

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Ana Mandura

930/PI

**UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA
POLIFENOLNE SPOJEVE
POGAČE ULJANE REPICE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Klare Kraljić. Diplomski rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa“ (IP-2016-06-3789).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA POLIFENOLNE SPOJEVE POGAČE ULJANE REPICE

Ana Mandura, 930/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj vremena i tipa mljevenja (uz/bez kriohlađenja) na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva u pogači uljane repice. Nakon proizvodnje ulja, dobivena pogača usitnjena je na kriomlinu bez i s hlađenjem pomoću tekućeg dušika kroz 2, 4, 8 i 12 minuta. U samljevenim pogačama određeni su slobodni i vezani polifenolni spojevi te tanini pomoću kromatografskih i spektrofotometrijskih metoda, nakon čega im je određena antioksidacijska aktivnost. Rezultati su pokazali da način mljevenja ima značajan utjecaj na koncentraciju polifenolnih spojeva. Mljevenjem uz hlađenje koncentracija slobodnih polifenola se smanjila, a koncentracija vezanih povećala. Nasuprot tome, koncentracija tanina nije ovisila o načinu mljevenja već o duljini mljevenja. HPLC metodom detektiran je sinapin kao dominantni polifenolni spoj pogače uljane repice u udjelu većem od 70 %. Rezultati antioksidacijske aktivnosti znatno su oscilirali te nije utvrđen značajan utjecaj tretmana ni duljine mljevenja na koncentraciju polifenola.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, kriomljevenje, pogača uljane repice, polifenoli, tanini

Rad sadrži: 64 stranice, 17 slika, 12 tablica, 144 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan i u elektroničnom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Klara Kraljić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv.prof.dr.sc. Dubravka Novotni
2. doc.dr.sc. Klara Kraljić
3. doc.dr.sc. Nikolina Čukelj
4. doc.dr.sc. Marko Obranović (zamjena)

Datum obrane: 20. srpnja, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

IMPACT OF CRYOMILLING ON PHENOLIC COMPOUNDS OF RAPESEED CAKE

Ana Mandura, 930/PI

Abstract: The aim of this study was to determine the impact of time and milling type (with/without cryocooling) on composition and concentration of rapeseed cake phenolics. After the oil production, expeller extracted rapeseed cake was grounded on cryomill with or without liquid nitrogen cooling for 2, 4, 8 and 12 minutes. Free and bound phenolic compounds, as well as tannins, were determined in milled cake samples using chromatographic and spectrophotometric methods. In addition, antioxidant activity of produced cakes was also investigated. Results showed significant impact of milling type on phenolic concentration. Cryocooling decreased concentration of free phenolic compounds, increasing the bound phenolics at the same time. However, milling type had no significant impact on the tannin concentration unlike milling time that increased tannin concentration during longer process. Sinapin, the dominant phenol derivate in rapeseed cake, was detected using HPLC contributing to more than 70 % of phenolic content. Results of antioxidant activities oscillated significantly, having no statistical impact of the time and type of milling on the polyphenols.

Keywords: antioxidant activity, cryomill, phenolic compounds, rapeseed cake, tannins

Thesis contains: 64 pages, 17 figures, 12 tables, 144 references

Original in: Croatian

Graduate thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Klara Kraljić, Assistant professor

Reviewers:

1. PhD. Dubravka Novotni, Associate professor
3. PhD. Klara Kraljić, Assistant professor
2. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant professor
3. PhD. Marko Obranović, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 20th of July, 2018.

Sadržaj.....stranica

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Sjeme uljane repice	2
2.1.1. Biološka klasifikacija, sastav i sorte.....	2
2.1.2. Proizvodnja i upotreba uljane repice	3
2.2. Proizvodnja i sastav ulja.....	4
2.3. Pogača i sačma uljane repice.....	5
2.3.1. Kemijski sastav i upotreba pogača i sačmi.....	5
2.3.2. Nutritivne komponente pogače uljane repice	7
2.3.2.1. Proteini	7
2.3.2.2. Ugljikohidrati	8
2.3.2.3. Polifenoli.....	9
2.3.3. Antinutritivne komponente pogače uljane repice.....	11
2.3.3.1. Glukozinolati.....	11
2.3.3.2. Tanini	12
2.3.3.3. Sirova vlakna.....	13
2.3.3.4. Fitinska kiselina	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali.....	14
3.2. Metode rada.....	14
3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u sjemenu i pogači	14
3.2.2. Određivanje udjela masti u sjemenu i pogači.....	15
3.2.3. Određivanje udjela proteina u sjemenu i pogači	16
3.2.4. Određivanje mineralnih tvari u sjemenu i pogači.....	17
3.2.5. Mljevenje pogače kriomlinom	17
3.2.6. Ekstrakcija nepolarnih komponenti	18
3.2.7. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva.....	18
3.2.8. Ekstrakcija vezanih fenolnih spojeva	19
3.2.9. Ekstrakcija tanina	20
3.2.10. Određivanje sastava masnih kiselina pomoću GC-a	20
3.2.11. Određivanje udjela ukupnih polifenola Folin – Ciocalteau metodom.....	21
3.2.12. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva pomoću HPLC-a	22
3.2.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti slobodnih i vezanih polifenola.....	24
3.2.13.1. DPPH metoda.....	24
3.2.13.2. ABTS metoda.....	25
3.2.13.3. FRAP metoda	26
3.2.14. Određivanje koncentracija tanina spektrofotometrijskom metodom.....	26
3.2.15. Statistička obrada	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. Kvaliteta sjemena i pogače uljane repice	28
4.2. Sastav masnih kiselina	30
4.3. Koncentracija i sastav polifenolnih spojeva	32
4.4. Koncentracija tanina.....	41
4.5. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata polifenolnih spojeva.....	42
5. ZAKLJUČCI.....	51
6. LITERATURA	52

1. UVOD

Uljana repica (*Brassica napus* subsp. *Oleifera*) je primarna uljarica i jedna od najvažnijih industrijskih biljaka u svijetu. Intenzivnijim korištenjem od sredine 20. st. za proizvodnju ulja, tradicionalne sorte repice su selektivno zamijenjene kanola sortama (**Canadian Oil Low Acid**) sa smanjenim udjelom glukozinolata ($< 30 \mu\text{mol g}^{-1}$) i eruka masne kiseline ($< 2 \%$) (Shahidi, 1990).

Maksimalno iskorištenje nastalog nusprodukta u proizvodnji ulja – sačme/pogače od velike je važnosti, a smatra se kvalitetnim izvorom proteina s izbalansiranim omjerom aminokiselina, u udjelu oko 30 %. Iako je u kanola sortama postignut zakonski prihvatljiv udio eruka masne kiseline i goitrogenih glukozinolata, pogača je i dalje prihvatljiva samo za stočnu prehranu. Visoki udio sirovih vlakana, tanina i fitata u nastalom nusproduktu smanjuje biološku dostupnost proteina i mineralnih tvari te narušava senzorske osobine (Kozłowska i sur., 1975).

Uljana repica je izrazito bogata polifenolima koji zbog polarnog karaktera uglavnom zaostaju u pogačama i sačmama, čineći ih vrlo dobrim izvorima antioksidanasa poput fenolnih kiselina i njihovih derivata, od kojih je dominantni sinapin. Prisutnost tih spojeva daje repičinoj pogači i sačmi veliki antioksidacijski kapacitet koji se sve više istražuje u cilju njihove izolacije, a kojom bi se poboljšala i probavljivost tih nusprodukata, otvarajući mogućnost njihove višestruke upotrebe u prehrambenoj industriji.

Pod pretpostavkom da različit stupanj usitnjenosti utječe na sastav i koncentraciju ekstraktibilnih fenolnih spojeva, u ovom radu je primijenjen predtretman kriomljevenja na pogači uljane repice. Mljevenjem uz hlađenje sprječava se gubitak termolabilnih komponenti i zadržava kvaliteta sirovine. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj načina i vremena mljevenja na sastav i koncentraciju polifenolnih spojeva pogače uljane repice.

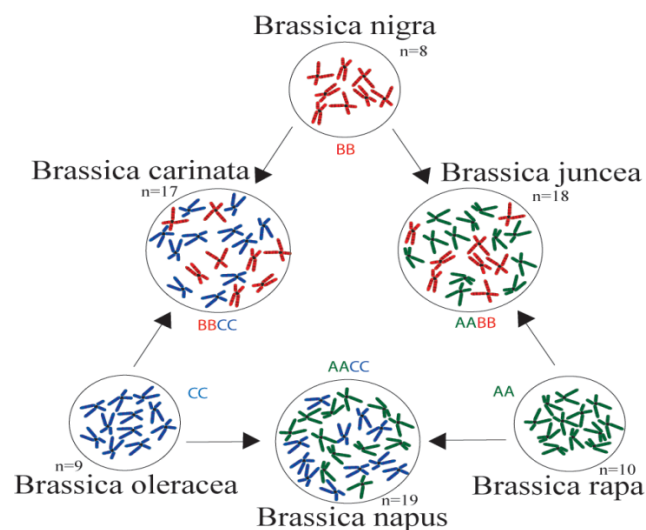
2. TEORIJSKI DIO

2.1. SJEME ULJANE REPICE

2.1.1. Biološka klasifikacija, sastav i sorte

Uljana repica (*Brassica napus* subsp. *Oleifera*) je najrašireniji predstavnik reda *Capparales*, porodice *Brassicaceae*, roda *Brassica*. Radi se o zeljastoj biljci sa sjemenom promjera 1,5-2,5 mm čija boja varira od crne do crvenkasto-smeđe ili žute. Nastala je spontanom hibridizacijom između ogrštice (*Brassica rapa* L., sin. *Campestris*) i kupusa (*Brassica oleracea* L.) (Darlington i La Cour, 1945).

Studije Morinage (1934) opisale su genomski odnos između *Brassica* vrsta i njihovih diploidnih predaka „U“ trokutom na kojem se uočavaju i srodne vrste: smeđa gorušica *B. juncea* L. i kupus *B. carinata* L. Upravo su hibridi poslužili kao polazište u oplemenjivanju uljane repice s poželjnim karakteristikama.



Slika 1. Genomski odnos između *Brassica* vrsta (Nahagaru, 1935)

Sjeme uljane repice sadrži oko 40 % ulja i 38-43 % proteina zaostalih u sačmi dok ljuska pridonosi sa 16,5 – 18,7 % ukupnoj masi sjemena. Udio vlage je oko 8 % (Shahidi, 1990). Tradicionalne sorte sadrže čak 26-60 % eruka kiseline neprikladne za prehranu i 0,1-0,2 % glukozinolata u sačmi koji umanjuju njezinu nutritivnu vrijednost (Abrehdari i sur., 2015).

Selekcijom, tradicionalne sorte zamijenjene su novima repice u cilju smanjenja eruka kiselina i povećanja udjela ulja.

Zero „0“ sorta prvi put je proizvedena u Kanadi 1968. g., a karakterizira ju sniženi udio eruka masne kiseline do 5 % (Shahidi, 1990).

Daljnjom modifikacijom uz rad poljskog znanstvenika Bronowskog, dobivena je sorta s još nižim udjelom i eruka kiselina u ulju i glukozinolata u odmašćenoj sačmi, a poznatija je kao double zero „00“ sorta. Naziv „kanola“ (**Canadian Oil Low Acid**) usvojen je u Kanadi 1979. g. isključivo za „00“ sorte, a prema definiciji, odnosi se na sortu repice koja sadrži manje od 2 % eruka kiselina u ulju i manje od 30 $\mu\text{mol g}^{-1}$ jednog ili kombinacije četiriju poznatih alifatskih glukozinolata u odmašćenoj sačmi. Nadalje, 1985. g. FDA ju je usvojila kao specifičnu sortu i dodijelila joj GRAS status (Shahidi, 1990). 1976. g. razvijena je i „000“ sorta koju karakterizira nizak udio eruka kiselina, glukozinolata i vlakana, s karakteristikama *B. napus* i *B. campestris* (Abrehdari i sur., 2015).

Sjeme kanole sadrži 42-43 % ulja i 20-30 % sirovih proteina. Na sastav utječe izbor sorte, uvjeti uzgoja (vlažnost tla, toplo/hladno vrijeme) i termin žetve. Udio proteina je uglavnom obrnuto proporcionalan s udjelom ulja u sjemenu (Spragg i Mailer, 2007; Newkirk, 2009; Barthelet i Daun, 2011).

2.1.2. Proizvodnja i upotreba uljane repice

Najraniji uzgoj tradicionalnih sorti repice veže se uz Indiju, Kinu i Japan dok se u Zapadnoj Europi počela intenzivno iskorištavati za proizvodnju ulja tek nakon 2. svjetskog rata. Od 1945. g., proizvodnja repičinog ulja intenzivno raste, osobito u Kanadi, Aziji i sjevernoj Europi (Shahidi, 1990).

Danas, uljana repica zauzima 3. mjesto u svjetskoj proizvodnji ulja, odmah iza palminog i sojinog ulja. Ukupno je 30,2 milijuna hektara zasađenih uljanom repicom s tendencijom rasta potaknutim povećanjem udjela energije iz obnovljivih izvora. Kina, Indija i Kanada predvode uzgojem s 54,2 % svjetske proizvodnje dok zemlje Europske Unije na čelu s Njemačkom imaju 34,2 % udjela od ukupne proizvodnje (FAOSTAT, 2014), zahvaljujući modifikaciji i sposobnosti prilagodbe ove biljke različitim klimatskim uvjetima.

U Hrvatskoj, glavina proizvodnje smještena je u istočnoj Slavoniji pri čemu je u razdoblju od 2012.-2016. korišteno 26 406 – 112 990 hektara (Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, 2017).

Ljetne (jare) sorte uzgajaju se u hladnijim predjelima, u Kanadi i sjevernoj Kini dok su zimske (ozime) dominantne u zapadnoj Europi i ostatku Kine. Kanola uzgajana u hladnijim uvjetima ima veću koncentraciju ulja i klorofila za razliku od sjemena iz suhih i toplijih krajeva (Barthet i Daun, 2011).

Repičino ulje koristi se u proizvodnji biodizela, maziva i aditiva, a u prehrambenoj industriji je vrlo česta komponenta biljnih ulja, margarina i masti. Nusprodukt sačma koristi se za hranidbu stoke u udjelu od 8-20 % (Pospišil, 2013).

2.2. PROIZVODNJA I SASTAV ULJA

Sirovo repičino ulje¹ proizvodi se najčešće kombinacijom predprešanja i ekstrakcije. Proces koji prethode su čišćenje, mljevenje i kondicioniranje. Sjeme najprije odlazi na mljevenje kroz glatke i metalne ploče, a pri čemu dolazi do rupture stanične stijenke i posljedično efikasnijeg predprešanja i naknadne ekstrakcije, pošto se potiče izdvajanje kapljica ulja i omogućuje kontakt ulja s otapalom. Sljedeća faza je kondicioniranje, tj. zagrijavanje sjemena uz podešavanje udjela vode. Odvija se u kondicioneru podijeljenom na 5-8 indirektno grijanih sekcija s pojedinačnom rotirajućom mješalicom u cilju ravnomjernog zagrijavanja. Toplinskom pripremom pri 80 °C, narušava se gel struktura eleoplazme, smanjuje viskoznost ulja te inaktivira nepoželjna mirozinaza koja hidrolizira glukozinolate na različite derivate (Reynolds i Youngs, 1964).

U fazi predprešanja, odvaja se 60-70 % ukupne količine ulja, a dobivena pogača odlazi na ekstrakciju heksanom u cilju što većeg iskorištenja. U konačnici, ovakvim procesom je moguće izdvojiti oko 95 % ukupnog ulja iz sjemena. Iz dobivene sačme i ulja se uklanjaju zaostaci heksana koji odlazi na rekuperaciju.

Kako bi dobili jestivo rafinirano repičino ulje, sirovo ulje prolazi predrafinaciju - degumiranje i rafinacijske faze: neutralizaciju (najčešće natrijevom lužinom) u cilju uklanjanja slobodnih masnih kiselina i postupak bijeljenja za uklanjanje zaostataka sapuna, teških metala, fosfolipida i drugih komponenti pomoću adsorbensa. Posljednja faza

¹ Ulje dobiveno iz kanola sorte

rafinacije ulja je deodorizacija tj. uklanjanje hlapljivih sastojaka neugodnog okusa i mirisa u vakuumu, destilacijom vodenom parom (Unger, 1990).

Drugi načini proizvodnje ulja su hladno prešanje i dvostruko prešanje (Adams i sur., 2006; Spragg i Mailer, 2007; Newkirk, 2009).

Hladnim prešanjem, proces izdvajanja odvija se bez prethodnog zagrijavanja sjemena, a proizvodnja se mora provesti na temperaturi od maksimalno 50 °C. Naprotiv, Kraljić i sur. (2013) naglašavaju pozitivan učinak kondicioniranja prije samog prešanja na kvalitativan i kvantitativan sastav bioaktivnih komponenti, pritom dobivajući ulje sa 7 puta većim udjelom fenolnih spojeva i povećanim udjelom kanolola u odnosu na hladno prešano ulje iz istog sjemena.

Ukoliko se prešanje odvija uz kondicioniranje, bitno je optimalno postaviti parametre vođenja procesa: temperaturu i vlagu. Toplinskom pripremom sjemena na 80 °C, prevenira se hidroliza glukozinolata i posljedično koncentriranje toksičnih derivata u pogači (Newkirk, 2009).

Sastav masnih kiselina u ulju čini: 53-60 % mononezasićene oleinske kiseline, 19-23 % polinezasićene linolne kiseline i 8-12 % polinezasićene linoleinske, uz nizak udio zasićenih masnih kiselina (< 5 %). Valja napomenuti da repičino ulje ima optimalan omjer omega-6 i omega-3 masnih kiselina, a dostatne količine fitosterola i tokoferola čine ga stabilnim prema oksidacijskim promjenama (Matthäus, 2013). Uspoređujući sa sjemenom drugih uljarica, uljana repica sadrži veće količine fenolnih spojeva (Naczki i sur., 1998).

2.3. POGAČA I SAČMA ULJANE REPICE

2.3.1. Kemijski sastav i upotreba pogača i sačmi

Uz ulje, prešanjem sjemena dobije se pogača, a daljnom ekstrakcijom ulja iz pogače zaostane visokovrijedan proteinski nusprodukt - sačma. Sastav pogača i sačmi varira među sortama, ovisno o genetskim karakteristikama i uvjetima uzgoja (Xu i Diosady, 2013).

Predprešanjem, u pogači zaostane 15-22 % ulja koja se ponovno melje, kondicionira i ekstrahira u cilju većeg iskorištenja proizvodnje ulja. Dobivena sačma odlazi na tostiranje, tj. termičku obradu radi uklanjanja zaostatata otapala pomoću pare pri 130 °C. Nakon sušenja i hlađenja, dobivena sačma se granulira i peletizira za skladištenje. U Kanadi i drugim zemljama, koristi se kao pristupačan proteinski suplement za supstituciju sojine sačme u stočnoj hrani (Xu i Diosady, 2013). U prosjeku, sačma sadrži 34,7 %

sirovih proteina, 12,9 % sirovih vlakana, 2,2 % masti i 32,5 % nedušične ekstraktivne tvari (Grbeša, 2004).

Tablica 1. Kemijski sastav pogače i sačme uljane repice i soje (Rac, 1964)

Uljarica	Nusproizvod	Voda (%)	Proteini (%)	Masti (%)	Nedušične ekstrahirane tvari (%)	Celuloza (%)
Repičina	pogača	10-13	30-34	6-11	27-30	10-13
	sačma	8-10	33-37	0,8-1,5	30-35	11-14
Sojina	sačma	8-12	44-51	0,7-1,0	27-30	5-6

Iz Tablice 1. vidimo da sojina sačma ima veći udio proteina, što je ujedno i razlog njenog uzgoja. Međutim, u pogači i sačmi uljane repice također je prisutna značajna količina proteina izbalansiranog aminokiselinskog profila s visokim potencijalom šire primjene u prehrambenoj industriji (Xu i Diosady, 2013).

