} je bila hitrost porjavenja največja. Dodatek AA ni značilno vplival na

hitrost porjavenja. Med skladiščenjem pa so sokovi, katerim je bil dodan Cu^{2+} , postali temnejši. Pri sokovih brez dodatka Cu^{2+} se je pojavila oborina.

Pri spremljanju antioksidativne aktivnosti jabolčnega soka s spektrofotometrično metodo z uporabo Folin-Ciocalteaujevega (F-C) reagenta, smo opazili hitro zmanjševanje antioksidativne aktivnosti pri raztopinah, katerim je bila dodana AA. Dodatek Cu^{2+} ni imel vpliva.

Pri spremljanju kinetike razpada dodane AA v raztopinah jabolčnega soka smo ugotovili, da se je le-ta v vseh primerih oksidirala v 16-ih urah.

Z obdelavo pšeničnih otrobov s CA smo uspeli pripraviti ionske izmenjevalce, ki so imeli veliko afiniteto do Cu^{2+} ionov. V relativno nizkem območju pH so bili ti učinkoviti do pH 3,6, pod pH 3,6 pa je učinkovitost strmo padla. Čeprav smo uspeli odstraniti 10 % Cu^{2+} iz jabolčnega soka, to ni imelo večjega vpliva na barvo ter na skupno antioksidativno aktivnost.

Glede na uspešne rezultate v modelnih raztopinah, bi bil izmenjevalec $\text{PO}+\text{NaOH}+\text{CA}$ lahko učinkovit pri čiščenju industrijskih odplak in voda s previsokimi koncentracijami kovinskih ionov. Drug način uporabe bi lahko bil pri akutnih zastrupitvah živali s težkimi kovinami. Ker so pšenični otrobi primerni tudi v človeški prehrani, bi lahko na tako pripravljen izmenjevalec vezali ustrezne minerale in otrobe dodali npr. kruhu in tako pripravili obogateno živilo. To so samo razmišljanja, ki lahko odprejo nova poglavja v raziskovanju uporabnosti ionskih izmenjevalcev iz pšeničnih otrobov.

7 VIRI

- Ahmedna M., Marshall W.E., Hussein A.A., Rao R.M., Goktepe I. 2004. The use of nutshell carbons in drinking water filters for removal of trace metals. *Water Research*, 38: 1062–1068
- Almeida Neves E., Oliveira A., Pires Fernandes A., Nóbrega J.A. 2007. Simple and efficient elimination of copper(II) in sugar-cane spirits. *Food Chemistry*, 101: 33–36
- Amersham Biosciences. 2008. Ion exchange chromatography: principles and methods. BuCAinghamshire, Amersham Biosciences
http://teachline.ls.huji.ac.il/72682/Booklets/AMERSHAM_ion_exchangeManual.pdf (julij 2008): 162 str.
- Barberá R., Farré R., Lagarda M.J. 2003. Copper: Physiology. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 3. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Fingles P.M. (eds). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 1634-1647
- Belitz H.-D., Grosch W. 1999. *Food chemistry*. 2nd ed. Berlin, Springer-Verlag: 992 str.
- Cigić B., Rudan Tasič D. 2006. Antioksidanti in prooksidanti. V: *Karcinogene in antikarcinogene snovi v živilih*. 24. Bitenčevi živilski dnevi '06, Ljubljana, 9-10 nov. 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103-116
- Dexter J.E., Sarkar A.K. 2003. Flour: roller milling operations. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 4. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Fingles P.M. (eds). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 2535-2543
- DuHamel D., Graczyk K. 1997. Ion exchange. Troy, Rensselaer Polytechnic Institute. (april 1997)
<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IONEX/kathy.html> (junij 2008): 8 str.
- Es-Safi N.-E., Cheynier V., Moutounet M. 2003. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system. *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 153-163
- Gülşen A., Turan B., Makris D.P. 2007. Copper(II)-mediated biomimetic oxidation of quercetin: generation of a naturally occurring oxidation product and evaluation of its in vitro antioxidant properties. *European Food Research Technology*, 225: 435–441
- Hagena S.F., Borge G.I.A., Bengtsson G.B., Bilger W., Berge A., Haffner K., Solhaug K.A. 2007. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 1-10

Inglezakis V.J., Pouloupoulos S.G. 2006. Adsorption, ion exchange and catalysis: design of operations and environmental applications. Amsterdam, Elsevier: 602 str.