Komparativno, sačma uljane repice, u odnosu na sojinu sačmu, bogatija je pojedinim mineralnim tvarima poput Ca, Mg, P, S, Mn, Fe i Se. Od vitamina sadrži vitamin E, niacin, biotin, riboflavin, piridoksin i folnu kiselinu (National Academy Press, 1982). Usporedno s drugim uljaricama, uljana repica ima značajno više fenolnih spojeva koji uglavnom zaostaju u sačmi nakon proizvodnje ulja (Nowak i sur., 1992; Koski i sur., 2003). Najzastupljeniji fenolni spojevi su fenolne kiseline i kondenzirani tanini (Naczki i sur., 1998).

Međutim, prisutnost nepoželjnih komponenti poput glukozinolata, sirovih vlakana, fitata, fenolnih kiselina i tanina koji utječu na manju probavljivost, nižu energetska vrijednost i pojavu negativnih senzorskih osobina, ograničava upotrebu sačme za ljudsku konzumaciju (VanEtten i sur., 1969; Uppström i Svensson, 1980; Sosulski, 1979; Krygier i sur., 1982; Xu i Diosady, 1997). Ipak, oplemenjivačkim tehnikama postignuta je niža koncentracija sirovih vlakana i glukozinolata u kanola sjemenu s istovremenim porastom udjela proteina, vitamina i mineralnih tvari, što je utjecalo na poboljšanu probavljivost aminokiselina i ugljikohidrata (Newkirk, 2009).

Treba napomenuti kako sačma uljane repice ima znatno veću ekonomsku važnost od pogače, pošto se repičino ulje uglavnom proizvodi kombinacijom predprešanja i ekstrakcije.

2.3.2. Nutritivne komponente pogače uljane repice

2.3.2.1. Proteini

Najznačajniji makronutrijenti u pogači/sačmi repice su proteini. Imaju strukturnu (gradivne komponente staničnih membrana), enzimsku (katalizatori kemijskih reakcija) i skladišnu funkciju, a najzastupljeniji su skladišni proteini bez enzimske aktivnosti (Appelqvist, 1972). Sastavom esencijalnih aminokiselina; leucina, izoleucina, lizina, fenilalanina, triptofana i valina, slični su profilu soje, osim što imaju veći udio metionina i treonina naspram nje (Ohlson i Anjou, 1979). Kvaliteta proteina mjerena prema netto iskorištenju proteina (NPU²) i omjeru djelotvornosti proteina (PER³) slična je kazeinu (Lo i Hill, 1971).

Prema studijama, većina proteina repice su klasificirani u albumine topljive u vodi i globuline topljive u otopinama soli, a čine oko 70 % njihovog ukupnog udjela (Appelqvist, 1972; Bhatti i sur., 1968; Schwenke i sur., 1981; Raab i Schwenke, 1984). Ostale proteinske frakcije čine prolamini i glutelini (Aider i Barbana, 2011).

Najznačajniji skladišni proteini važnih funkcionalnih svojstava su napin, kruciferin i, manjim udjelom, oleosin. Napin spada u albuminsku frakciju alkalnog karaktera, niske je molekulske mase i ima dobra svojstva pjenjenja. Kruciferin je neutralan protein iz skupine globulina sa svojstvima želiranja (Aider i Barbana, 2011). Oleosin obuhvaća 2-8 % ukupnog udjela proteina (Huang, 1992).

Iako se od 1970. g. razvijaju različite metode u svrhu dobivanja proteinskih koncentrata iz uljane repice, nijedna nije implementirana u prehrambenoj industriji (Xu i Diosady, 2013). Razlozi su niska ekonomičnost i narušavanje proteinske topljivosti uslijed intenzivnih tretmana, a s ciljem detoksifikacije pogače od glukozinolata i fenolnih komponenti (Jones i Holme, 1979).

U dobivanju proteinskih izolata ima većeg pomaka, a intenzivna istraživanja su još u tijeku. Alkalna ekstrakcija natrijevom lužinom pokazala se učinkovitom po pitanju ekonomičnosti i iskorištenju, pošto se iz laboratorijskih uzoraka pogače uspješno ekstrahirati 90 % ukupnih proteina u samom izolatu (Gillberg i Törnell, 1976; Finlayson i sur., 1976; Tzeng i sur., 1990). Kod komercijalnih, tj. prethodno tostiranih uzoraka, ekstrakcija je bila znatno manje učinkovita (Tzeng i sur., 1990; Igor i sur., 1993).

² NPU = TD * BV/ 100; TD – stvarna probavljivost, BV – biološka probavljivost (Herceg i Režek, 2006)

³ PER = omjer povećanja mase testiranih skupina u rastu, po količini primljenih proteina (Herceg i Režek, 2006)

Kromatografskom metodom detektiran je velik broj proteina raspona relativnih molekulskih masa od 130 00 do 320 000 Da (Lönnerdal i sur., 1977). Takav kompleksan sastav potaknuo je istraživanja vezana za ispitivanje funkcionalnih svojstava poput topljivosti, emulgiranja i pjenjenja (Xu i Diosady, 2013).

Khatab i Arntfield (2009) su ustanovili da poboljšana sposobnost apsorpcije i zadržavanja vode proteinskog izolata repice ukazuje na velik kapacitet vezanja vode u prehrambenim proizvodima, poboljšavajući tako senzorske karakteristike i redukciju udjela vode u proizvodu. Bitno je uzeti u obzir prisutnost vlakana koji bi mogli pridonijeti ukupnom kapacitetu zadržavanja vode.

Visoka topljivost proteina i kapacitet adsorpcije masne faze su u pozitivnoj korelaciji sa sposobnošću formiranja i stabiliziranja emulzija (Khatab i Arntfield, 2009). Dev i Mukherjee (1986) su ustanovili da proteini repice imaju niži emulgirajući kapacitet, ali daju veću emulzijsku stabilnost naspram sojinih. Također, proteinski izolati imaju bolja emulgirajuća svojstva od proteinskih koncentrata (McCurdy, 1990). Prema nekim istraživanjima, prisutnost albuminske frakcije - napina narušava stabilnost emulzije (Wu i Muir, 2008).

Svojstva pjenjenja repičinih proteina dokazano su bolja od sojinih, dok su se proteinski izolati istaknuli u stabilnosti pjene (Naczki i Diosady, 1985).

U usporedbi sa sojom, niti sirovi niti toplinski tretirani proteini repice nisu pokazali zadovoljavajuća svojstva geliranja, a razlog je mala molekularna masa što onemogućava stvaranje unakrsnih i kompleksnih veza unutar gela (Khatab i Arntfield, 2009; Oakenfull i sur., 1997).

2.3.2.2. Ugljikohidrati

Ovi makronutrijenti čine manji dio sastava sjemene uljane repice. Mogu se kategorizirati u topljive šećere, netopljive šećere i vlakna. Topljivi ugljikohidrati su dobro probavljivi u animalnom traktu. Čine ukupno 7-12 % udjela suhe tvari u pogači, tj. sačmi (Feedipedia, 2012).

Od topljivih šećera, prisutne su saharoza, rafinoza, stahioza, glukoza i fruktoza u ukupnom udjelu od 10 % (Barthet i Daun, 2011). Udio škroba tijekom rasta biljke se smanjuje pa je konačan udio svega oko 2,5 % (Bell, 1993).

2.3.2.3. Polifenoli

Fenolni spojevi su biološki aktivne tvari sastavljene od najmanje jednog aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih supstituenata. Spadaju u sekundarne biljne metabolite te su široko rasprostranjeni u ljudskoj prehrani (Čović i sur., 2009).

Polifenoli su učinkoviti antioksidansi jer sadrže aromatski prsten s hidroksilnim skupinama koje mogu primiti elektron, stabilizirajući pritom slobodne radikale (Scalbert i sur., 2005). Provedeno je mnogo studija koja su ustanovila poveznicu između unosa hrane bogate polifenolima i smanjenog rizika od kardiovaskularnih bolesti, nekih vrsta karcinoma i slično, pa su im pripisana antikancerogena i protuupalna djelovanja.

Mogu se grupirati u fenolne kiseline, flavonoide, izoflavonoide, lignane, stilbene i kompleksne fenolne polimere (Dewick, 2001). Najzastupljeniji fenolni spojevi u uljaricama su fenolne kiseline, tj. derivati hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina, kumarini, flavonoidi, i lignini dok uljana repica uglavnom sadrži derivate hidroksicimetnih kiselina i kondenzirane tanine (Kozłowska i sur., 1990; Naczki i sur., 1998).

Sjeme uljane repice ima najveći sadržaj fenolnih komponenti od sjemena svih uljarica (Nowak i sur., 1992). Njihova koncentracija se povećava sazrijevanjem sjemena, a lokalizacija se mijenja ovisno o stadiju razvoja biljke (Naczki i sur., 1998). Zrelo i crno sjeme koncentrira polifenole u sjemenoj ljusci i supki (dio embrija) (Artz i sur., 1986).

Usporedno sa sojinom sačmom, repičina ima čak 5 puta veći udio fenolnih kiselina koje u konačnici pridonose tamnijoj boji, gorčini i neprobavljivosti proteina repice (Clandinin, 1961; Malcolmson i sur., 1978; Sosulski, 1979; Ismail i sur., 1981; Shahidi i Naczki, 1992). Oksidirani fenolni produkti mogu formirati komplekse s esencijalnim aminokiselinama i proteinima, umanjujući nutritivnu vrijednost (Naczki i sur., 1998). Osim interakcije s proteinima, mogu inhibirati pojedine probavne enzime (Finot, 1983).

Usprkos negativnim utjecajima polifenola, sve se više istražuje potencijal ekstrahiranih polifenola iz sačme kao zamjene za sintetske antioksidanse. Studije su pokazale izvrsnu antioksidacijsku aktivnost izoliranih fenolnih spojeva, a koja ovisi o vrsti uljarice iz koje je sačma dobivena i otapalu korištenom za ekstrakciju (Amarowicz i sur., 2000). Sinapinska kiselina se pokazala kao inhibitor peroksida u proizvodima s većom količinom masti te emulzijama, ukazujući na potencijal oksidativne stabilizacije različitih prehrambenih proizvoda (Pekkarinen i sur., 1999).

Najzastupljeniji fenolni spojevi uljane repice, kao što je već navedeno su esterificirane, slobodne i vezane fenolne kiseline (Krygier i sur., 1982). U fenolne kiseline

ubrajamo derivate hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojevim derivatima pripadaju galna, vanilinska, siringinska, *m*-hidroksibenzojeva, *p*-hidroksibenzojeva kiselina dok hidroksicimetne čine sinapinska, ferulinska, kavska, klorogenska, *o*-kumarinska, *p*-kumarinska kiselina. Ukupna koncentracija ovisi o sorti, načinu proizvodnje ulja, uvjetima uzgoja i stupnju zrelosti sjemena, a varira između 6400 – 18400 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Kozłowska i sur., 1990).

Slobodne fenolne kiseline čine do 15 % ukupnih fenolnih spojeva u sačmi. Sinapinska kiselina pridonosi 70-85 % slobodnih fenolnih kiselina, dok su od ostalih prisutne ferulinska, *o*-kumarinska, *p*-kumarinska i kavska (Shahidi i Naczek, 1992; Kozłowska i sur., 1983a; Kozłowska i sur., 1983b).

Esterificirane fenolne kiseline čine najveći udio ukupnih fenolnih kiselina. Dominira sinapin; kolin ester sinapinske kiseline, a također su izolirani glukopiranozil sinapat i fenol glukozid (Kozłowska i sur., 1990; Amarowicz i Shahidi, 1994). Druge fenolne kiseline poput vanilinske, siringinske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline mogu također biti u esterificiranom obliku (Kozłowska i sur., 1983b).

Sinapin se ističe po skladišnoj ulozi sinapinske kiseline i kolina, a tijekom sazrijevanja se hidrolizira radi potrebe biljke za sintezom lignina i flavonoida kojima je sinapinska kiselina prekursor. Oslobođeni kolin sudjeluje u metaboličkom ciklusu metilacije (Kozłowska i sur., 1990). U određenim uvjetima, unutar probavnog trakta može formirati trimetilamin koji daje miris po ribi, a što je posljedica inhibicije enzima trimetilamin oksidaze, zadužene za pretvorbu nepoželjnog trimetilamina u trimetilamin oksid (Zum Felde i sur., 2007; Bell, 1993). U konačnici, pridonosi gorkom okusu, nižoj probavljivosti i tamnijoj boji finalnih proizvoda. S ciljem redukcije sinapina u samom sjemenu, razvijen je genotip *B. napus* bez sinapina (Wolfram i sur., 2010).

Vezane fenolne kiseline dio su stanične stijenke, vjerojatno vezane za proteine i ugljikohidrate, a čine vrlo mali udio. Iz vezanih fenolnih frakcija oslobođena je sinapinska kiselina kao dominantna, te ferulinska, *p*-kumarinska i *o*-kumarinska kiselina (Kozłowska i sur., 1983b).

Alkalnom hidrolizom pomoću natrijeve lužine, možemo ekstrahirati esterificirane i vezane fenolne kiseline. Oko pH 2, prelaze iz ionske forme u oblik pogodan za ekstrakciju (Thiyam-Holländer i Schwarz, 2013).

2.3.3. Antinutritivne komponente pogače uljane repice

2.3.3.1. Glukozinolati

Prema ulozi i sastavu, glukozinolati su sekundarni metaboliti sastavljeni od β -D-tioglukoze, N-hidroksiminsulfata i varijabilnog pobočnog lanca strukture nalik pobočnom ogranku njegovog prekursora – aminokiselina triptofana, metionina, fenilalanina i dr. razgranatih aminokiselina (Sørensen, 1990; Bjerg i sur., 1987; Mithen i sur., 2000). Pronađeni su u biljkama reda *Capparales*, koji uključuje rod *Brassica*, a kojem pripadaju kupusnjače poput brokule i kupusa te uljana repica (Fenwick i sur., 1983). Identificirano je oko 120 glukozinolata, a njihov sastav i koncentracija variraju ovisno o genetskim i okolišnim čimbenicima (Kushad i sur., 1999).

Unutar subcelularnih odjeljaka biljne stanice, glukozinolati su kemijski stabilni i biološki inaktivni. Mehaničkim djelovanjem, preradom ili žvakanjem, dolazi do oštećenja staničnog tkiva i posljedično kontakta glukozinolata s enzimom mirozinazom – tioglukozid glikohidrolazom, što dovodi do hidrolize glukozidne veze u spoju. Rezultat je oslobođena glukoza i nestabilni intermedijer iz kojeg se spontanom degradacijom formiraju različiti razgradni produkti, poput cijanida, nitrila, oksazolidintionina i izotiocijanata – najproučavanijeg spoja sadržanog u uljanoj repici (Johnson, 2002).

Premda su neki od njih nositelji aroma te im se pripisuju antikancerogena i antioksidacijska svojstva, dokazano je antinutritivno djelovanje glukozinolata u sačmi uljane repice, umanjujući njenu kvalitetu i vrijednost (Mithen i sur., 2000; Verkerk i Dekker, 2008; Larsen i Sørensen, 1985). Istraživanja su pokazala toksičan i goitrogeni efekt izotiocijanata i oksazoidintionina, uzrokujući poremećaje u proizvodnji tiroidnih hormona (Xu i Diosady, 2013; Sørensen, 1990). Štetni učinci glukozinolata veći su kod nepreživača, dok su preživači općenito otporniji i tolerantniji na veće količine (Tripathi i Mishra, 2007). Zato se danas u ishrani stoke koriste samo kanola sorte s vrlo niskim udjelom glukozinolata. No bez obzira na izbor sorte, potrebno je voditi proizvodnju ulja uz kondicioniranje kako bi se inaktivirala mirozinaza te spriječila razgradnja i koncentriranje glukozinolata u sačmi (Sørensen, 1990).

2.3.3.2. *Tanini*

Tanini su kompleksni fenolni spojevi molekulske mase 500-3000 Da, a dijele se na kondenzirane i hidrolizirajuće, ovisno o strukturi i reaktivnosti.

Alkalnom/kiselom hidrolizom, hidrolizirajući tanini proizvode galnu i/ili heksahidrodifensku kiselinu koja se spontano pretvara u elaginsku kiselinu u kiselim uvjetima (Naczki i sur., 1998).

Najveći udio u sačmi čine kondenzirani tanini koji se formiraju polimerizacijom flavan-3-ola i flavan-4,4-diola, a osnovnu jedinicu čini leukocijanidin; uz pelargonidin, katehin i cijanidin (Haslam, 1979; Leung i sur., 1979; Durkee, 1971). Koncentracija tanina ovisi o ekstrakcijskoj metodi, stupnju zrelosti sjemena i sorti te varira od 0,2-3 % (Naczki i sur., 1998). Mogu stvarati komplekse s proteinskim frakcijama i vlaknima sjemena (Naczki i sur., 2000).

Kompleksi tanina s proteinima mogu biti topljivi i netopljivi, ovisno o konformaciji, veličini i naboju proteinske molekule. Interakcija tanina i proteina najvjerojatnije se ostvaruje formiranjem vodikovih veza između fenolnih skupina tanina i karbonilnog ugljika u peptidnim vezama proteina (Gustavson, 1954), a mogu biti uključene i hidrofobne interakcije, ionske i kovalentne veze, što ovisi o ionskom karakteru i molekularnoj strukturi (Loomis, 1974). Ovi kompleksi negativno utječu na organoleptička svojstva, uzrokujući trpkost pogače ili sačme uljane repice (Haslam, 1981). Poput fenolnih spojeva, mogu uzrokovati tamnu boju jaja ukoliko su prisutni u stočnoj hrani za ishranu kokoši, inhibicijom enzima TMA oksidaze (Fenwick i sur., 1981).

U pogledu antinutritivnog djelovanja, kondenzirani tanini mogu vezati metionin i tako onemogućiti bioiskoristivost proteina (Armstrong i sur., 1974; Ford i Hewitt, 1974). Također, Naczki i Shahidi (1995) ustanovili su vezu između sadržaja kondenziranih tanina i fenolnih kompleksa sa željezom zbog čega su tanini identificirani kao potencijalni inhibitori apsorpcije željeza.

2.3.3.3. *Sirova vlakna*

Limitirana upotreba sačme izravno je povezana s visokim udjelom vlakana, što snižava energetska vrijednost (Jia i sur., 2012). Prisutna vlakna uključuju celulozu, hemicelulozu, lignin i kutin te su gradivni elementi stanične stijenke (Van Soest, 1992). Uljana repica sadrži skoro 12 % sirovih vlakana za razliku od soje, koja ima ih 6 %. Njihova neprobavljivost dodatno je naglašena kod preživača.

Kako se uljana repica prije mljevenja ne ljušti, tako se vlakna tijekom procesiranja sjemena koncentriraju upravo u sačmi (Matthaus, 1998).

Postoje i vlakna embrija koja, uz proteine, sadrže kompleksne ugljikohidrate nepodložne enzimskoj razgradnji u probavnom traktu. Ne smatraju se sirovim vlaknima i pridonose nutritivnoj vrijednosti (Downey i Bell, 1990).

2.3.3.4. *Fitinska kiselina*

Primarna rezerva fosfora u većini uljarica, s iznosom do 90 % ukupnog fosfora, upravo je fitinska kiselina (Cosgrove, 1980; Greenwood, 1989). Zbog negativnog naboja, visoko je reaktivna i kao takva podložna vezanju minerala i proteina (Thompson, 1990). Prisutna je u formi kalcijevih, magnezijevih i kalijevih soli, s udjelom od 2-5 % u odmašćenoj pogači (Mills i Chong 1977; Yiu i sur., 1982; Reddy i sur., 1982). Fitinska kiselina smanjuje biološku dostupnost mineralnih tvari, no kod preživača, njihov nedostatak nije toliko uvjetovan njenom prisutnošću, pošto se hidrolizira pomoću fitaza u mikroflori rumena (Reddy i sur., 1982).

Negativan utjecaj može predstavljati njeno vezanje na proteine, smanjujući njihovu probavljivost i biodostupnost aminokiselina. Preradom sjemena, fitinska kiselina smještena u globoidima uglavnom ostaje nepromijenjena (Thompson, 1990).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao materijal u ovom radu korišteno je sjeme uljane repice uzgojeno 2016./2017. g. na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Iz sjemena je u laboratoriju proizvedeno nerafinirano repičino ulje dvostrukim prešanjem na pužnoj preši (Komet, model CA/53, Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka) uz prethodno kondicioniranje sjemena kroz 30 minuta na $80\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pomoću kondicionera. Pogača, kruti ostatak ili nusproizvod u procesu proizvodnje ulja, nakon drugog prešanja samljevena je na mlinu s diskovima i do daljnjih analiza skladištena na -20 °C .

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u sjemenu i pogači

Za određivanje vode u sjemenu i pogači uljane repice korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 665:2004). Princip metode temelji se na sušenju do konstantne mase u sušioniku (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska) pri temperaturi od $103 \pm 2\text{ °C}$. U osušenu i izvaganu posudicu izvaže se 5 g sjemena ili pogače, s točnošću 0,0001 g. Posudica s uzorkom i podignutim poklopcem stavi se u sušionik, prethodno zagrijan na $103 \pm 2\text{ °C}$. Nakon 2 sata, uzorak se hladi u eksikatoru. Kada se ohladi do sobne temperature, izvaže se i ponovi se postupak sušenja uz smanjeno vrijeme od jednog sata, sve dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne bude najviše 0,005 g. Rezultat se prikazuje kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja.

Udio vode i hlapljivih tvari računa se prema formuli [1]:

$$\text{udio vode(\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad [1]$$

m_0 = masa prazne posudice (g)

m_1 = masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_2 = masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.2. Određivanje udjela masti u sjemenu i pogači

Za određivanje udjela masti u uzorcima sjemena i pogače korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 659:2010). Aparatura za ovu metodu sastoji se od kupelji za zagrijavanje (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska), ekstraktora u kojeg je umetnuta čahura s uzorkom, povratnog hladila za kondenzaciju otapala i tikvice za sakupljanje otapala s ekstrahiranim komponentama. Potrebno je omogućiti ulaz i izlaz vode potrebne za hlađenje otapala.

U celuloznu čahuru odvažuje se 10 g samljevenog uzorka sjemena ili pogače s točnošću od 0,0001 g, čahura se zatvori vatom i postavi u ekstraktor. Ekstrakcija se provodi 8 h uz petrol eter kao otapalo. Masna frakcija se izdvaja s kondenziranim otapalom u prethodno izvaganu tikvicu. Nakon završetka, otapalo se otpari. Uzorak se suši 60 minuta na 103 ± 2 °C, ohladi i važe. Sušenje se nastavlja po 30 minuta do postizanja konstantne mase.

Udio ekstrahirane masti računa se prema navedenoj formuli [2] :

$$\% \text{ ulja} = 100 \cdot \frac{m_0}{m_1} \quad [2]$$

m_0 = masa ulja (g)

m_1 = masa sjemena/pogače (g)

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina dvaju paralelnih određivanja. Iz rezultata udjela ulja i vode u sjemenu i pogači, izračunato je iskorištenje procesa proizvodnje nerafiniranog repičinog ulja prema formulama [3] i [4].

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{m_u}{u_s} \times 100 \quad [3]$$

$$m_u = u_s - \frac{U_p \times (100 - v_s - u_s)}{100 - v_p - U_p} \quad [4]$$

m_u = masa proizvedenog ulja (g)

u_s = udio ulja u sjemenu (%)

u_p = udio ulja u pogači (%)

v_s = udio vode u sjemenu (%)

v_p = udio vode u pogači (%)

3.2.3. Određivanje udjela proteina u sjemenu i pogači

Korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 20483:2014) za kvantitativno određivanje proteinskog i neproteinskog dušika, a temelji se na oslobađanju reduciranog dušika pomoću sumporne kiseline u obliku amonijevog sulfata.

Odvaži se 0,5 g samljevenog sjemena, tj. pogače s točnošću 0,0001 g u staklenu kivetu, stave Kjeldahl tablete za spaljivanje (Merck, Darmstadt, Njemačka) i doda 15 mL 96 % (v/v) sumporne kiseline. Uzorci se spaljuju u bloku za spaljivanje uz postepeno povećanje temperature. Plavo-zelena bistra tekućina i kiveta bez crnih zaostataka su indikatori potpune digestije uzorka, pri čemu se dobiva amonijev sulfat. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, u uzorak se doda 70 mL destilirane vode te se kiveta stavi u destilacijsku jedinicu Kjeltex 2100 uređaja (Foss A/S, Hillerød, Danska) dok se na izlaznu kondenzacijske jedinice s cjevčicom postavi erlenmayerova tikvica s 25 mL 4 % (v/v) otopine borne kiseline u koju su dodani metilno crvenilo i brom-krezol zeleno kao indikatori. Amonijak se izdvaja alkalizacijom natrijevom lužinom (50 mL 40 % (v/v) otopine NaOH) i destilacijom vodenom parom (4 minute) te se kondenzira u bornu kiselinu. Količina prisutnog dušika u uzorku preko prisutnog amonijaka određuje se titracijom amonijevog borata pomoću klorovodične kiseline ($c = 0,1 \text{ M}$) do promjene boje iz zelene u ružičastu. Istovremeno se određuje i slijepa proba.

Udio proteina izračunava se prema formuli [6] iz udjela prisutnog dušika koji se izračuna prema formuli [5]. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina dvaju paralelnih određivanja:

$$\% \text{ dušika} = \frac{(V_2 - V_1) \times c(\text{HCl}) \times 14,008}{m} \times 100 \quad [5]$$

V_2 = volumen utrošene klorovodične kiseline za titraciju uzorka (mL)

V_1 = volumen utrošene klorovodične kiseline za titraciju slijepa probe (mL)

$c(\text{HCl})$ = koncentracija klorovodične kiseline (mol L^{-1})

m = masa uzorka (g)

$$\% \text{ proteina} = \% \text{ dušika} \times f \quad [6]$$

f = faktor konverzije za uljarice; 6,25

3.2.4. Određivanje mineralnih tvari u sjemenu i pogači

Za detekciju udjela mineralnih tvari u sjemenu i pogači korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 2171:2010) uz izmjene. Temelji se na spaljivanju prethodno izvaganih uzoraka u porculanskim lončićima pri temperaturi od $800\text{ °C} \pm 20\text{ °C}$ u mufolnoj peći te vaganju dobivenog pepela nakon hlađenja u eksikatoru.

Izvaže se 5 g samljevenog sjemena, tj. pogače i ravnomjerno rasprostire u sloju jednake debljine prethodno izžarene i izvagane posude za spaljivanje. Za ujednačeno izgaranje, u svaki uzorak se stavi po 1-2 mL etanola. Posude s uzorkom se najprije spaljuju na električnoj ploči do prestanka dimljenja. Treba pripaziti da se pri izgaranju ne pojavi plamen. Uzorci se postavljaju u hladnu mufolnu peć, a izgaranje se provodi na 800 °C . Nakon 4 sata, posudice se hlade u eksikatoru i važu. Za svaki uzorak odrađena su 3 paralelna određivanja, a količina mineralnih tvari izračunata je prema formuli [7]:

$$\% \text{ mineralnih tvari} = m_1 \times \frac{100}{m_0} \times \frac{100}{100-v} \quad [7]$$

m_0 = masa uzorka (g)

m_1 = masa ostatka (g)

v = količina vode u ispitanom uzorku (%)

3.2.5. Mljevenje pogače kriomlinom

Pogača uljane repice samljevena je na vibracionom kriomlinu (Retsch + Apollo, Haan, Njemačka) sa spremnikom tekućeg dušika na -196 °C . Uređaj se sastoji od kućišta, cilindra za mljevenje s pripadajućim čepom za zatvaranje/otvaranje, cilindra za protutežu, posude za mljevenje, filter rešetke, ventila za dovod dušika i ventila za regulaciju tlaka.

Osam grama uzorka se izvaže i prebaci u posudu za mljevenje, zajedno s 12 malih metalnih kuglica. Posuda se umetne u cilindar, zatvori čepom i dobro stegne odvijačem. Prije početka mljevenja uz hlađenje, otvori se ventil za dovod dušika i namjeste se željeni parametri; predhlađenje, vrijeme mljevenja (2, 4, 8, i 12 minuta), broj kriociklusa (ovisno o vrsti uzorka; u ovom istraživanju bio je 1) i frekvencija (30 Hz). Tlak dušika na izlazu iz spremnika održavan je na 1,3 bara radi optimizacije procesa. Bez primjene hlađenja, potrebno je podesiti samo vrijeme mljevenja i frekvenciju. Nakon vađenja posude s uzorkom, cilindar se odmah zatvara radi sprječavanja ulaska vlage.

U daljnjem radu, samljeveni uzorci označeni su prema Tablici 2.

Tablica 2. Oznaka uzoraka pogače samljevene kriomlinom sa i bez kriogenog hlađenja

Oznaka uzorka pogače	Vrijeme mljevenja (min)	Hlađenje
P*	0	-
2H	2	+
4H	4	+
8H	8	+
12H	12	+
2BH	2	-
4BH	4	-
8BH	8	-
12BH	12	-

* kontrolni uzorak

3.2.6. Ekstrakcija nepolarnih komponenti

Ekstrakcija nepolarnih komponenti provedena je prema modificiranoj metodi objavljenoj u radu Kraljić i sur. (2013). Odvaž se 2 g uzorka u plastične kivete od 50 mL i doda 20 mL heksana. Kivete s uzorcima polegnu se u posudu i stave se na vorteksiranje (IKA MS 3 basic, IKA-Works, Staufen im Breisgau, Njemačka) u trajanju od 30 minuta. Slijedi centrifugiranje na 10 min. i 5000 min^{-1} (Rotina 35, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen). Supernatant se profiltrira preko filter papira (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm) na Büchnerovom lijevku, sakuplja u tikvicu i otpari na vakuumskom otparivaču (Heidolph, Schwabach, Njemačka) pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Postupak ekstrakcije nepolarnih komponenti ponavlja se 3 puta. Dobivene masne frakcije koristile su se za određivanje sastava masnih kiselina, a odmašćene pogače za daljnje analize.

3.2.7. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva

Ekstrakcija je rađena prema Martini i sur. (2014) s određenim izmjenama. Odvaž se 0,5 g uzorka odmašćene pogače u plastične kivete od 15 mL, doda 3 mL 80 % (v/v) etanola i 100 μL otopine internog standarda (3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina koncentracije 5 mg mL^{-1}). Uzorak se snažno protrese 15 sekundi na vortexu. Ekstrakcija se provodi 10 minuta na ultrazvučnoj kupelji (Sonorex, Belin, Njemačka). Centrifugiranjem

pri 4000 min^{-1} na 15 minuta, izdvoji se supernatant od čvrste faze. Etanolni ekstrakt se otpipetira u odmjernu tikvicu od 10 mL, a proces ekstrakcije se ponovi još 2 puta sa po 3 mL 80 % (v/v) etanola. Nakon 3 ciklusa ekstrakcije, tikvica se nadopuni 80 % (v/v) etanolom do oznake. Sakupljeni ekstrakti se profiltriraju kroz PVDF filter veličine pora $0,20 \mu\text{m}$ (Kromafil, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) u označene vijalice i do daljnjih analiza čuvaju se u zamrzivaču na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.8. Ekstrakcija vezanih fenolnih spojeva

Korištena je modificirana metoda prema Martini i sur. (2014). U plastičnu kivetu s krutim ostatkom dobivenim od ekstrakcije slobodnih fenola odpipetira se $100 \mu\text{L}$ internog standarda (3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina; 5 mg mL^{-1}) i 4 mL natrijeve lužine (0,1 M) koja hidrolizom tijekom 4 sata oslobađa vezane fenole. Nakon procesa hidrolize, pH smjese namješta se na oko 2 pomoću pH metra (Jenway, London, England) koristeći koncentriranu HCl kako bi se fenoli oslobodili i bili dostupni kao fenolne kiseline umjesto ionskih formi (Fenton i sur., 1980; Kozłowska i sur., 1983b; Zadernowski i Kozłowska, 1983; Naczki i Shahidi, 1989a), i kao takvi bili pogodni za ekstrakciju etil-acetatom (Krygier i sur., 1982; Naczki i sur., 1992).

Ekstrakcija se provodi 3 puta; prvi put s 4 mL, a preostala dva puta s 2 mL etil acetata. Nakon dodavanja otapala, uzorak se promućka 30 puta, centrifugira 10 minuta na 2000 min^{-1} , a dobivena etil acetatna frakcija se odvoji u vijalicu i upari dušikom do suhog. U konačnici, suhi ekstrakt se otopi u 10 mL metanola i profiltrira kroz PVDF filter veličine pora $0,20 \mu\text{m}$. Do daljnjih analiza, uzorci su čuvani u zamrzivaču na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Svaka ekstrakcija provedena je u 3 paralelna određivanja.

3.2.9. Ekstrakcija tanina

Izolacija kondenziranih tanina rađena je prema metodi Price i sur. (1978) uz modifikacije.

Ekstrakcija je provedena u 3 paralele za svaki uzorak. Jedan gram odmašćene pogače odvaže se u plastične kivete od 50 mL i doda 15 mL 70 % (v/v) otopine acetona. Ekstrakcija tanina provedena je na laboratorijskom homogenizatoru (IKA T18 Ultra – turrax, IKA-Works, Staufen im Breisgau, Njemačka) kroz 1 minutu, na 10000 okretaja min^{-1} . Nakon ekstrakcije, uzorci se centrifugiraju (5000 okretaja min^{-1} , 10 minuta) nakon čega se acetonski supernatant skuplja u tikvicu. Aceton se otpari na vakuumskom otparivaču (Heidolph, Schwabach, Njemačka) pri temperaturi od 40 °C. Suhi ekstrakt se ispere s 10 mL metanola i profiltrira kroz PVDF filter pora 0,20 μm , kako bi se uklonili fosfolipidi netopljivih u metanolu. Dobiveni ekstrakti koristili su se za spektrofotometrijsku analizu do koje su čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

3.2.10. Određivanje sastava masnih kiselina pomoću GC-a

Identifikacija masnih kiselina provedena je pomoću plinske kromatografije (GC) prema standardnoj HRN EN ISO 12966-4:2017 metodi uz prethodno prevođenje masnih kiselina u metilne estere kao oblik pogodan za analizu prema HRN EN ISO 12966-2:2017 metodi.

Otopljeno je 0,1 g uzorka nepolarnog suhog ekstrakta pogače u 2 mL izooktana. Nakon što je epruveta protresena, dodano je 0,1 mL 2 M metanolne otopine KOH te je opet protresena 60 sekundi. Nakon bistrenja reakcijske smjese i odvajanja glicerolnog sloja na dnu, u epruvetu je dodano 2 mL zasićene otopine natrijevog klorida te je sve promiješano. Gornji, izooktanski sloj izdvojen je u drugu epruvetu te mu je dodano 1 g bezvodnog natrijevog hidrogensulfata (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska). Dobiveni supernatant prebačen je u vijalicu i analiziran na plinskom kromatografu.

Analiza dobivenih metilnih estera provedena je na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network uz plameno-ionizacijski detektor (Agilent, Santa Clara, SAD). Korištena je kapilarna kolona DB-23 (60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). Protok helija kao plina nosioca iznosio je 1,5 mL min^{-1} , uz split 60:1. Temperatura injektora postavljena je na 250 °C, a temperatura detektora na 280 °C. Temperatura pećnice je programirana je

da raste $7\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ od $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz zadržavanje na maksimalnoj temperaturi od 17 minuta.

Kvalitativno određivanje masnih kiselina provedeno je usporedbom retencijskih vremena njihovih metilnih estera s retencijskim vremenima komercijalnih, sastavom poznatih standarda. Metodom normizacije površine ispod pikova, računa se pojedinačni udio masne kiseline i izražava kao % od ukupnih masnih kiselina.

Analiza je provedena u 3 paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

3.2.11. Određivanje udjela ukupnih polifenola Folin – Ciocalteu metodom

Mehanizam metode zasniva se na redukciji Folin-Ciocalteuovog reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) pomoću prisutnih antioksidansa u ekstraktima, pri čemu dolazi do stvaranja plavo obojenog kompleksa čiji se intenzitet boje mjeri spektrofotometrijski na 765 nm.

Za svaki uzorak rađene su 2 paralele uz slijepu probu. U plastičnu kivetu za spektrofotometar otpipetira se 15 μL ekstrakta, 400 μL vode i 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon točno 3 minute doda se 300 μL 20 % (v/v) Na_2CO_3 , nakon čeg se kiveta nadopuni destiliranom vodom do volumena 2 mL (1185 μL). Kiveta se zatvori čepom i promiješa te ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija (Yu i sur., 2002). Koncentracija ukupnih polifenola računa se prema jednadžbi iz baždarne krivulje (Slika 2.) pripremljene sinapinskom kiselinom (Sigma Aldrich Co., St. Louis, SAD) iz formula [8] i [9].

$$x = \frac{y-b}{a} \quad [8]$$

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg mL^{-1})

y - apsorbancija uzorka

a - nagib pravca iz baždarnog dijagrama

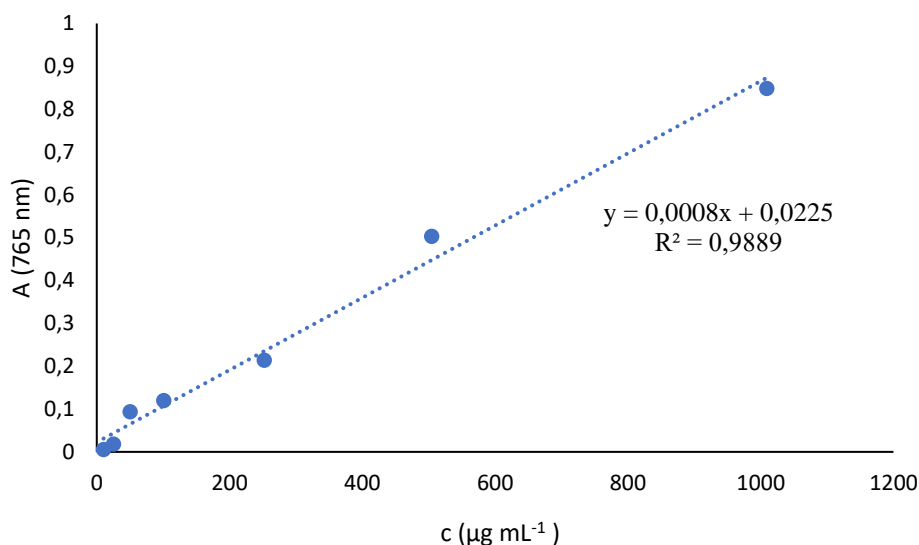
$$c(\text{spoja}) = \left(\frac{x \times V}{m}\right) \times 100 \quad [9]$$

c - koncentracija spoja u odvađanom uzorku ($\text{mg } 100\text{ g}^{-1}$)

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg mL^{-1})

m - masa uzorka korištenog za ekstrakciju (g)

V - volumen ekstrakta (mL)



Slika 2. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A) o koncentraciji (c) sinapinske kiseline raspona 10-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.2.12. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva pomoću HPLC-a

Sastav i koncentracija slobodnih i vezanih fenola u različito mljevenim pogačama uljane repice određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) Agilent Technologies serije 1200 s binarnom pumpom, autosamplerom i DAD detektorom (Santa Clara, SAD). Spojevi su razdvojeni na nepolarnoj koloni Phenomenex C18 (Kinetex 150 mm x 4,6 mm, 2,6 μm , 100 Å), a uvjeti analize razvijeni su u diplomskom radu Cvitanić (2016). Korištene su dvije mobilne faze s promijenjenim volumnim udjelom tijekom eluiranja (mobilna faza A - 0,1 % (v/v) vodena otopina mravlje kiseline i mobilna faza B – 0,1 % (v/v) otopina mravlje kiseline u metanolu). Protok mobilnih faza iznosio je 0,9 mL min^{-1} kroz cijelo vrijeme trajanje analize a primjenjeni gradient prikazan je u Tablici 3. Kolona je termostatirana na 30 °C, a količina injektiranog uzorka iznosila je 5 μm . Kromatogrami su snimani na valnim duljinama od 280 i 320 nm, a tijekom cijelog vremena analize snimani su i spektri u ultraljubičastom području (200-400 nm).