Ion exchange processes. 1998. Naperville, Nalco Chemical Company
<http://www.onlinewatertreatment.com/literature/Nalco/docs/Tf-024.pdf> (julij 2008): 8 str.

Konietzug U., Greiner R. 2003. Phytic acid: properties and determination. V: Encyclopedia of food science and nutrition. Vol. 7. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Fingles P.M. (eds). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4546-4555

Lazarini F., Brenčič J. 1989. Splošna in anorganska kemija. 2. natis. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 557 str.

Low K.S., Lee C.K., Mak S.M. 2004. Sorption of copper and lead by citric acid modified wood. Wood Science and Technology, 38: 629–640

Marshall W.E., Wartelle L.H., Boler D.E., Johns M.M., Toles C.A. 1999. Enhanced metal adsorption by soybean hulls modified with citric acid. Bioresource Technology, 69: 263-268

Marshall W.E., Akin D.E., Wartelle L.H., Annis P.A. 2007. Citric acid treatment of flax, cotton and blended nonwoven mats for copper ion absorption. Industrial Crops and Products, 26: 8-13

Morello M.J., Franz S.L. 2005. Beverages having L-ascorbic acid with stability of color and clarity. US Patent 6911223: 11 str.

Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: Encyclopedia of food science and nutrition. Vol. 7. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Fingles P.M. (eds). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4507-4514

Otten J.J., Pitz Hellwig J., Meyers L.D. 2006. Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements. Washington, D.C., The National Academies Press: 543 str.

Özer A., Özer D., Özer A. 2003. The adsorption of copper(II) ions on to dehydrated wheat bran (DWB): determination of the equilibrium and thermodynamic parameters. Process Biochemistry, 39: 2183–2191

Paiva-Martins F., Santos V., Mangericão H., Gordon M.H. 2006. Effect of copper on the antioxidant activity of olive polyphenols in bulk oil-in-water emulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 3738-3743

Parkin K.L., Damodaran S. 2003. Oxidation of food components. V: Encyclopedia of food science and nutrition. Vol. 7. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Fingles P.M. (eds). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4288-4294

Piva A., Di Mattia C., Neri L., Dimitri G., Chiarini M., Sacchetti G. 2008. Heat-induced chemical, physical and functional changes during grape must cooking. *Food Chemistry*, 106: 1057-1065

Poredoš T. 2006. Stabilnost askorbinske in dehidroaskorbinske kisline v vodnih raztopinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54 str.

Ravat C, Dumonceau J., Monteil-Rivera F. 2000. Acid/base and Cu(II) binding properties of natural organic matter extracted from wheat bran: Modeling by the surface complexation model. *Water Research*, 34: 1327-1339

Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izdaja. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 215 str.

Schröter W., Lautenschläger K.-H., Bibr CA H., Schnabel A. 1993. *Kemija: splošni priročnik*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 712 str.

Sessa D.J, Wing R.E. 1999. Metal chelation of corn protein products: citric acid derivatives generated via reactive extrusion. *Industrial Crops and Products*, 10: 55–63

Toles C. A., Marshall W. E, Johns M. M. 1997. Granular activated carbons from nutshells for the uptake of metals and organic compounds. *Carbon*, 35: 1407-1414,

Xu X., Pin S., Shedlo CA J., Harris Z.L. 2005. Copper. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Fingles P.M. (eds). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 471-476

Zagorodni A.A. 2007. *Ion exchange materials: properties and applications*. Amsterdam, Elsevier: 477 str.

Zitterman A. 2003. Dietary fibre: bran. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 3. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Fingles P.M. (eds). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 1844-1850

ZAHVALA

Za vodenje in strokovno pomoč pri nastanku diplome se iskreno zahvaljujem doc. dr. Blažu Cigiću. Posebno hvala tudi za podajanje znanja in dobre nasvete.

Najlepša hvala recenzentki doc. dr. Lei Pogačnik in somentorju doc. dr. Rajku Vidrihu za nasvete in strokovni pregled diplomske naloge. Za poučevanje in podporo se zahvaljujem univ.dipl. kem. Petru Brne.

Zahvaljujem se univ. dipl. inž. Ivici Hočevnar za referiranje diplomskega dela in strokovne napotke. Zahvala gre tudi univ. dipl. bibl. Barbari Slemnik za pomoč pri zbiranju literature.