Tablica 3. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26,1	90	10
28	90	10

Kvantifikacija fenolnih spojeva provedena je pomoću internog standarda (formula [10]), tj. 3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeve kiseline, a koncentracija fenolnih spojeva u odmašćenju pogači prema formuli [11], iz koncentracije (x) dobivene formulom [10]:

$$x = \frac{A \times c_{i.s.}}{A_{i.s.}} \quad [10]$$

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg mL^{-1})

$c_{i.s.}$ - koncentracija razrijeđenog internog standarda (mg mL^{-1})

A - površina ispod pika spoja

$A_{i.s.}$ - površina ispod pika internog standarda

$$c(\text{spoja}) = \frac{x \times V}{m} \times 100 \quad [11]$$

c - koncentracija spoja u odvaganom uzorku ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg mL^{-1})

V - volumen ekstrakta (mL)

m - masa uzorka korišten za ekstrakciju (g)

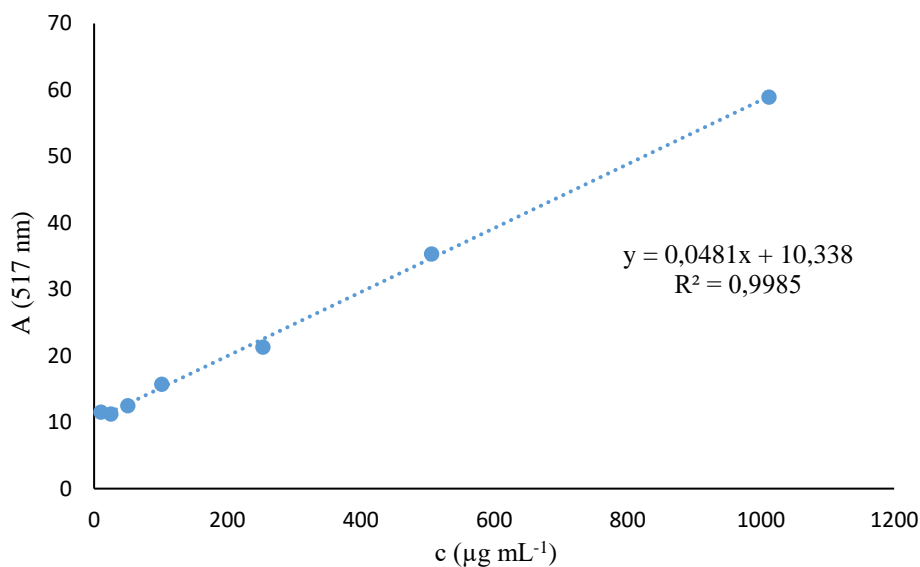
3.2.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti slobodnih i vezanih polifenola

3.2.13.1. DPPH metoda

Korištena je metoda bazirana na redukciji DPPH reagensa pomoću ekstrakta određenog antioksidacijskog kapaciteta (Yu i sur., 2002; Zhou i sur., 2004). Doniranjem elektrona i posljedičnom stabilizacijom, antioksidans u ekstraktu umanjuje aktivnost radikala DPPH što se očituje u smanjenju intenziteta apsorpcije nastalog spoja u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra, pri čemu dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu.

60 μL ekstrakta otpipetira se u kivetu, doda 2850 μL 0,06 mM svježe pripremljene DPPH otopine u metanolu i sve zajedno promiješa. Reakcija traje 30 minuta u mraku nakon čega se mjeri apsorbanca pri 517 nm na UV/VIS spektrofotometru. Sva mjerenja su izvedena u 2 paralele po jednom uzorku, s pripadajućom slijepom probom za svaki uzorak, sastavljenom od 60 μL ekstrakta i 2850 μL metanola.

Koncentracija ukupnih polifenola računa se prema jednadžbi iz baždarne krivulje (Slika 3.) pripremljene Trolox otopinom (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina; Sigma Aldrich Co., St. Louis, SAD), korištenjem formula [8] i [9].



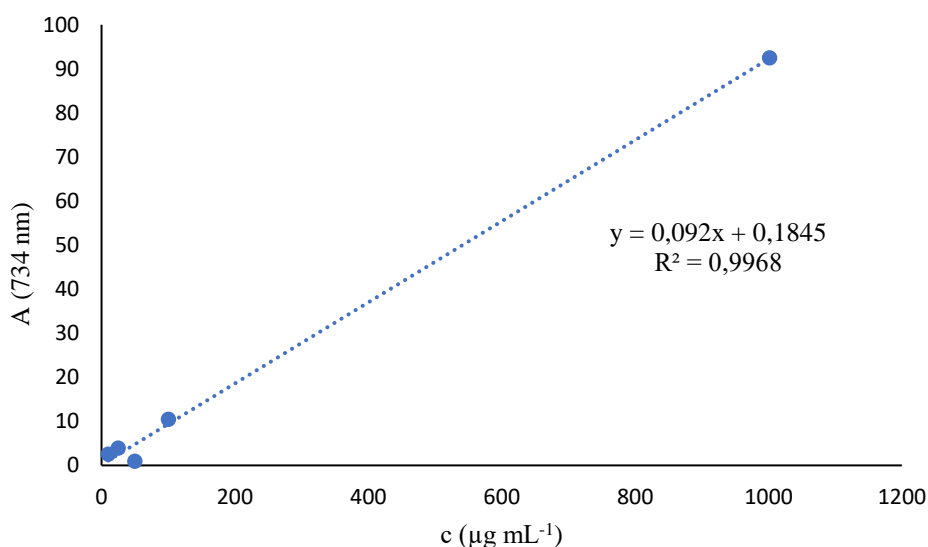
Slika 3. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbanca (A) o koncentraciji (c) Trolox otopine raspona 10-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.2.13.2. ABTS metoda

Korištena je metoda prema Re i sur. (1999) s izmjenama, a temelji se na redukciji ABTS radikala-kationa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)) dobivenog oksidacijom pomoću kalijevog persulfata, a pri čemu dolazi do obezbojenja plave otopine (plava boja potječe od ABTS kationa). Ta promjena detektira se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 734 nm.

Pripremi se 7 mM otopina ABTS-a u destiliranoj vodi, pomiješa se sa 140 mM otopinom kalijeva persulfata tako da konačna koncentracija kalijeva persulfata iznosi 2,45 mM. Tikvica se obloži aluminijskom folijom i stabilizira preko noći u mraku. Na dan analize potrebno je pripremiti 1 % (v/v) otopinu od pripremljene otopine $K_2S_2O_8 + ABTS^+$ u 96 % (v/v) etanolu. Mjeri se apsorbancija kontrole pri čemu je potrebno postići da njen iznos pri 734 nm iznosi $0,700 \pm 0,02$ korektivnim dodavanjem $K_2S_2O_8 + ABTS^+$ ili prethodno navedenog etanola.

Mjerenje je izvedeno u 2 paralele za svaki ekstrakt. 20 μ L ekstrakta otpipetira se u običnu kivetu, doda 2 mL pripremljenog reagensa pa se sve zajedno promiješa. Apsorbancija se mjeri nakon 6 minuta uz slijepu probu pri 734 nm. Za izračunavanje koncentracija u ekstraktima izrađen je baždarni pravac iz otopine svježe pripremljenog Troloxa u metanolu određenog raspona koncentracija, a rezultati su dobiveni pomoću formula [8] i [9] iz jednadžbe baždarnog dijagrama (Slika 4.).

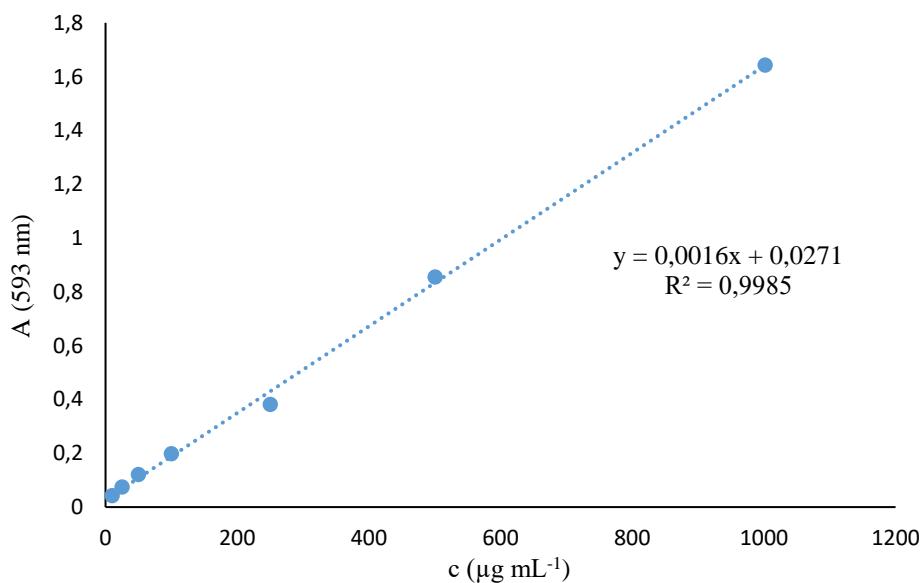


Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A) o koncentraciji (c) Troloxa otopine raspona 10-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.2.13.3. FRAP metoda

Uz modifikacije, primjenjena je metoda prema Benzie i Strain (1996). Mehanizam se zasniva na redukciji kompleksa željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom ($\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$) u Fe (II) pomoću antioksidanasa iz ekstrakta, pri čemu dolazi do promjene boje iz žute u plavu. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm. FRAP reagens priprema se miješanjem određenih volumena 20 mM željezovog klorida heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 10 mM TPTZ-a (2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazin) i 300 mM acetatnog pufera. Otopina se neposredno prije upotrebe mora zagrijati i održavati na 37 °C.

Za svaki uzorak rađene su 2 paralele. 10 μL uzorka i 1 mL FRAP reagensa otpipetira se mikrokivete. Slijepu probu čini samo FRAP reagens. Apsorbancija se mjeri nakon 4 minute reakcije pri 593 nm. Za određivanje udjela fenola u ekstraktu izrađen je baždarni pravac od svježe Trolox otopine u metanolu određenog raspona koncentracija (Slika 5.). Za izračun koncentracija su korištene formule [8] i [9].

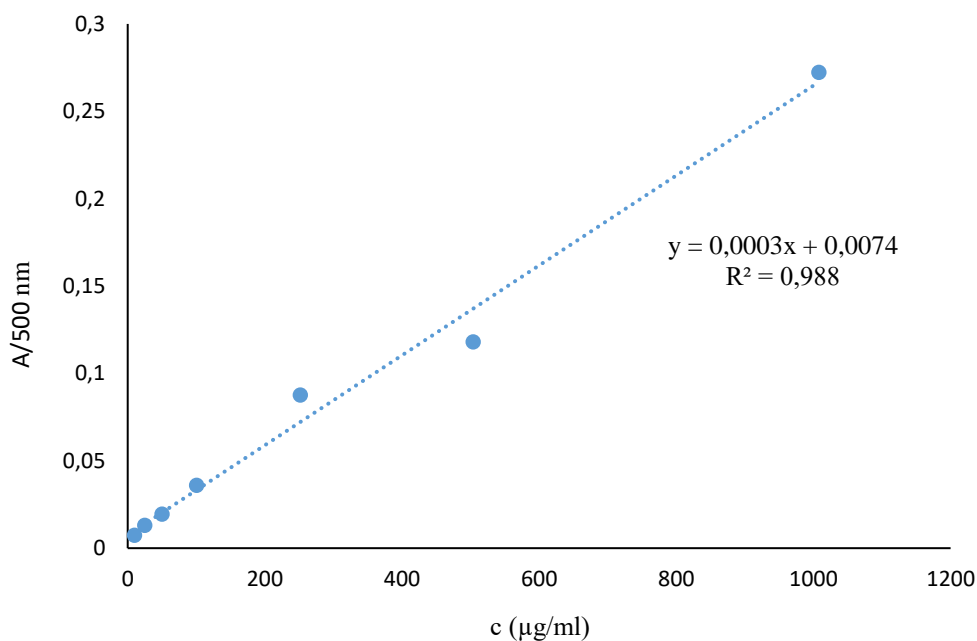


Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A) o koncentraciji (c) Trolox otopine raspona 10-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.2.14. Određivanje koncentracija tanina spektrofotometrijskom metodom

Prema metodi Price i sur. (1978) uz određene preinake, najprije se pripremi vanilin reagens sastavljen od jednakih omjera 1 % (v/v) vanilina (Acros Organics, Massachusetts, SAD) u metanolu i 8 % (v/v) HCl u metanolu. Vanilin reagens stabiliziran je preko noći. U običnu

kivetu otpipetira se 0,5 mL ekstrakta i 2,5 mL vanilin reagensna, promiješa te se stavi u vodenu kupelj na 30 °C, zajedno sa slijepom probom (2,5 mL 4 % HCl (v/v) u metanolu + 0,5 mL ekstrakta). Apsorbancije se očitavaju pri 500 nm nakon 20 minuta od početka zagrijavanja uzoraka. Koncentracije tanina se računaju prema jednadžbi baždarnog pravca (Slika 6.) iz formula [8] i [9]. Za izradu baždarne otopine korišten je katehin (Sigma Aldrich Co., St. Louis, SAD).



Slika 6. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A) o koncentraciji (c) katehina raspona 10-1000 µg mL⁻¹

3.2.15. Statistička obrada

Na dobivenim rezultatima provedena je dvofaktorska analiza varijance (ANOVA) kako bi se odredio utjecaj načina i vremena mljevenja na koncentraciju polifenolnih spojeva i njihovu antioksidacijsku aktivnost. Također su određene korelacije koncentracije polifenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnosti ekstrakata koristeći MS Excel (2013).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Uljana repica jedna je od najznačajnijih uljarica u svijetu i prvenstveno se uzgaja za proizvodnju ulja. Ulje uljane repice koristi se u prehrani, ali i u tehničke svrhe kao biogorivo, za proizvodnju maziva i slično. Nusproizvod proizvodnje repičinog ulja, ovisno o procesu proizvodnje, su pogača ili sačma koje se prvenstveno koriste za ishranu stoke zbog prisustva antinutritivnih komponenti (glukozinolata, fitata, tanina i dr.) koje ograničavaju njihovu primjenu u prehrani ljudi (Kozłowska i sur., 1975). No, pogače i sačme su dobar izbor visokovrijednih proteina izbalansiranog aminokiselinskog sastava te se zbog toga i dalje istražuju mogućnosti njihovog uvođenja u prehranu. Osim proteina, velik broj istraživanja usmjeren je na polifenolne spojeve uljane repice. Uljana repica sadrži značajno više polifenolnih spojeva od sjemena bilo koje druge uljarice. S obzirom na njihov polarni karakter, vrlo mali dio polifenolnih komponenti prijeđe u ulje i oni zaostaju u pogačama i sačmama koje su vrlo dobar izvor tih snažnih antioksidanasa. Fenolni spojevi prisutni u pogači uljane repice su fenolne kiseline i njihovi derivati, među kojima je najdominantniji ester sinapinske kiseline – sinapin. Pronalaskom odgovarajućeg tretmana za povećanje ili smanjenje koncentracije polifenola u repičinoj pogači, omogućila bi se raznovrsnija upotreba repičine pogače i/ili njenih komponenti u prehrambenoj industriji.

U ovom radu, najprije su određeni su parametri kvalitete sjemena i pogače uljane repice. Potom je ispitan utjecaj naknadne obrade, tj. stupnja usitnjenosti pogače na sastav i koncentraciju polifenolnih spojeva te na njezin antioksidacijski potencijal. U tu svrhu, korišteno je kriogeno mljevenje pomoću tekućeg dušika kako bi se spriječio gubitak termolabilnih komponenti.

4.1. KVALITETA SJEMENA I POGAČE ULJANE REPICE

Sjemenu uljane repice, uzgojenom na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2016./2017. godine, određeni su osnovni parametri kvalitete (udio vode, ulja i proteina) te udio mineralnih tvari. Rezultati su prikazani u tablici 4., a izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija.

Udjel vode u sjemenu iznosio je 4,94 %, što je ispod prosječnih vrijednosti koje se navode u literaturi. Za usporedbu, prosječan udio vode prema Shahidi (1990) je 8 % dok su

Salunkhe i sur. (1992) odredili varijabilnost vode u uzorcima kanola sorti od 6-9 %. Treba napomenuti da količina vode ovisi o brojnim faktorima, uključujući temperaturu i relativnu vlažnost tijekom rasta, žetve, procesiranja i skladištenja. Tijekom skladištenja repice, bitno je održavati vlažnost ispod 8 % pošto veća količina vode u sjemenu negativno utječe na biokemijske procese, mljevenje te iskorištenje ekstrakcije i prešanja (NSW Department of Primary Industries, 2014).

Tablica 4. Osnovni parametri kvalitete sjemena i pogače uljane repice (udio vode, ulja i proteina) te udio mineralnih tvari

Uzorak	Udio vode (%)	Udio ulja (%)	Udio proteina (%)	Udio mineralnih tvari ** (%)
SJEME	4,94 ± 0,01	44,16 ± 0,25	19,27 ± 0,27	4,32 ± 0,02
POGAČA	9,45 ± 0,03	14,11 ± 0,21	29,51 ± 0,07	7,06 ± 0,06

** izraženo na suhu tvar

Udio ulja u sjemenu iznosio je 44,16 % dok su proteini bili zastupljeni u udjelu od 19,27 %. Vrijednosti su u skladu s literaturnim podacima prema kojima kanola sorte sadrže 42-43 % ulja, a sirovih proteina od 20-30 %. Faktori koji utječu na njihove udjele su vlažnost tla, vrijeme žetve, uvjeti uzgoja te izbor sorte (Bell i Shires, 1982; Spragg i Mailer, 2007; Newkirk, 2009; Barthelet i Daun, 2011).

Udio mineralnih tvari u ispitivanom sjemenu iznosio je 4,32 %, što je niže u usporedbi s podacima iz istraživanja Carre i sur. (2016). Oni su zaključili da je niska varijabilnost u udjelu mineralnih tvari između različitih kanola sorti, uz iznos oko 5,7 % na cjelovito sjeme.

Iz sjemena je procesom prešanja uz prethodno kondicioniranje na 80 °C u trajanju od 30 minuta proizvedeno nerafinirano ulje te je kao nusproizvod dobivena pogača koja je korištena u eksperimentu. Dobivena pogača je samljevena na mlinu s diskovima te je predstavljala kontrolni uzorak u daljnjim istraživanjima. Određeni su osnovni parametri kvalitete pogače u rezultati su prikazani u Tablici 4. Udio ulja i vode je bio nešto viši, dok je udio proteina bio niži uspoređujući s literaturom. Leming i Lember (2005) su određivali kvantitativan sastav nutritivnih i antinutritivnih komponenti pogače uljane repice, među kojima su ustanovili sljedeće prosječne udjele: 4,7 % vode, 36,1 % proteina, 12,2 % ulja i 7,1

% mineralnih tvari. Može se uočiti da je dobiveni udio mineralnih tvari u pogači (7,06 %) sukladan s podacima iz prethodno navedenog istraživanja. Veći udio vlage od 9,45 % u ispitivanoj pogači rezultat je dodatka vode u procesu kondicioniranja kako bi se dobila optimalna vlažnost sjemena prije prešanja koja je ključna za dobro iskorištenje procesa proizvodnje ulja. Veći udio ulja može se povezati s nešto nižim iskorištenjem prešanja koje je iznosilo 78,64 %. Razlog tome može se pronaći u nemogućnosti dodatnog zagrijavanja glave preše čime bi se smanjila viskoznost ulja olakšavajući njegovo izdvajanje iz pripremljenog tijesta, a samim time i došlo bi do povećanja iskorištenja ulja (Pryzbylski i sur., 2005). No, usprkos tome, iskorištenje je bilo neznajno niže od vrijednosti objavljenih u radu Kraljić i sur. (2013) u kojem su korišteni isti uvjeti uz dodatno zagrijavanje glave preše. Isto tako, u literaturi se navodi kako u pogači zaostaje 8-15 % ulja (Newkirk, 2011) što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Niži udio proteina u pogači bio je rezultat nižeg početnog udjela proteina u sjemenu. Treba napomenuti kako sastav nusprodukata varira ovisno o sorti, uvjetima uzgoja, sastavu sjemena te zaostatku ulja i ugljikohidrata u pogači (Bell i Keith, 1990; Bell, 1993; Spragg i Mailer, 2007; Newkirk, 2009).

4.2. SASTAV MASNIH KISELINA

Sastav masnih kiselina karakterističan je za svako ulje te je bitan u njegovoj identifikaciji. S obzirom da je korištena pogača sadržavala 14 % ulja, sastav masnih kiselina značajno doprinosi nutritivnoj vrijednosti same pogače. Osim toga, sastav masnih kiselina uvjetuje i njezinu oksidacijsku stabilnost te direktno utječe na način i duljinu skladištenja. Pomoću plinske kromatografije, u ekstrahiranim masnim frakcijama određen je udio pojedinih masnih kiselina, izražen kao % od njihovog ukupnog udjela. Svrha njihovog određivanja bila je potvrditi pretpostavku da se primjenom različitog stupnja usitnjavanja pogače, bez obzira na primijenjen tretman hlađenja, ne mijenja sastav masnih kiselina, usporedno s kontrolnim uzorkom.

Tablice 5. i 6. prikazuju sastav masnih kiselina u ekstrahiranim masnim frakcijama obične pogače i u pogače koje su dodatno usitnjene na vibracionom kriomlinu s i bez hlađenja mlina (uzorci H i BH). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija.

U svim uzorcima dominirala je mononezasićena oleinska masna kiselina (~64 %), a vrijednosti su u skladu s literaturom prema kojoj oleinska ima 61,8 % do 62,8 % ukupnog

udjela masnih kiselina (Bockisch, 1998). U većim udjelima detektirane su omega - 6 i omega - 3 masne kiseline: linolna (~19 %) i α -linolenska (~7 %). Udio α -linolenske masne kiseline je bio nešto niži usporedno s literaturom koja navodi prosjek od 9,6 % ukupnog udjela (Przybylski, 2005).

Tablica 5. Sastav masnih kiselina kontrolnog uzorka pogače te pogača mljevenih uz hlađenje

Masna kiselina (% od ukupnih)	Uzorak				
	P	2H	4H	8H	12H
C14:0	0,1 ± 0,00	nd*	nd*	nd*	nd*
C16:0	5,1 ± 0,00	5,1 ± 0,01	5,1 ± 0,01	5,1 ± 0,00	5,2 ± 0,00
C16:1	0,4 ± 0,00	0,5 ± 0,00	0,5 ± 0,00	0,5 ± 0,00	0,5 ± 0,00
C17:1	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00
C18:0	1,9 ± 0,00	1,9 ± 0,00	1,9 ± 0,00	1,9 ± 0,00	1,9 ± 0,00
C18:1n9	64,4 ± 0,03	64,2 ± 0,01	64,2 ± 0,01	64,2 ± 0,00	63,9 ± 0,00
C18:2n6	19,1 ± 0,01	19,2 ± 0,00	19,1 ± 0,00	19,1 ± 0,00	19,4 ± 0,00
C18:3n3	6,8 ± 0,01	6,8 ± 0,00	6,9 ± 0,00	6,9 ± 0,00	6,8 ± 0,00
C20:0	0,6 ± 0,00	0,6 ± 0,00	0,6 ± 0,00	0,6 ± 0,00	0,6 ± 0,00
C20:1	1,1 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00
C22:0	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,00	0,4 ± 0,00	0,3 ± 0,00
ω 6/ ω 3	2,8 ± 0,00	2,8 ± 0,00	2,8 ± 0,00	2,8 ± 0,00	2,9 ± 0,00
Σ n.i.**	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00

*nije detektirano

**suma neidentificiranih masnih kiselina

Tablica 6. Sastav masnih kiselina kontrolnog uzorka pogače te pogača mljevenih bez hlađenja

Masna kiselina (% od ukupnih)	Uzorak				
	P	2BH	4BH	8BH	12BH
C14:0	0,1 ± 0,00	nd*	0,1 ± 0,00	nd*	nd*
C16:0	5,1 ± 0,00	5,1 ± 0,00	5,1 ± 0,00	5,1 ± 0,00	5,1 ± 0,00
C16:1	0,4 ± 0,00	0,4 ± 0,00	0,4 ± 0,00	0,4 ± 0,00	0,4 ± 0,00
C17:1	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00
C18:0	1,9 ± 0,00	1,9 ± 0,00	2,0 ± 0,00	2,0 ± 0,00	2,0 ± 0,00
C18:1n9	64,4 ± 0,03	64,3 ± 0,00	64,3 ± 0,00	64,2 ± 0,00	64,2 ± 0,01
C18:2n6	19,1 ± 0,01	19,1 ± 0,00	19,1 ± 0,00	19,2 ± 0,00	19,2 ± 0,00
C18:3n3	6,8 ± 0,01	6,8 ± 0,00	6,8 ± 0,00	6,8 ± 0,00	6,8 ± 0,00
C20:0	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,00	0,6 ± 0,00	0,6 ± 0,00	0,6 ± 0,00
C20:1	1,1 ± 0,01	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00
C22:0	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,00
ω 6/ ω 3	2,8 ± 0,00	2,8 ± 0,00	2,8 ± 0,00	2,8 ± 0,00	2,8 ± 0,00
Σ n.i.**	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00

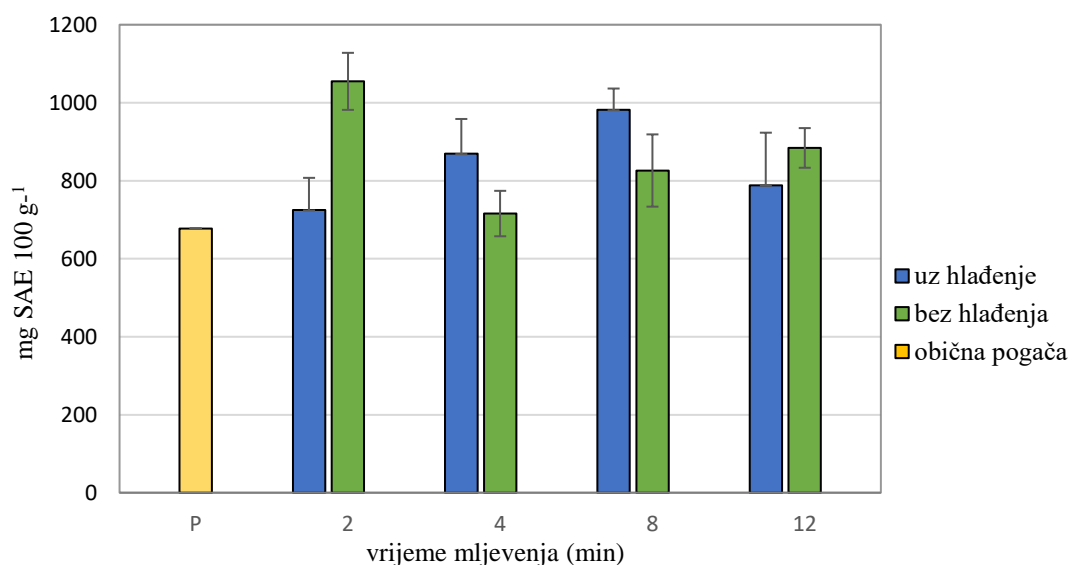
*nije detektirano

**suma neidentificiranih masnih kiselina

Uljana repica sadrži poželjan omjer $\omega 6/\omega 3$ masnih kiselina, koji je u uzorcima iznosio 2,8:1, što je u skladu s preporukama (Simopoulos, 2002). Eruka masna kiselina nije detektirana, što potvrđuje da se radi o kanola sorti. Nije se očekivao utjecaj mljevenja na sastav masnih kiselina, što je potvrđeno statističkom analizom ($p \geq 0,05$). Sastav masnih kiselina u uzorcima pogače uljane repice je u skladu s propisanim vrijednostima Pravilnika o jestivim uljima i mastima (Pravilnik, 2012).

4.3. KONCENTRACIJA I SASTAV POLIFENOLNIH SPOJEVA

Kao što je već ranije napomenuto, uljana repica izrazito je bogata polifenolnim spojevima koji gotovo u potpunosti zaostaju u pogačama ili sačmama nakon izdvajanja ulja. Na slici 7. prikazana je koncentracija ukupnih slobodnih polifenola određena spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom, izražena u mg ekvivalenta sinapinske kiseline (SAE) u 100 g pogače.



Slika 7. Koncentracija ukupnih slobodnih fenola određena Folin-Ciocalteu metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija)

Iz rezultata je vidljivo da je dodatnim mljevenjem pogače došlo do povećanja slobodnih polifenola u svim analiziranim uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak pogače uljane repice koja sadrži 677,3 mg SAE 100 g⁻¹. Uzorak mljeven 2 minute bez hlađenja (2BH) sadržavao je najveću koncentraciju ukupnih slobodnih polifenola (1054,8 mg SAE 100 g⁻¹).

Nakon dvije minute mljevenja bez hlađenja mlina došlo je do značajnog pada ukupnih polifenola pa nakon toga ponovo do porasta njihove koncentracije. Mljevenjem pogače uz hlađenje mlina u početku je došlo do porasta ukupnih slobodnih polifenola, no nakon osam minuta njihova se koncentracija smanjila. Treba napomenuti da nije utvrđen statistički značajan utjecaj načina niti vremena mljevenja na promjenu ukupne koncentracije slobodnih polifenola određenih Folin-Ciocalteu metodom ($p \geq 0,05$).

Sastav slobodnih polifenola u pogačama određen HPLC-om prikazan je u tablicama 7. i 8, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija.

Polifenolni spojevi podijeljeni su u 3 skupine spojeva: slobodne fenolne kiseline, derivate fenolnih kiselina i ostale spojeve. Udio slobodnih fenolnih kiselina iznosi 18 % od ukupnog sadržaja polifenolnih spojeva dok je prema Naczki i Shahidi (1989a) iznos nešto niži i iznosi oko 15 %. Fenolne kiseline prisutne u slobodnom obliku su bile sinapinska, galna, klorogenska, ferulinska i *p*-kumarinska.

Clandinin (1961) navodi da je sinapinska kiselina dominantna, no da je njen najveći udio od čak 99 % vezan u estere i glukozide (Krygier i sur., 1982; Dabrowski i Sosulski, 1984). To se podudara s rezultatima ovog istraživanja s obzirom na nisku koncentraciju sinapinske

kiseline prisutne u slobodnoj formi (94,9 mg SAE 100 g⁻¹) dok je ostatak vezan u sinapinu i drugim derivatima, koji čine minimalno 1588 mg SAE 100 g⁻¹ (74 %). Dominantan spoj u svim ekstraktima slobodnih polifenolnih spojeva pogača uljane repice bio je sinapin, kolin ester sinapinske kiseline. U uzorcima je bio prisutan u udjelu od 660 - 1045 mg SAE 100 g⁻¹. Ti su rezultati u skladu s literaturom (Kozłowska i sur., 1990). Pik sinapina predstavlja najviši pik na kromatogramu slobodnih fenolnih spojeva (slika 8.). Treba napomenuti da udio sinapina ovisi o biološkim faktorima (kultivar, uvjeti uzgoja), korištenom otapalu za ekstrakciju i odabiru metode za identifikaciju (Naczki i sur., 1998).

Tablica 7. Sastav i koncentracija (mg 100 g⁻¹) slobodnih polifenola i njihovih derivata u pogači mljevenoj uz hlađenje određen HPLC metodom

Polifenolni spoj	Uzorak				
	P (mg 100g ⁻¹)	2H (mg 100g ⁻¹)	4H (mg 100g ⁻¹)	8H (mg 100g ⁻¹)	12H (mg 100g ⁻¹)
Slobodne fenolne kiseline					
galna kiselina ^{*,¥}	37,41 ± 17,92	42,81 ± 6,22	33,57 ± 12,01	62,12 ± 11,27	31,31 ± 5,69
klorogenska kiselina [¥]	80,69 ± 9,13	75,22 ± 5,18	72,00 ± 6,18	78,62 ± 5,94	68,01 ± 7,09
ferulinska kiselina [*]	72,02 ± 12,78	69,82 ± 4,60	64,57 ± 4,92	91,53 ± 5,03	73,95 ± 8,22
sinapinska kiselina [¥]	94,69 ± 16,15	89,62 ± 4,59	83,64 ± 6,23	71,33 ± 5,82	58,03 ± 8,60
<i>p</i> -kumarinska kiselina [¥]	106,15 ± 15,37	100,24 ± 7,69	98,02 ± 8,31	105,09 ± 7,64	88,33 ± 12,42
Derivati fenolnih kiselina					
sinapin [¥]	854,82 ± 175,07	825,48 ± 51,52	774,55 ± 74,61	830,10 ± 72,68	659,82 ± 102,74
ostali derivati	733,72 ± 127,23	714,80 ± 54,88	636,35 ± 50,45	690,52 ± 48,03	566,19 ± 89,75
Ostali spojevi					
siringaldehid [¥]	14,08 ± 4,32	14,74 ± 4,03	14,89 ± 2,89	18,72 ± 1,27	15,14 ± 1,92
kanolol	9,96 ± 1,63	8,10 ± 2,44	7,08 ± 1,04	8,42 ± 0,76	8,45 ± 1,12
neidentificirani spojevi	157,96 ± 37,16	161,17 ± 16,10	142,14 ± 22,37	158,73 ± 25,78	102,34 ± 25,59
Σ	2161,51	2101,99	1926,81	2115,19	1671,58

* vrijeme mljevenja ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

¥ način mljevenja (uz/bez kriogenog hlađenja) ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

Tablica 8. Sastav i koncentracija (mg 100 g⁻¹) slobodnih polifenola i njihovih derivata u pogači mljevenoj bez hlađenja određen HPLC metodom

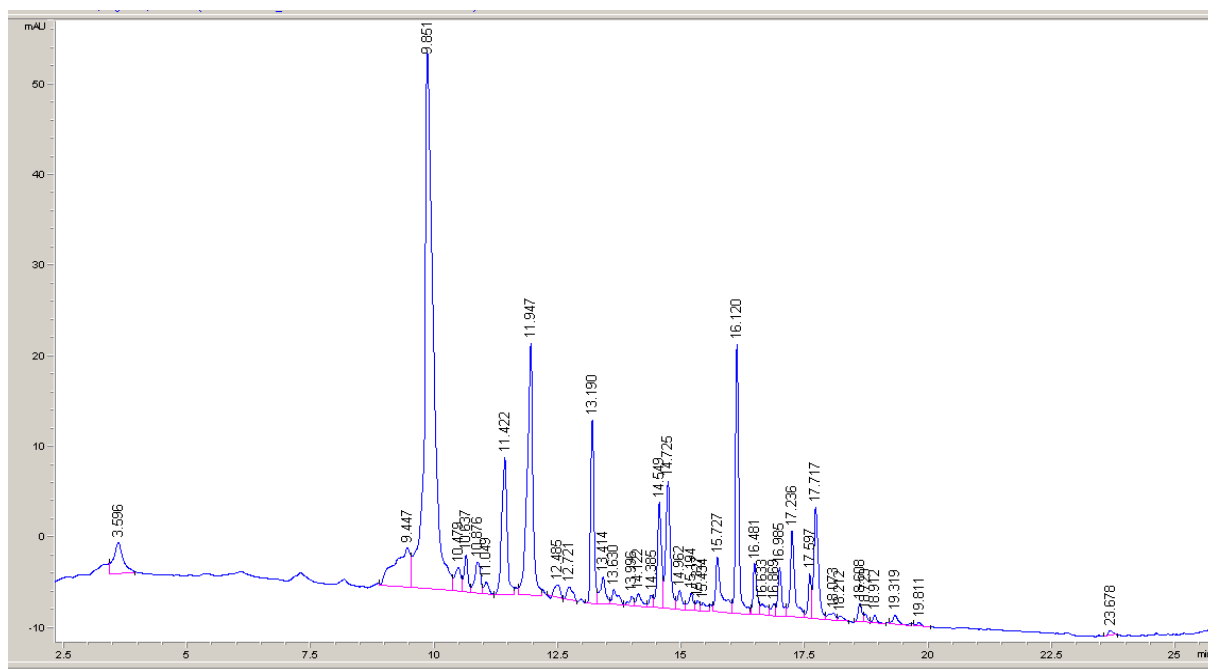
Polifenolni spoj	Uzorak				
	P (mg 100g ⁻¹)	2BH (mg 100g ⁻¹)	4BH (mg 100 g ⁻¹)	8BH (mg 100 g ⁻¹)	12BH (mg 100 g ⁻¹)
Slobodne fenolne kiseline					
galna kiselina ^{*,‡}	37,41 ± 17,92	57,86 ± 13,59	55,16 ± 17,10	83,57 ± 28,66	58,99 ± 1,39
klorogenska kiselina [‡]	80,69 ± 9,13	84,39 ± 4,41	88,08 ± 7,62	99,64 ± 28,11	77,26 ± 3,18
ferulinska kiselina [*]	72,02 ± 12,78	75,94 ± 3,16	73,89 ± 9,75	88,23 ± 24,30	68,84 ± 3,43
sinapinska kiselina [‡]	94,69 ± 16,15	97,45 ± 2,79	97,69 ± 9,68	118,06 ± 34,31	91,47 ± 3,40
<i>p</i> -kumarinska kiselina [‡]	106,15 ± 15,37	112,20 ± 5,61	113,38 ± 12,78	129,18 ± 36,65	99,67 ± 4,09
Derivati fenolnih kiselina					
sinapin [‡]	854,82 ± 175,07	912,69 ± 49,29	881,58 ± 129,43	1045,16 ± 283,57	797,61 ± 54,92
ostali derivati	733,72 ± 127,23	771,77 ± 20,41	706,67 ± 88,72	885,74 ± 305,70	694,71 ± 27,57
Ostali spojevi					
siringaldehid [‡]	14,08 ± 4,32	19,70 ± 0,66	19,78 ± 2,60	23,16 ± 7,37	18,35 ± 1,07
kanolol	9,96 ± 1,63	9,16 ± 2,08	9,06 ± 0,16	7,45 ± 1,13	7,60 ± 0,58
neidentificirani spojevi	157,96 ± 37,16	181,81 ± 5,84	158,01 ± 47,55	294,94 ± 53,47	132,13 ± 8,79
Σ	2161,51	2322,09	2203,29	2775,12	2046,63

* vrijeme mljevenja ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

‡ način mljevenja (uz/bez kriogenog hlađenja) ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

Od ostalih spojeva, u značajno nižim koncentracijama detektirani su kanolol i siringaldehid. Iako je kanolol dominantni fenolni spoj nerafiniranog ulja koje se proizvede prešanjem kondicioniranog sjemena (Kraljić i sur., 2013), razlozi njegove niske koncentracije u repičinoj pogači mogu se objasniti manjom polarnosti kanolola u odnosu na sinapin i na sinapinsku kiselinu. To je snažan antioksidans koji nastaje u repičinom ulju, reakcijom

dekarboksilacije sinapinske kiseline tijekom termičke obrade sjemenki (Kuhwara i sur., 2004, Koski i sur., 2003). Nedostatak karboksilne skupine daje kanololu jači lipofilni karakter od njegovog prekursora, zbog čega se koncentrira u ulju (Kraljić i sur., 2013). Vrijeme trajanja tretmana mljevenja imalo je značajan utjecaj na koncentraciju galne i ferulinske kiseline. S druge strane, utvrđen je značajan utjecaj načina mljevenja (uz/bez hlađenja) na koncentraciju galne, klorogenske, *p*-kumarinske kiseline, na siringaldehid i sinapin te na ukupnu koncentraciju slobodnih polifenola određenih HPLC metodom ($p < 0,05$).