Za pomoč in potrpljenje pri delu v laboratoriju se zahvaljujem osebju Katedre za kemijo. Dr. Alenki Levart in osebju laboratorija Katedre za prehrano na Oddelku za zootehniko se zahvaljujem za omogočenje in pomoč pri določanju Cu^{2+} v raztopinah na ASS. Prav tako se zahvaljujem doc. dr. Andreju Plestenjaku in univ. dipl. inž. Mariji Simončič za pomoč pri pripravi pšeničnih otrobov za obdelavo.

Še posebej bi se rada iz srca zahvalila staršem in fantu, ki so me v vseh pogledih podpirali tekom študija. HVALA!

PRILOGE

Priloga A: Izkoristki pri pripravi izmenjevalcev.

izmenjevalec	$m_{\text{začetna}}$ (g)	$m_{\text{končna}}$ (g)	izkoristek (%)
PO+H ₂ O	42,1	25,96	61,7
PO+H ₂ O+CA	15,58	17,61	113,0
PO+CA	210,57	216,44	102,8
PO+NaOH	150	38,76	25,8
PO+NaOH+CA	55	82,13	149,3
PO+H ₂ SO ₄	91,9	44,96	48,9

Priloga B: Deleži vezanih Cu^{2+} iz vodnih raztopin na pšenične otrobe, sprane z vodo (PO+H₂O); pšenične otrobe, obdelane z NaOH (PO+NaOH); pšenične otrobe sprane z vodo in modificirane s citronsko kislino (PO+H₂O+CA); pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA); pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA) in pšenične otrobe, dehidrirane s H₂SO₄ (PO+H₂SO₄), pri različnih pH.

pH	% vezanih Cu^{2+}					
	PO+H ₂ O	PO+NaOH	PO+H ₂ O+CA	PO+NaOH+CA	PO+CA	PO+H ₂ SO ₄
3,25	0,0	2,6	29,4	38,0	24,8	0,5
3,6	0,0	15,8	76,0	84,0	72,7	7,6
4	1,7	19,8	82,4	89,8	82,1	25,7
5	12,5	21,1	92,1	91,4	83,5	40,7
5,6	18,0	22,6	87,1	90,0	83,8	64,7
6,7	79,4	93,6	72,9	71,2	61,4	90,4

Priloga C: Povprečje in standardni odklon izmerjenih pH-jev v vodnih raztopinah pšeničnih otrobov, spranih z vodo (PO+H₂O); pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH (PO+NaOH); pšeničnih otrobov spranih z vodo in modificiranih s citronsko kislino (PO+H₂O+CA); pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA); pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA) in pšeničnih otrobov, dehidriranih s H₂SO₄ (PO+H₂SO₄), po stresanju.

raztopine z izmenjevalci	pH					
	3,25	3,6	4,0	5,0	5,6	6,7
PO+H ₂ O	3,33± 0,01	3,68± 0,03	4,08± 0,01	5,02± 0,01	5,58± 0,01	6,79± 0,01
PO+NaOH	3,35± 0,01	3,69± 0,03	4,08± 0,01	5,03± 0,01	5,59± 0,01	6,79± 0,01
PO+H ₂ O+CA	3,21± 0,01	3,59± 0,02	4,01± 0,01	4,94± 0,01	5,41± 0,01	6,68± 0,01
PO+NaOH+CA	3,17± 0,01	3,56± 0,01	3,99± 0,01	4,91± 0,01	5,37± 0,01	6,65± 0,01
PO+CA	3,20± 0,01	3,59± 0,01	4,01± 0,01	4,95± 0,01	5,41± 0,01	6,68± 0,01
PO+H ₂ SO ₄	3,24± 0,02	3,61± 0,01	4,03± 0,01	4,98± 0,01	5,51± 0,01	6,76± 0,01

Priloga D: Deleži vezanih Cu^{2+} iz vodnih raztopin na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA), pri različnih časih.