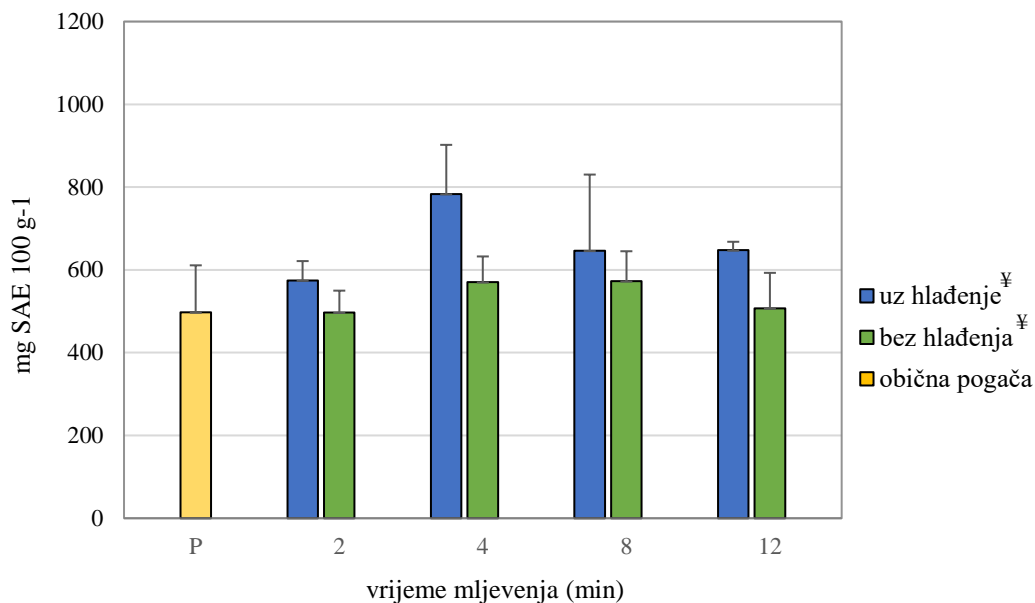
Slika 8. Kromatogram slobodnih polifenola snimljen na 280 nm – kontrolni uzorak pogače (P)

Usporedbom ukupnog sadržaja slobodnih fenolnih spojeva određenih spektrofotometrijskom metodom (slika 7.) i HPLC metodom (tablica 7. i 8.), uočena je nepodudaranost rezultata u svim uzorcima. Udio slobodnih polifenola u kontrolnom uzorku pogače prema Folin-Ciocalteu metodi iznosio je $677,3 \text{ mg SAE } 100 \text{ g}^{-1}$ dok je HPLC-om za isti uzorak dobiveno $2161,5 \text{ mg}$ u 100 g pogače. Rezultati dobiveni HPLC metodom kod uzoraka mljevenih uz hlađenje ukazuju na pad koncentracije polifenola u odnosu na kontrolni uzorak pogače, s tim da je linearno smanjenje koncentracije bilo prisutno do 4H ($1926,8 \text{ mg SAE } 100 \text{ g}^{-1}$) u odnosu na kontrolni uzorak, nakon čega se uočava rast kod 8H ($2115,2 \text{ mg SAE } 100 \text{ g}^{-1}$). Kod Folin-Ciocalteu metode, rezultati znatno osciliraju. Kod uzoraka mljevenih bez hlađenja, spektrofotometrijskom metodom utvrđen je porast koncentracija bez

linearnog trenda, dok je kod rezultata dobivenih HPLC metodom uočen pad koncentracije u 12 BH (2046,3 mg SAE 100 g⁻¹) u odnosu na kontrolni uzorak.

Vourela i sur. (2004) istraživali su ukupan sadržaj slobodnih fenolnih komponenti repice korištenjem spektrofotometrijske metode za određivanje ukupnih polifenola (TPC metode) te su dobili od 531 do 694 mg SAE 100 g⁻¹, ovisno o primijenjenoj metodi ekstrakcije fenola, a što je u skladu s rezultatom za kontrolnu pogaču u ovom radu. Kao standard su koristili također sinapinsku kiselinu umjesto preporučene galne kiseline. U tom istraživanju je također utvrđeno neslaganje između rezultata TPC-a i HPLC metode zbog razlika u metodologiji. Zaključno, predložena je primjena HPLC metode umjesto TPC metode u identifikaciji fenolnih spojeva zbog pouzdanosti i preciznosti. U ovom istraživanju, metodom korelacije rezultata dobivenih TPC i HPLC metodama nije utvrđena njihova međusobna povezanost ($r < 0,666$, granični koeficijent korelacije).

Na slici 9. prikazane su koncentracije ukupnih vezanih polifenola određenih spektrofotometrijskom metodom. Kao i kod slobodnih polifenola, utvrđeno je kako se dodatnim mljevenjem pogače povećava njihova koncentracija. S obzirom na porast i slobodnih i vezanih polifenolnih spojeva, možemo zaključiti da dodatno usitnjavanje pridonosi uspješnosti alkalne hidrolize, tj. materijal postaje dostupniji djelovanju natrijeve lužine. Međutim, samo je kod vezanih polifenola statistički potvrđen utjecaj načina mljevenja na njihovu ukupnu koncentraciju ($p \leq 0,05$). Tretman mljevenja uz hlađenje pokazao se učinkovitijim od mljevenja bez hlađenja. Najveću vrijednost pokazao je uzorak 4H (783,4 mg SAE 100 g⁻¹ u usporedbi s kontrolnim uzorkom koji je sadržavao 497,6 mg SAE 100 g⁻¹). Koncentracije vezanih fenola u uzorcima mljevenim bez hlađenja, s rasponom koncentracija od 497,05 mg SAE 100 g⁻¹ (2BH) do 507,3 mg SAE 100 g⁻¹ (12BH), nisu se značajno razlikovale od kontrolnog uzorka.

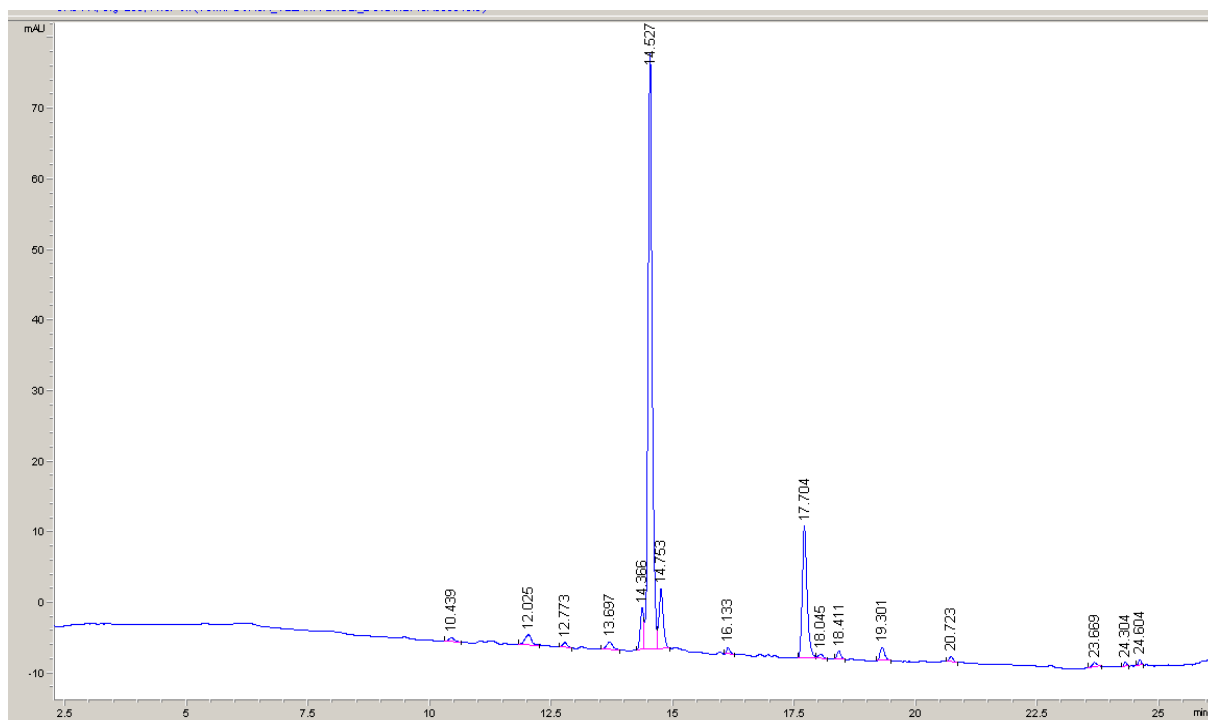


Slika 9. Koncentracija ukupnih vezanih fenola određena Folin-Ciocalteu metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija) ¥ način mljevenja ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Tablice 9. i 10. prikazuju kvantitativan i kvalitativan sastav vezanih fenolnih spojeva određenih HPLC metodom. Rezultati su izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija.

Treba napomenuti da se ekstrakcija i hidroliza provodila samo za fenolne spojeve vezane za staničnu stijenku, ne uključujući esterificirane oblike koji su bili određeni zajedno sa slobodnim polifenolnim spojevima.

Ukupni udio vezanih polifenola u običnoj pogači iznosio je 810,25 mg SAE 100 g⁻¹. Sinapinska kiselina pokazala se najdominantnijom, uz *p*-kumarinsku i ferulinsku što je u skladu s ranije objavljenim rezultatima (Kozłowska i sur., 1983). Sukladno tome, u uzorcima je najviše oslobođeno sinapinske kiseline (631,33 mg SAE 100 g⁻¹). To se vidi i na kromatogramu vezanih polifenola (slika 10.) gdje se jasno uočava veličina dominantnog pika. U znatno nižim koncentracijama bila je prisutna i ferulinska kiselina (30,44 mg SAE 100 g⁻¹). Prema Naczki i Shahidi (1989b), koncentracija polifenola vezanih za staničnu stijenku u pogači iznosi oko 100 mg 100g⁻¹, što je značajno manje u usporedbi s rezultatima ovog istraživanja.



Slika 10. Kromatogram vezanih polifenola snimljen na 280 nm – kontrolni uzorak pogače (P)

Tablica 9. Sastav i koncentracija ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) vezanih polifenola i njihovih derivata u pogači mljevenoj uz hlađenje određen HPLC metodom

Polifenolni spoj	Uzorak				
	P ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)	2H ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)	4H ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)	8H ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)	12H ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)
sinapinska kiselina	631,33 ± 97,44	534,57 ± 47,83	688,55 ± 76,67	542,77 ± 49,27	725,55 ± 64,75
ferulinska kiselina	30,44 ± 2,45	28,24 ± 0,63	30,95 ± 4,18	28,59 ± 0,73	33,69 ± 2,03
p-kumarinska kiselina [‡]	9,45 ± 1,00	9,40 ± 0,57	10,49 ± 1,21	8,74 ± 0,57	9,51 ± 0,85
ružmarinska kiselina	7,27 ± 1,18	6,01 ± 0,49	8,18 ± 0,92	5,40 ± 1,49	8,29 ± 0,70
siringaldehid	4,10 ± 0,20	3,73 ± 0,35	4,61 ± 0,39	3,50 ± 0,40	4,78 ± 0,63
neidentificirani spojevi	127,66 ± 6,89	176,21 ± 34,80	133,26 ± 12,07	96,10 ± 18,01	157,74 ± 17,25
Σ	810,25	758,16	876,04	685,10	939,56

[‡] način mljevenja (uz/bez kriogenog hlađenja) ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

Tablica 10. Sastav i koncentracija (mg 100 g⁻¹) vezanih polifenola i njihovih derivata u pogači mljevenoj bez hlađenja određen HPLC metodom

Polifenolni spoj	Uzorak				
	P (mg 100 g ⁻¹)	2BH (mg 100 g ⁻¹)	4BH (mg 100 g ⁻¹)	8BH (mg 100 g ⁻¹)	12BH (mg 100 g ⁻¹)
sinapinska kiselina	631,33 ± 97,44	462,20 ± 85,86	554,40 ± 103,16	491,67 ± 71,35	508,34 ± 142,46
ferulinska kiselina	30,44 ± 2,45	26,72 ± 3,30	28,52 ± 1,93	28,41 ± 2,25	26,39 ± 2,69
<i>p</i> -kumarinska kiselina [‡]	9,45 ± 1,00	7,78 ± 0,56	8,35 ± 0,75	7,84 ± 0,23	7,51 ± 1,45
ružmarinska kiselina	7,27 ± 7,27	4,33 ± 1,13	6,41 ± 1,37	4,90 ± 0,95	5,51 ± 1,48
siringaldehid	4,10 ± 0,20	3,37 ± 0,50	3,77 ± 1,09	4,40 ± 0,54	3,70 ± 0,44
neidentificirani spojevi	127,66 ± 6,89	99,76 ± 15,96	109,7 ± 2,34	104,01 ± 1,61	113,53 ± 29,55
Σ	810,25	602,17	711,14	641,23	664,96

[‡] način mljevenja (uz/bez kriogenog hlađenja) ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

Utjecaj mljevenja na oslobađanje vezanih polifenola je značajno oscilirao, bez utvrđenog trenda. Kod uzoraka mljevenih uz hlađenje (tablica 9.), uočeno je povećanje koncentracije polifenola u 12H (939,56 mg SAE 100 g⁻¹) u odnosu na običnu pogaču (810,25 mg SAE 100 g⁻¹). Nasuprot tome, u uzorku 8H došlo je do značajnog pada koncentracije (685,10 mg SAE 100 g⁻¹). Kod uzoraka mljevenih bez hlađenja (tablica 10.), također je utvrđen pad udjela fenolnih spojeva kod svih uzoraka. Najmanji iznos je zabilježen kod 2BH (602,17 mg SAE 100 g⁻¹). Treba napomenuti da statistički nije utvrđena povezanost između načina mljevenja i promjene koncentracije ukupnih vezanih polifenola ($p \geq 0,05$) HPLC metodom, osim na koncentraciju *p*-kumarinske kiseline ($p \leq 0,05$). Vrijeme mljevenja nije imalo nikakvog značajnog utjecaja na promjenu koncentracije niti ukupnih niti pojedinačnih polifenolnih spojeva ($p \geq 0,05$).

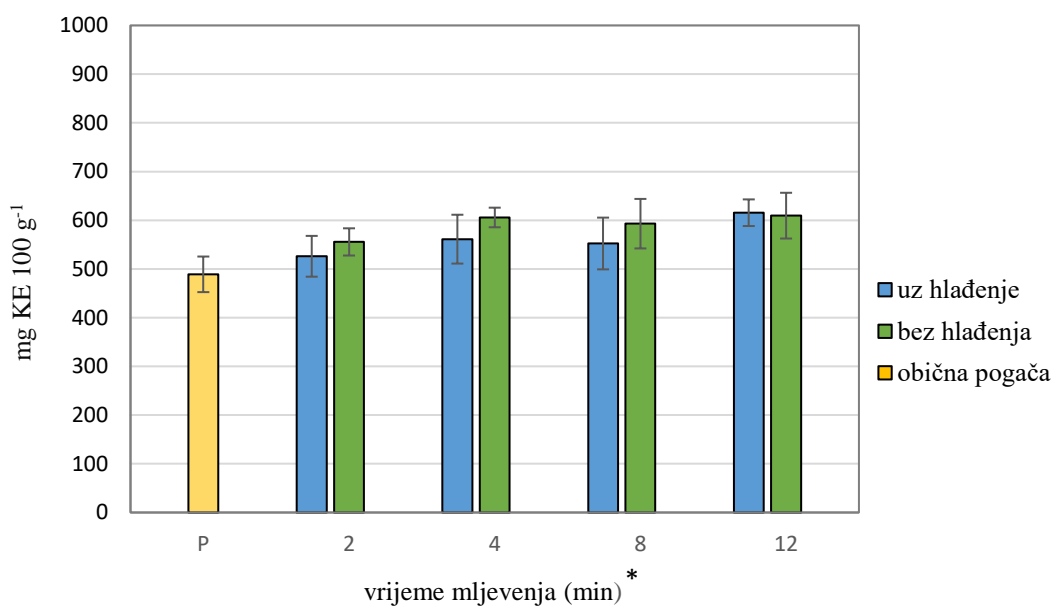
Rezultati ukupnog sadržaja vezanih fenolnih spojeva određenih spektrofotometrijskom metodom (slika 9.) i HPLC metodom (tablica 9. i 10.) pokazali su se nesukladnim. Ukupna koncentracija polifenola određena TPC metodom u kontrolnom uzorku (497,6 mg SAE 100 g⁻¹) bila je niža od vrijednosti dobivene HPLC metodom (810, 3 mg SAE 100 g⁻¹). Kod

svih uzoraka mljevenih uz hlađenje, spektrofotometrijskom metodom su utvrđene veće koncentracije u odnosu na kontrolni uzoraka dok je HPLC metoda dala rezultate s oscilacijama, bez ikakvog trenda. Ukupan udjel vezanih fenola određenih kromatografskom metodom se smanjio u uzorcima mljevenim bez hlađenja u odnosu na kontrolni uzorak, a kod TPC metode su koncentracije u 4BH (570,5 mg SAE 100 g⁻¹), 8BH (572,9 mg SAE 100 g⁻¹) i 12BH (507,3 mg SAE 100 g⁻¹) bile veće u odnosu na kontrolni uzorak (497,6 mg SAE 100 g⁻¹).

Metodom korelacije rezultata dobivenih TPC i HPLC metodama nije utvrđena njihova međusobna povezanost ($r < 0,666$, granični koeficijent korelacije).

4.4. KONCENTRACIJA TANINA

Na slici 11. prikazane su ukupne koncentracije ekstrahiranih tanina, izražene u mg ekvivalenta katehina (KE) u 100 g pogače.



Slika 11. Koncentracija tanina s obzirom na vrijeme i tip mljevenja (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja ± standardna devijacija)

* vrijeme mljevenja ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Prema rezultatima, P (489 mg KE 100 g⁻¹) je sadržavala manje tanina u odnosu na sve uzorke mljevene bez hlađenja. Ipak, oscilacije u BH uzorcima bile su prisutne što je

rezultiralo nepostojanjem trenda u promjeni koncentracije s obzirom na duljinu trajanja mljevenja. 4BH (605,7 mg KE 100 g⁻¹) i 12BH (609,5 mg KE 100 g⁻¹) bili su uzorci s najvećim sadržajem tanina.

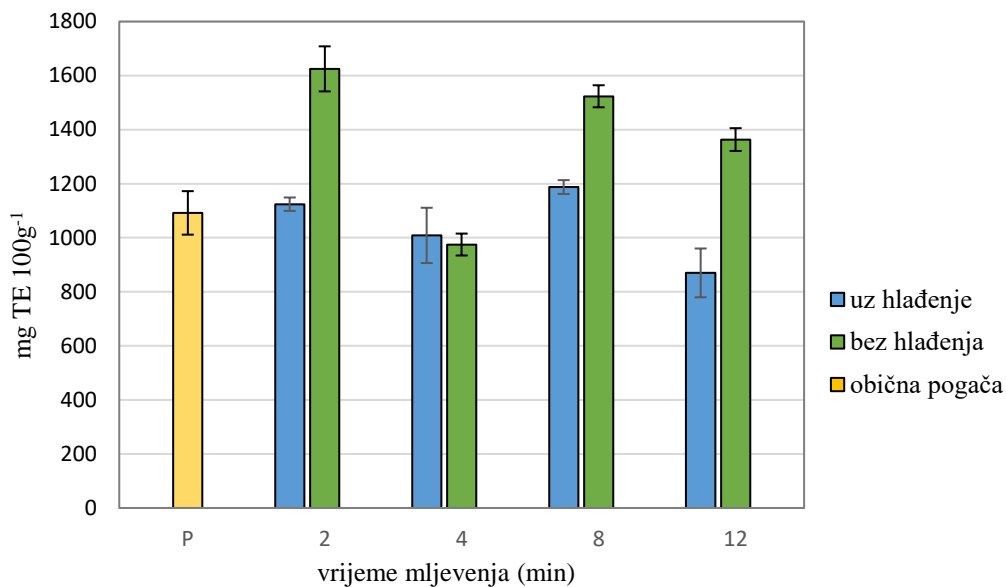
Uspoređujući s literaturom, sadržaj kondenziranih tanina u P bio je nešto niži. Shahidi i Naczk (1988, 1989a, 1989c) utvrdili su kako je udio tanina u različitim kanola sortama od 682-772 mg KE 100 g⁻¹ odmašćene sačme za razliku od ispitivane pogače u kojoj ima 489 mg KE 100 g⁻¹. Rezultati za 2BH, 4BH i 12BH mogu se usporediti s vrijednostima u literaturi, pri čemu koncentracije variraju od 555,5 mg KE 100 g⁻¹ za 2H do 609,5 mg KE 100 g⁻¹ u 12H pa se može reći da je mljevenje kriomlinom bez hlađenja indirektno poboljšalo ekstrakciju tanina.