čas (min)	% Cu^{2+}				
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+NaOH+CA pH 6,7	PO+CA pH 3,6	PO+CA pH 5,0
5	26,1	26,8	50,8	13,1	16,4
10	40,4	37,2	45,1	25,3	27,9
20	63,5	59,0	38,2	42,8	46,4
40	76,5	78,9	53,1	62,0	68,7
90	84,9	90,3	73,0	76,1	86,2
180	88,1	94,8	85,6	81,0	92,9
360	89,4	96,2	93,4	82,8	95,1
1440	89,7	97,2	97,7	84,1	96,1

Priloga E: Povprečni pH raztopin po stresanju pri kinetiki vezave Cu^{2+} na pšenične otrobe, obdelane z NaOH in modificirane s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšenične otrobe, modificirane s citronsko kislino (PO+CA).

raztopine z izmenjevalci	pH
PO+NaOH+CA pH 3,6	3,60± 0,02
PO+NaOH+CA pH 5,0	4,93± 0,04
PO+NaOH+CA pH 6,7	6,66± 0,01
PO+CA pH 3,6	3,61± 0,01
PO+CA pH 5,0	4,94± 0,01

Priloga F: Povprečje nevezanih Cu^{2+} v raztopinah pri kapaciteti vezave Cu^{2+} pri pšeničnih otrobih, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobih, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA).

začetna konc. Cu^{2+} (mg/l)	Cu^{2+} (mg/l)		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
50	10,5± 0,2	3,8± 0,0	5,8± 0,2
100	37,8± 1,6	13,5± 1,3	19,9± 0,7
200	125,0± 0,7	76,5± 1,4	93,6± 1,1

Priloga G: Povprečni pH raztopin po stresanju pri kapaciteti vezave Cu^{2+} pri pšeničnih otrobih, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobih, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA).

začetna konc. Cu^{2+} (mg/l)	pH		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
50	3,52± 0,01	4,96± 0,04	4,93± 0,01
100	3,42± 0,04	4,89± 0,03	4,90± 0,05
200	3,29± 0,04	4,84± 0,01	4,83± 0,03

Priloga H: pH raztopin po stresanju pri vezavi majhnih koncentracij Cu^{2+} z različnimi koncentracijami pšeničnih otrobov, obdelanih z NaOH in modificiranih s citronsko kislino (PO+NaOH+CA) in pšeničnih otrobov, modificiranih s citronsko kislino (PO+CA).

izmenjevalec (g/l)	pH		
	PO+NaOH+CA pH 3,6	PO+NaOH+CA pH 5,0	PO+CA pH 5,0
1	3,67	5	4,93
2	3,61	4,94	4,88
4	3,56	4,85	4,83

Priloga I: pH raztopin po stresanju jabolčnega soka iz 1. embalažne enote brez dodatkov (JS), z dodatkom izmenjevalca (JS+I), z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I).

raztopine jabolčnega soka	pH
JS	3,45
JS+I	3,48
JS+ Cu^{2+}	3,46
JS+ Cu^{2+} +I	3,49

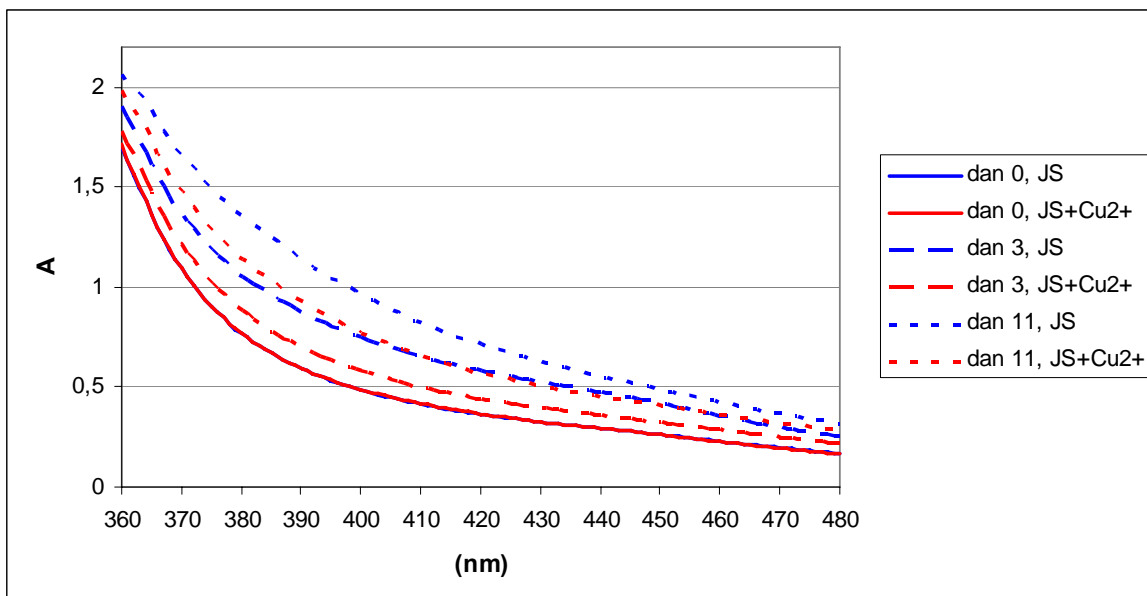
Priloga J: pH raztopin po stresanju jabolčnega soka iz 2. embalažne enote brez dodatkov (JS), z dodatkom izmenjevalca (JS+I), z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I).