Kod mljevenih uzoraka uz hlađenje, 12 H imao je najveći udio tanina (615,5 mg KE 100 g⁻¹) dok su ostale vrijednosti manje od uzoraka BH. Kod tanina je utvrđen značajan utjecaj vremena mljevenja na poboljšanje ekstrakcije ($p \leq 0,05$), dok se način mljevenja, s ili bez hlađenja, nije pokazalo statistički relevantnim.

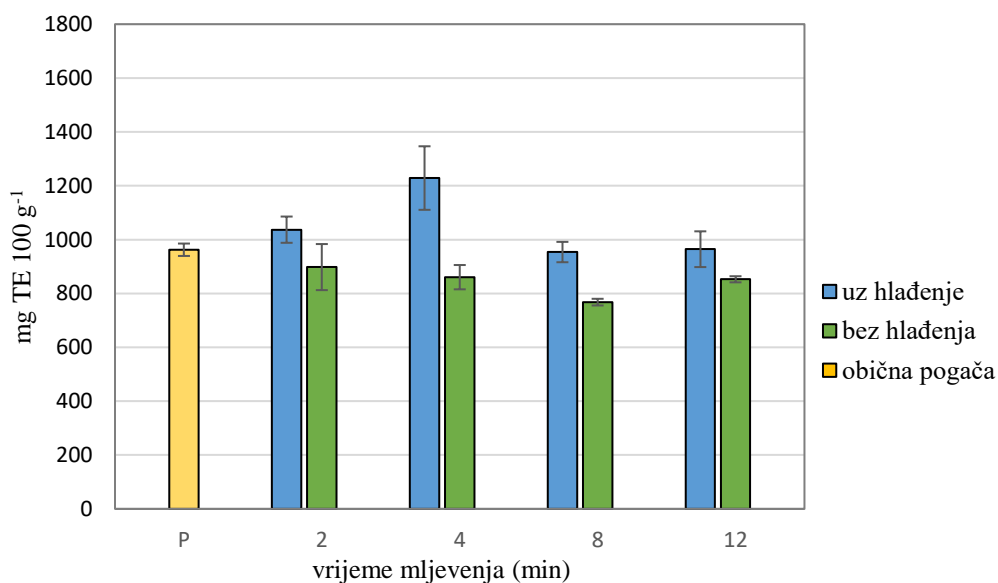
4.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA POLIFENOLNIH SPOJEVA

Prema rezultatima izraženim u mg ekvivalenta Troloxa (TE) 100 g⁻¹, antioksidacijska aktivnost slobodnih polifenola određena FRAP metodom (slika 12.) se mijenja oscilacijski, bez uočljivog linearnog trenda. Ipak, boljim se pokazalo mljevenje bez hlađenja. Uspoređujući s običnom pogačom (1091,9 mg TE 100 g⁻¹), najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak 2BH (1624,9 mg TE 100 g⁻¹), a najmanju 4BH (974,8 mg TE 100 g⁻¹). Uz hlađenje, antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva nije značajno porasla, a i niža je od antioksidacijske aktivnosti ekstrakata dobivenih iz pogača mljevenim bez hlađenja. Uzorci 2H (1124,1 mg TE 100 g⁻¹) i 8H (1187,7 mg TE 100 g⁻¹) imaju sličan udio kao obična pogača. Značajan pad uočava se kod uzorka 12BH (869,8 mg TE 100 g⁻¹).

Nasuprot slobodnim, vezani fenoli su pokazali veći antioksidacijski kapacitet u mljevenim uzorcima uz hlađenje (slika 13.) Najveći udio utvrđen je u 4H (1228,6 mg TE 100 g⁻¹) usporedno s kontrolnim uzorkom (1091,9 mg TE 100 g⁻¹). Mljevenjem bez hlađenja, koncentracija fenolnih spojeva opada. Najniži udio ima 8BH (767,8 mg TE 100 g⁻¹).



Slika 12. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata slobodnih polifenola određena FRAP metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija)



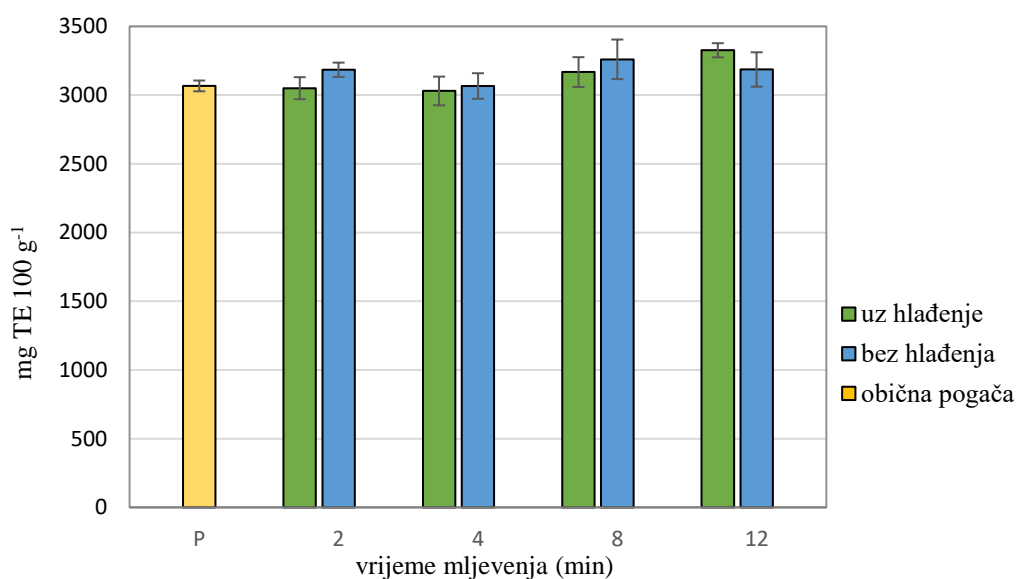
Slika 13. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vezanih polifenola određena FRAP metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija)

Rezultati DPPH metode prikazani su na slikama 14. i 15. Antioksidacijska aktivnost je, kao i kod FRAP metode, izražena u mg ekvivalenta Troloxa (TE) 100 g⁻¹, tj. ukupnoj koncentraciji antioksidansa koja je uspjela vezati slobodne radikale i tako neutralizirati njihovo djelovanje. Dobiveni iznosi su znatno veći od onih izmjerenih FRAP metodom, a

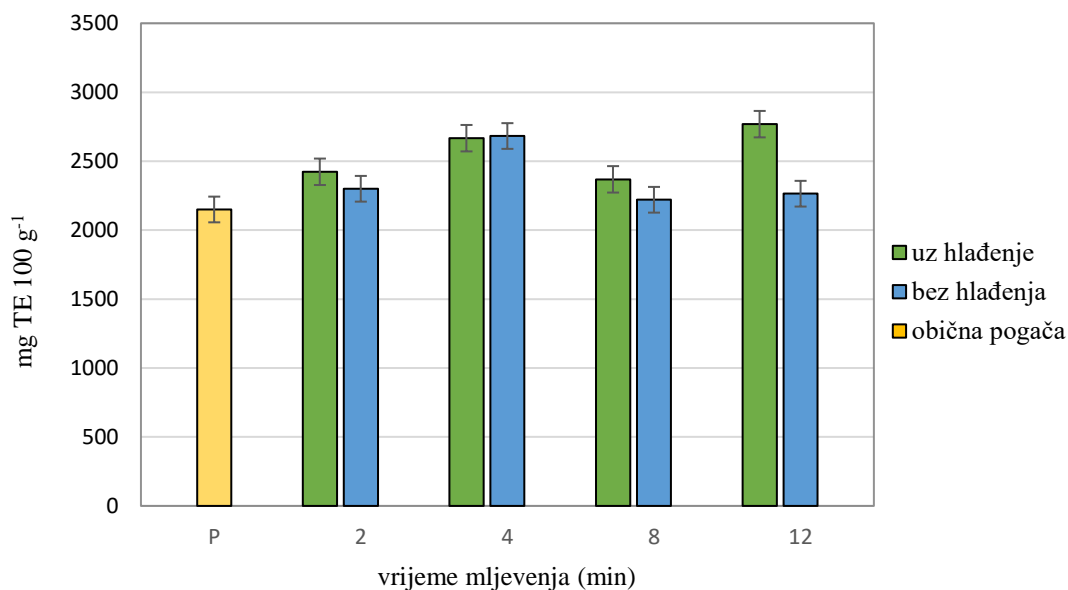
djelovanje hlađenja uz mljevenje se pokazalo sličnim kao kod samostalnog mljevenja, i kod vezanih i kod slobodnih fenolnih spojeva.

Slobodni polifenoli su ostvarili najveću antioksidacijsku aktivnost u 12H (3326,3 mg TE 100 g⁻¹), usporedno s običnom pogačom (3066,9 mg TE 100 g⁻¹). Vrijednosti u ostalim uzorcima su vrlo slične, bez obzira na tip mljevenja.

Vezani fenoli su očekivano pokazali manji antioksidacijski kapacitet. Najveći udio utvrđen je kod 12H (2768,6 mg TE 100 g⁻¹), usporedno s kontrolnim uzorkom. Najmanju antioksidacijsku aktivnost ima 2BH (2149,7 mg TE 100 g⁻¹).



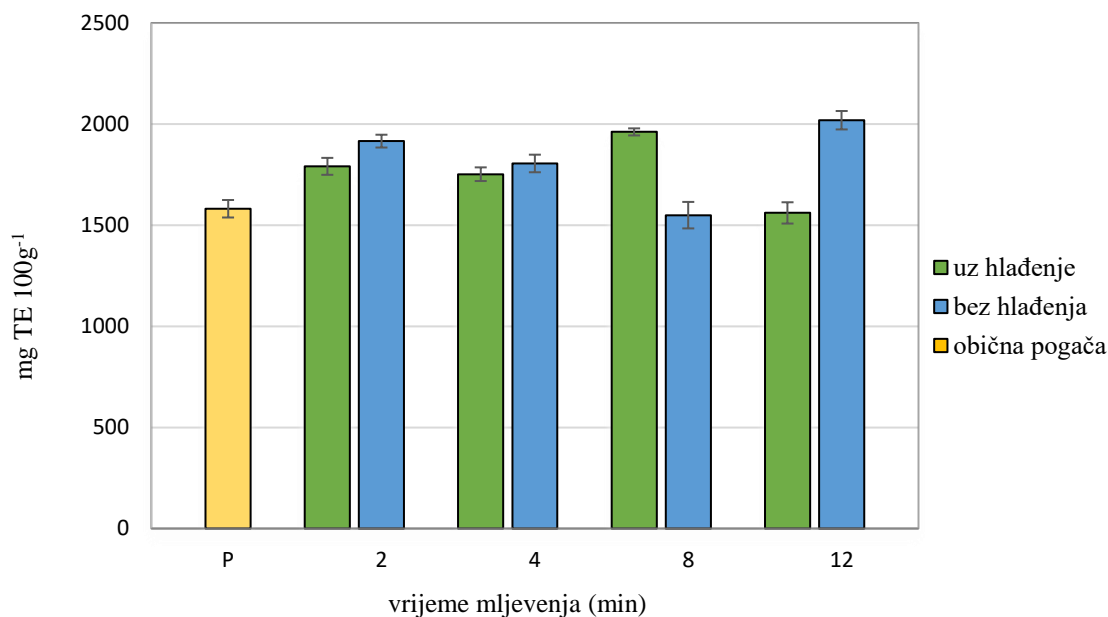
Slika 14. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata slobodnih polifenola određena DPPH metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja ± standardna devijacija)



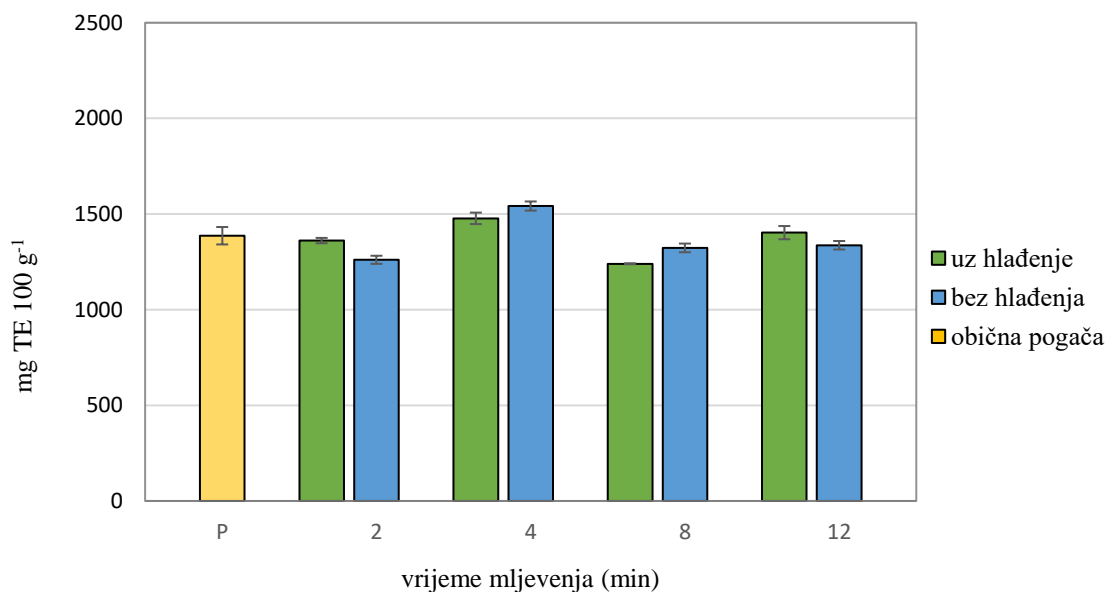
Slika 15. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vezanih polifenola određena DPPH metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija)

Rezultati ABTS metode na slici 16. prikazani su u mg ekvivalenta Troloxa (TE) u 100 g⁻¹ pogače, a odnosi se na slobodne fenole koji su pokazali veću antioksidacijsku aktivnost u uzorcima mljevenim bez hlađenja, usporedno s običnom pogačom i H uzorcima. Iako 8H (1961,4 mg TE 100 g⁻¹) predstavlja iznimku i ima najveću koncentraciju od hlađenih uzoraka tijekom mljevenja, 12BH (2019,202 mg TE 100 g⁻¹) ima veći antioksidacijski kapacitet. P (1581,4 mg TE 100 g⁻¹) ima niži udio fenolnih spojeva od oba tipa uzorka.

Vezani fenoli ponašaju se slično kao kod DPPH metode (slika 17.). Prisutna je nestalnost u rezultatima kod oba tipa uzorka i kod uzoraka mljevenih uz hlađenje i kod onih bez hlađenja dušikom. Primjerice, uzorci 4H (1477,5 mg TE 100 g⁻¹) i 4BH (1541,8 mg TE 100 g⁻¹) imaju najveći antioksidacijski kapacitet, čak i usporedno s P (1386,6 mg TE 100 g⁻¹).



Slika 16. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata slobodnih polifenola određena ABTS metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja ± standardna devijacija)



Slika 17. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vezanih polifenola određena ABTS metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja ± standardna devijacija)

Rezultati na slikama od 12. do 17., pokazuju različite rezultate antioksidacijskih aktivnosti slobodnih i vezanih fenolnih spojeva s obzirom na primjenjenu spektrofotometrijsku metodu. Metode DPPH, ABTS i FRAP dale su znatne oscilacije u rezultatima i za slobodne i vezane fenolne spojeve. Sukladno, nije utvrđen značajan utjecaj niti načina niti vremena mljevenja na antioksidacijsku aktivnost slobodnih i vezanih polifenolnih spojeva ($p \geq 0,05$).

Primjerice, u DPPH metodi su dobivene izrazito visoke koncentracije antioksidacijske aktivnosti slobodnih fenola u P (3066,9 mg TE 100 g⁻¹) dok je kod FRAP metode u istom uzorku utvrđena znatno niža vrijednost od 1091,0 mg TE 100 g⁻¹. Slično je i s ABTS metodom. Iako je DPPH metoda vrlo popularna zbog brzine i jednostavnosti, rezultati veći od očekivanih mogu se objasniti komplikacijama do kojih dolazi prilikom mjerenja. Primjerice, može doći do interferencije ukoliko se valna duljina ispitivajućih komponenti preklapa sa valnom duljinom DPPH pri 515 nm. Također, metoda se ne zasniva na kompetitivnoj reakciji. Smanjenje intenziteta boje DPPH nije samo rezultat vezanja slobodnih radikala, a sterički faktor određuje vrstu reakcije. Sve to utječe na netočnu interpretaciju antioksidacijske aktivnosti. Kod FRAP metode, rezultati se mogu znatno razlikovati ovisno o vremenu trajanja analize. Neki polifenoli reagiraju puno sporije pa im umjesto predviđene 4 minute treba 30 minuta za reakciju aktivnosti (Prior i sur., 2005). Brand i Williams (1995) ustanovili su da antioksidacijska aktivnost ovisi o količini prisutnih tanina i ukupnih polifenola, njihovoj molekularnoj strukturi i sinergiji fenolnih komponenata.

Metodom korelacije, potvrđena je nepouzdanost primjene sve tri spektrofotometrijske metode u određivanju antioksidacijske aktivnosti, pošto se dobiveni rezultati zajedno teško mogu uspoređivati i računati u obzir prilikom donošenja zaključka. U tablici 11. i 12. prikazani su koeficijenti korelacije antioksidacijskih metoda (ABTS, FRAP i DPPH) i sadržaja ukupnih fenolnih spojeva (TPC i HPLC) za slobodne i vezane fenolne spojeve.

Iz tablice 11. za slobodne fenole vidimo da nema povezanosti u rezultatima između bilo koje tri spektrofotometrijske metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti niti metodom TPC za određivanje ukupnih polifenola. Iz vidljive korelacije između HPLC i FRAP metode, može se preporučiti korištenje HPLC-a za određivanje ukupnih polifenola i FRAP metode u određivanju antioksidacijske aktivnosti.

Tablica 11. Koeficijenti korelacije (r) antioksidacijskih metoda i metoda određivanja ukupnog sadržaja fenolnih spojeva za slobodne polifenole. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti graničnog koeficijenta korelacije, $r > 0,666$.

Metoda	ABTS	FRAP	DPPH
ABTS	1		
FRAP	0,310	1	
DPPH	-0,213	0,267	1
TPC	0,599	0,62	0,317
HPLC	-0,0478	0,744	0,001

Iz tablice 12. za vezane polifenole vidimo da koreliraju FRAP i DPPH sa TPC metodom. Suprotno rezultatima za slobodne fenolne spojeve, HPLC metoda nije se pokazala prigodnom za vezane polifenole pošto nema povezanosti s rezultatima drugih metoda, iako su koeficijenti korelacije vrlo blizu minimalnog koeficijenta. Bez obzira na odsutnost korelacije, preporuka je svakako uz spomenute metode ponoviti i HPLC zbog utvrđene pouzdanosti.