raztopine jabolčnega soka	pH
JS	3,46
JS+I	3,49
JS+ Cu^{2+}	3,49
JS+ Cu^{2+} +I	3,50

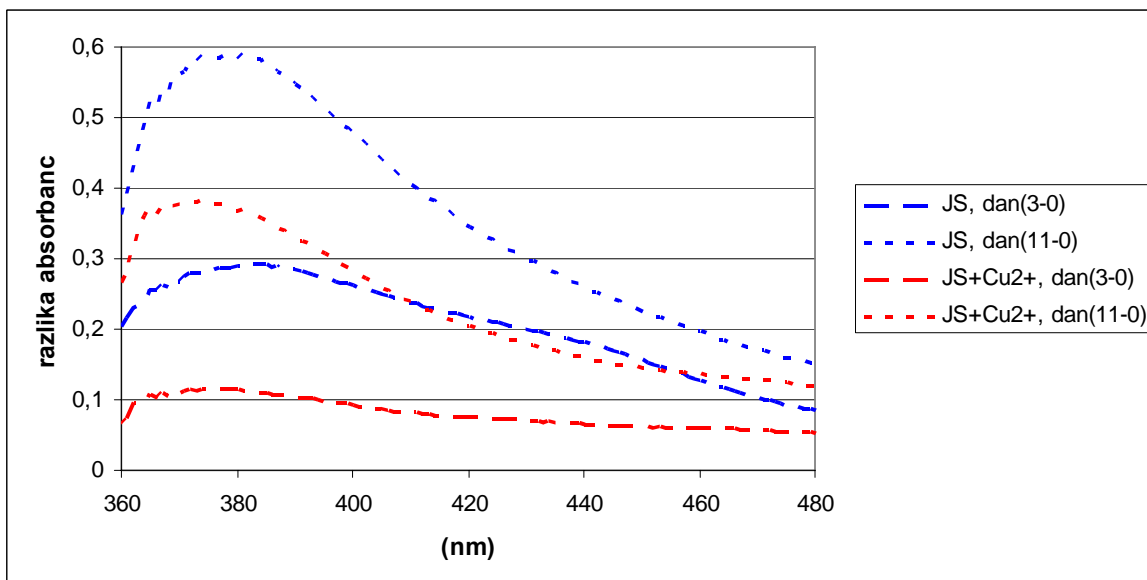
Priloga K: pH raztopin po stresanju jabolčnega soka iz 3. embalažne enote brez dodatkov (JS), z dodatkom izmenjevalca (JS+I), z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca (JS+ Cu^{2+} +I).

raztopine jabolčnega soka	pH
JS	3,47
JS+I	3,49
JS+ Cu^{2+}	3,48
JS+ Cu^{2+} +I	3,50

Priloga L: Barvni spekter raztopin jabolčnega iz 2. embalažne enote z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in brez dodatkov (JS) (začetni, 3. in 11. dan).



Priloga M: Diferenčni graf raztopin jabolčnega soka iz 2. embalažne enote z dodatkom Cu^{2+} (JS+ Cu^{2+}) in brez dodatkov (JS) (razlika absorbanc tretjega in začetnega dneva ter enajstega in začetnega dneva).

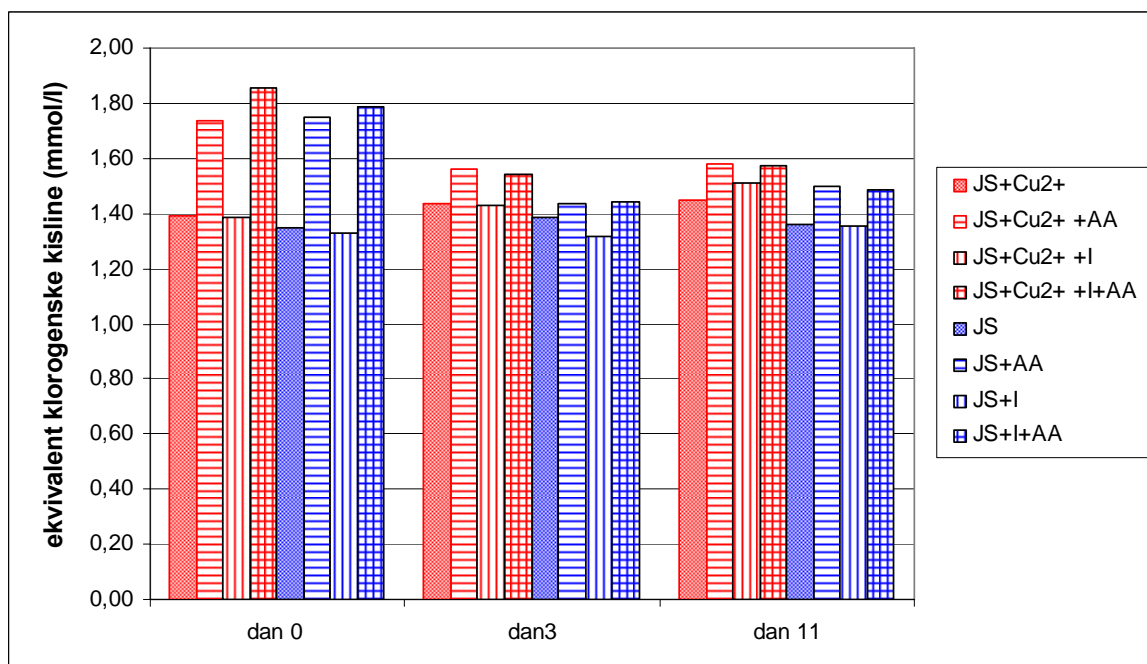


Priloga N: Skupni antioksidanti (ekvivalent klorogenske kisline (mmol/l)) raztopin jabolčnega soka iz 2. embalažne enote v preglednici in sliki.

raztopine \ klorogenska kislina (mmol/l)	dan 0	dan3	dan 11
JS ⁽¹⁾	1,35	1,39	1,36
JS+AA ⁽²⁾	1,75	1,44	1,50
JS+I ⁽³⁾	1,33	1,32	1,35
JS+I+AA ⁽⁴⁾	1,79	1,44	1,49
JS+Cu ²⁺ ⁽⁵⁾	1,39	1,44	1,45
JS+Cu ²⁺ +AA ⁽⁶⁾	1,74	1,56	1,58
JS+Cu ²⁺ +I ⁽⁷⁾	1,39	1,43	1,51
JS+Cu ²⁺ +I+AA ⁽⁸⁾	1,86	1,54	1,58

- (1) raztopina jabolčnega soka brez dodatkov
 (2) raztopina jabolčnega soka z dodatkom askorbinske kisline*
 (3) raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca
 (4) raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline
 (5) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+}
 (6) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in askorbinske kisline
 (7) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in izmenjevalca
 (8) raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline

* askorbinska kislina je bila pri vseh jabolčnih raztopinah, z dodano askorbinsko kislino, dodana po stresanju



Priloga O: Kinetika razpada askorbinske kisline (% glede na začetno koncentracijo) v raztopinah jabolčnega soka iz 3. embalažne enote z dodano askorbinsko kislino (AA) (JS+AA⁽¹⁾, JS+I+AA⁽²⁾, JS+Cu²⁺+AA⁽³⁾ in JS+Cu²⁺+I+AA⁽⁴⁾).

AA (mg/l) t (min)	JS+AA	JS+I+AA	JS+Cu ²⁺ +AA	JS+Cu ²⁺ +I+AA
3	99	102	98	98
52	90	92	71	73
101	84	85	58	60
150	80	79	47	50
213	78	78	39	52
304	68	69	33	38
393	57	59	22	31
482	48	51	17	24
585	29	30	12	10
714	16	18	5	5
843	8	9	2	2
971	5	4	1	2

- ⁽¹⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom askorbinske kisline
⁽²⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} , izmenjevalca in askorbinske kisline
⁽³⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom Cu^{2+} in askorbinske kisline
⁽⁴⁾ raztopina jabolčnega soka z dodatkom izmenjevalca in askorbinske kisline

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Adriana BAN

**PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA IONSKIH
IZMENJEVALCEV IZ ODPADNIH RASTLINSKIH
MATERIALOV ZA VEZAVO Cu^{2+} IZ VODNIH
RAZTOPIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008