Tablica 12. Koeficijenti korelacije (r) antioksidacijskih metoda i metoda određivanja ukupnog sadržaja fenolnih spojeva za vezane polifenole. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti graničnog koeficijenta korelacije, $r > 0,666$.

Metoda	ABTS	FRAP	DPPH
ABTS	1		
FRAP	0,309	1	
DPPH	0,649	0,443	1
TPC	0,339	0,718	0,672
HPLC	0,534	0,657	0,627

Pozitivni rezultati drugih istraživanja na kriomljevenju bila su poticaj za kreiranje eksperimenta na pogači uljane repice, pošto trenutno nema objavljenih istraživanja o utjecaju kriogenog mljevenja na antioksidacijski kapacitet i sastav fenolnih spojeva u uljaricama. Istraživanje u ovom radu je bazirano na pretpostavci da mljevenje na kriomlinu na određen način može utjecati na povećanje ukupne površine čestica pogače i posljedično, povećanje koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva (osobito onih vezanih na proteine i ugljikohidrate).

U ovom radu, kriomljevenje predstavlja predtretman sirovine dok se u drugim istraživanjima koristi i kao zamjena za tradicionalno mljevenje. Uređaj kriomlin koristi kriogene tekućine za hlađenje uzorka tijekom mljevenja i stvaranje atmosfere za sprječavanje gubitka određenih komponenti. Niska temperatura postiže se pomoću tekućeg dušika na -196 °C koji apsorpcijom generirane topline tijekom mljevenja prelazi u plinovito stanje te stvara inertan i suh okoliš oko uzorka. Najviše se koristi za različite začine bogate termolabilnim i hlapivim bioaktivnim spojevima. Prethlađenjem, sprječava se gubitak dragocjenih ulja i vlage, zadržavanjem kvalitete. Također, vrlo niske temperature dodatno prevode tekuće komponente u krute, poboljšavajući krutost materijala i redukciju do finih, sitnih čestica (Russo, 1976). Zbog navedenih prednosti, korišten je za razne proizvode poput začina, kave, čaja i dehidriranih proizvoda. Sharma i sur. (2014) proveli su istraživanje na začinu kuminu i utvrdili su pozitivan učinak kriogenog mljevenja. Očuvao se udio hlapivih

komponenti, povećao se ukupni sadržaj polifenola i flavonoida, a utvrđena je i povećana antioksidacijska aktivnost do 25,63 %, mjerena DPPH metodom u oba ispitivana genotipa. Također, Kaur i Srivastav (2017) proučavali su efekt hlađenja na sastav dehidrirane kore manga između 6 sorti, a u cilju utvrđivanja potencijala za korištenje u funkcionalnim proizvodima. Nakon mljevenja u kriomlinu, 3 od 6 sorti imale su znatno veće vrijednosti sadržaja ukupnih fenola (60,48 mg galne kiseline 100 g⁻¹) od prijašnjih studija, a DPPH test pokazao je povećanje sposobnosti inhibicije slobodnih radikala.

Uz pozitivan utjecaj na fizikalne i kemijske karakteristike sirovine, dosadašnja istraživanja ukazuju na ekonomičnost kriomljevenja. Ističu se prednosti nad tradicionalnim mljevenjem u pogledu povećanja kapaciteta, smanjenja energetske potrošnje i potrebnog kapaciteta motora te smanjenog rizika od požara, uz doprinos ekološkoj čistoći. Patel (2016) je u svojem istraživanju proučavao kvalitetu praha korijandera proizvedenog kriomljevenjem. Pri optimizaciji procesa, pratio je utjecaj temperature, veličine pora sita i kapacitet sirovine te njihov značaj u konačnoj kvaliteti praha (udio vlage, udio hlapivih komponenti, sadržaj linalola, veličina čestica i dr.) energetske potrošnji i utrošku tekućeg dušika. Prema dobivenim rezultatima, potrošnja tekućeg dušika raste snižavanjem do optimalne temperature (-30 °C). Suprotno, energetska potrošnja je bila manja pri nižim temperaturama i većim kapacitetima, usporedno s tradicionalnim mljevenjem. Razlozi se vežu uz krutu teksturu koja lakše puca pri niskim temperaturama, što posljedično omogućuje kraće vrijeme mljevenja.

S obzirom na dobivene rezultate i statističku obradu, pokazalo se da je način mljevenja imao značajan utjecaj na promjenu koncentracije slobodnih polifenola određenih HPLC metodom i vezanih polifenola određenih TPC metodom. Iako je samo TPC metodom utvrđeno da mljevenje sa/bez hlađenja utječe na ukupan sadržaj vezanih fenolnih spojeva, na temelju niskih koeficijenata korelacije spomenute metode s HPLC-om i dosadašnjih literaturnih spoznaja, u idućim istraživanjima preporučuje se korištenje HPLC metode za određivanje ukupnog sadržaja vezanih polifenola zbog pouzdanosti i preciznosti same metode.

Korištene spektrofotometrijske metode nisu dale relevantne rezultate u pogledu određivanja točne antioksidacijske aktivnosti različito mljevenih uzoraka pogače. Sukladno statističkoj korelaciji, ne možemo utvrditi da su sve tri metode prikladne za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, niti kod slobodnih niti kod vezanih fenolnih spojeva. U narednim istraživanjima preporučuje se modifikacija primjenjenih metoda kod određivanja antioksidacijskog kapaciteta slobodnih fenolnih spojeva u vidu optimizacije vremena trajanja reakcije, pripreme reagensa i slično. Iako TPC metoda u ovom radu korelira sa spomenutim

spektrofotometrijskim metodama kod vezanih polifenola, u literaturi su dobiveni slični zaključci u pogledu njene nepouzdanosti pa nije izgledno da bi ponavljanje te metode dalo drugačije rezultate.

Premda je HPLC metodom utvrđen značajan utjecaj načina mljevenja na ukupan sadržaj slobodnih polifenola, bile su prisutne velike oscilacije u rezultatima korelacija i antioksidacijskih aktivnosti. Međutim, u obzir treba uzeti nepouzdanost antioksidacijskih metoda i odsutnost trenda u rezultatima koji su potvrđeni i u literaturi. U daljnim istraživanjima, moglo bi se preporučiti korištenje HPLC-a u kombinaciji sa FRAP metodom pri ispitivanju utjecaja kriomljevenja na ukupan sadržaj slobodnih fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost. Zbog izostanka korelacije HPLC metode sa spektrofotometrijskim metodama kod vezanih polifenola, postavlja se pitanje isplativosti i perspektive nastavka istraživanja u tom smjeru.

Kod tanina, utvrđena je statistički značajna razlika među uzorcima s obzirom na duljinu mljevenja. Postoji mogućnost korištenja mljevenja bez hlađenja, ali postavlja se pitanje isplativosti takvog dodatnog predtretmana u vidu potrošnje energije. Potrebna su daljnja istraživanja i modifikacije postojećih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti kako bi se pokušao utvrditi maksimalan antioksidacijski kapacitet tanina. Ukoliko bi se navedenim predtretmanom postigle visoke koncentracije tanina u pogači, problem se javlja u upotrebi takve pogače pošto u uljanoj repici oni djeluju kao antinutrijenti. Rješenje može biti izolacija tanina kojom bi dobili polifenolne ekstrakte kao moguću zamjenu za sintetske antioksidanse, a dobivena pogača bi imala bolju probavljivost i veću nutritivnu vrijednost.

Iako je potvrđena „*in vitro*“ antioksidacijska aktivnost tanina poput inhibicije lipidne peroksidacije, „*in vivo*“ studije još nisu utvrdile njihovu biološku i metaboličku aktivnost pa trenutno nije izgledno koristiti tanine u obliku dodataka za, npr. funkcionalne proizvode, a najviše zbog formiranja neprobavljivih kompleksa s proteinima, šećerima, enzimima i metalnim ionima (Koleckar i sur., 2008). Svakako se otvara mogućnost njihove ekstrakcije iz pogače, čime bi se mogla znatno promijeniti uloga repičine pogače na tržištu u vidu potencijalnog dodatka ljudskoj prehrani, bez prisutnosti tanina kao nepoželjnih inhibitora i spojeva odgovornih za negativne senzorske osobine same pogače.

5. ZAKLJUČCI

Iz rezultata i provedene rasprave moguće je izvesti slijedeće zaključke:

1. Finim mljevenjem uz kriogeno hlađenje, došlo je do značajnog povećanja koncentracije ukupnih vezanih polifenola analiziranih Folin Ciocalteau metodom. Mljevenjem bez hlađenja, ukupan sadržaj slobodnih polifenola značajno se povećao u svim analiziranim uzorcima pogače uljane repice primjenom HPLC metode.
2. Utvrđen je značajan utjecaj načina mljevenja na koncentraciju vezanih i slobodnih polifenolnih spojeva. Mljevenjem uz hlađenje, povećala se koncentracija *p*-kumarinske kiseline, oslobođene tijekom alkalne hidrolize dok se smanjila koncentracija galne, klorogenske i *p*-kumarinske kiseline, siringaldehida i sinapina.
3. Zbog utvrđenih nesukladnosti rezultata između spektrofotometrijske i kromatografske metode, HPLC se kao pouzdana kromatografska metoda preporučuje za kvantitativno i kvalitativno određivanje fenolnih spojeva pogače uljane repice.
4. Neovisno o načinu mljevenja, produljenim vremenom procesa povećava se koncentracija ukupnih tanina. Optimalnim se pokazalo vrijeme mljevenja od 4 minute bez hlađenja čime se udio tanina povećava za gotovo 25 % u usporedbi s običnom pogačom.
5. Ni vrijeme ni način mljevenja pogače nisu imali značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost.
6. Mljevenje u kriomlinu bez hlađenja može se koristiti kao predtretman za ekstrakciju polifenola ili u analitičke svrhe pripreme uzoraka. S obzirom na cijenu procesa i nedovoljan doprinos povećanju koncentracije polifenolnih spojeva, kriogeno hlađenje nije se pokazalo kao ekonomski isplativ predtretman. No, mljevenje s kriogenim hlađenjem kao priprema za analizu bioaktivnih spojeva daje točniji rezultat nego li mljevenje bez hlađenja.

6. LITERATURA

Abrehdari, S., Ghavami, A., Gharachorloo, M., Delkhosh, B. (2015) Evaluation and chemical comparison of triple-zero canola cultivars. *Biol. Forum Int. J.* **7**, 1037-1044.

Adams, J., Cassarino, C., Lindstrom, J., Eslin, L., Lux, S., Holcomb, F. (2006) Canola oil fuel cell demonstration: Volume III - technical, commercialization, and application issues associated with harvested biomass, <<http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a457436.pdf>>. Pristupljeno 20. lipnja 2018.

Aider, M., Barbana, C. (2011) Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - a practical and critical review. *Trends Food Sci. Technol.* **22**, 21-39.

Ajila, C. M., Bhat, S. G., Rao, U. J. (2007) Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chem.* **102**, 1006-1011.

Amarowicz, R., Naczki, M., Shahidi, F. (2000) Antioxidant activity of crude tannins of canola. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**, 957-961.

Amarowicz, R., Shahidi, F. (1994) Chromatographic separation of glucopyranosyl sinapate from canola meal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 551-552.

Appelqvist, L. (1972) Chemical constituents in rapeseed. U: Rapeseed: cultivation, composition, processing and utilization (Appelqvist, L., Olson, R., ured.), Elsevier Publishing Co., Amsterdam, Nizozemska, str. 123-173.

Artz, W. E., Swanson, B. G., Sendzicki, J., Rasyid, A., Birch, R. E. W. (1986) Plant proteins: applications, biological effects and chemistry. American Chemical Society, Washington, str. 126-137.

Armstrong, W. D., Featherston, W. R., Rogler, J. C. (1974) Effect of bird-resistant sorghum grain and various commercial tannins on chick performance. *Poultry Sci.* **53** (2), 2137-2142.

- Barthet, V. J., Daun, J. K. (2011) Seed morphology, composition, and quality. U: Canola: Chemistry, Production, Processing, and Utilization, (Daun, J., Eskin, N., Hickling, D., ured.) AOCS Press, Urbana, str. 135-145.
- Bell, J. (1993) Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. *Can. J. Anim. Sci.* **73**, 689-697.
- Bell, J. M., Keith, M. (1991) A survey of variation in the chemical composition of commercial canola meal produced in Western Canadian crushing plants. *Can. J. Anim. Sci.* **71**, 469-480.
- Bell, J. M., Shires, A. (1982) Composition and digestibility by pigs of hull fractions from rapeseed cultivars with yellow or brown seed coats. *Can. J. Anim. Sci.* **62**, 557-565.
- Benzie, I., Strain, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Bhatty, R., McKenzie, S., Finlayson, A. (1968) The proteins of rapeseed (*Brassica napus* L.) soluble in salt solutions. *Can. J. Biochem.* **45**, 1191-1197.
- Bjerg, B., Kachlicki, P., Larsen, L., Sørensen, H. (1987) Metabolism of glucosinolates. Proceedings of 7th Interational Rapeseed Congress. Poznan, Poljska, 11-14 svibnja 1987, 2, str. 496-506.
- Bockisch, M. (1998). Fats and oils handbook. AOCS Press. Illionois.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food. Chem. Toxicol.* **51**, 15-25.
- Carré, P., Citeau, M., Robin, G., Estorges, M. (2016) Hull content and chemical composition of whole seeds, hulls and germs in cultivars of rapeseed (*Brassica napus*). *OCL*, **23**(3), 7-8.

- Clandinin, D. (1961). Effect of sinapine, the bitter substance in rapeseed oil meal on the growth of chickens. *Poultry Sci.* **40**, str. 484-487.
- Cosgrove, D. J. (1980) Inositol phosphates: their chemistry, biochemistry and physiology, Elsevier Sci. Pub.Co., New York.
- Čović, D., Bojić, M., Medić-Šarić, M. (2009) Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farmaceutski glasnik.* **65**, 693-704.
- Dabrowski, K., Sosulski, F. (1984) Composition of free and hydrozylable phenolic acids in defatted flours of 10 oilseeds. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 128-130.
- Darlington, G., La Cour, L. (1945) Chromosome breakage and the nucleic acid cycle. *J. Gener.* **46**, 180-267.
- Dev, D. K., Mukherjee, K. D. (1986) Functional properties of rapeseed protein products with varying phytic acid contents. *J. Agric. Food Chem.* **34** (5), 775-780.
- Dewick, P. (2001) The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 334-355.
- Downey, R., Bell, J. (1990) New developments in canola research. U: Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology (Shahidi, F., ured.), Van Nostrand Reinhold, New York, SAD, str. 37-47.
- Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske (2017) *Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2017*, str.261, <https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2017/sljh2017.pdf>. Pristupljeno 20.lipnja 2018.
- Durkee, A.B. (1971)The nature of tannins in rapeseed (*Brassica campestris*). *Phytochem.* **10**, 1583-1585.
- FAOSTAT (2014) Food and Agriculture Organization of United Nations, <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD>>. Pristupljeno 20. lipnja 2018.
- Feedipedia (2012) Rapeseed meal, < <https://www.feedipedia.org/node/52>>. Pristupljeno 20. lipnja 2018.
- Fenton, T., Leung, J., Clandinin, D. (1980) Phenolic components of rapeseed meal. *J. Food Sci.* **45**, 1702-1705.

Fenwick, G., Heaney, R., Mullin, W. (1983) Glucosinolates and their breakdown in food and food plants. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **18**, 123-201.

Fenwick, G. R., Pearson, A. W., Greenwood, N. M., Butler, E. G. (1981) Rapeseed meal tannins and egg taint. *Anim. Feed Sci. Technol.* **6**, 421-431.

Finlayson, A., Bhatti, R., McKenzie, S. (1976) The effects of extraction solvents on the yields and structures of *Brassica* sp. meal proteins. *Can. Inst. Food. Sci. Technol.* **9**, 212-215.

Finot, P. A (1983) Influence of processing on the nutritional value of proteins. *Qual. Plant. Plant. Foods Hum. Nutr.* **32**, 439-453.

Ford, J. E., Hewitt, D. (1974) Protein quality in cereals and pulses. 2. Influence of polyethylene glycol on nutritional availability of methionine in sorghum (*Sorghum vulgare* Pers.), field beans (*Vicia faba* L.), and barley. *Br. J. Nutr.* **42**, 317-323.

Gillberg, L., Törnell, B. (1976) Preparation of rapeseed protein isolates: Dissolution and precipitation behaviour of rapeseed proteins. *J. Food. Sci.* **41**, 1063-1069.

Grbeša, D., Černy, T., Homen, B. (1993) Kemijski sastav i hranjive vrijednosti krmiva za preživače u Hrvatskoj. *Krmiva.* **35** (6), 293.

Greenwood, J. S. (1989) Phytin synthesis and deposition. U: Recent advances in development and germination of seeds, (Taylorson, R., ured.), Springer., Boston, str. 187.

Gustavson, K.H. (1954) Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. *J. Poly. Sci.* **12**, 317-324.

Haslam, E. (1981) Vegetable tannins. U: The biochemistry of plants, (Stumpf, P., Conn, E., ured.), Academic Press, London, 7, str. 134-136.

Haslam (1979) Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. *Phytochem.* **16**, 1625-1640.

HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari, (osnovna referentna metoda).

- HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (osnovna referentna metoda).
- HR EN ISO 20483:2014, Žitarice i mahunarke – Određivanje sadržaja dušika i proračun sadržaja sirovih proteina (osnovna referentna metoda).
- HRN EN ISO 2171:2010, Žitarice – Određivanje ukupnog pepela spaljivanjem (osnovna referentna metoda).
- HRN EN ISO 12966-2:2017, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom - 2. dio: Priprava metilnih estera masnih kiselina (osnovna referentna metoda)
- Huang, A. (1992) Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **43**, 177-200.
- Igor, S., Diosady, L., Rubin, L. (1993) Catalytic deamidation of canola proteins. *Acta Aliment.*, **22**, str. 325-336.
- Jia, W., Mikulski, D., Rogiewicz, A., Zdunczyk, Z., Jankowski, J., Slominski, B. A. (2012) Low-fiber canola: Part 2. Nutritive value of the meal. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 12231-12237.
- Johnson, I. (2002) Glucosinolates: Bioavailability and importance to health. *Int. J. Vitam. Nut. Res.* **72** (1), 26-31.
- Jones, J., Holme, J. (1979) Oilseed processing. US patent 4,158,656.
- Kaur, B., Srivastav, P. (2018) Effect of cryogenic grinding on chemical and morphological characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) peel powder. *J. Food Process. Preserv.* **42**, e13583. doi:10.1111/jfpp.13583.
- Khattab, R. Y., Arntfield, S. D. (2009) Functional properties of raw and processed canola meal. *Lwt. Food Sci. Technol.* **42**(6), 1119-1124.
- Koleckar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun D., Jahodar, L., Opletal, L. (2008) Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini-rev. med. chem.* **8**, 436-447.

Koski, A., Pekkarinen, S., Hopia, A., Wahala, K., Heinonnen, M. (2003) Processing of rapeseed oil: effect on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 10-114.

Kozłowska, H., Naczek, M., Shahidi, F., Zadernowski, R. (1990) Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. U: Canola and rapeseed production: chemistry, nutrition and processing technology, (Shahidi, F., ured.), Van Nostrand Reinhold, New York, str. 193-210.

Kozłowska, H., Rotkiewicz, D., Zadernowski, R. (1983a) Phenolic acids in rapeseed and mustard. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60**, 1119-1123.

Kozłowska, H., Sabir, M. A., Sosulski, F. W., Coxworth, E. (1975) Phenolic constituents of rapeseed flour. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **8**, 160-163.

Kozłowska, H., Zadernowski, R., Sosulski, F. (1983b) Phenolic acids in oilseed flours. *Nahrung*, **27**, 449-453.

Kraljić, K. (2013) Utjecaj parametara proizvodnje na karakteristike repičinog ulja s područja Republike Hrvatske. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Kraljić, K., Škevin, D., Pospíšil, M., Obranović, M., Neđeral, S., Bosolt, T. (2013) Quality of rapeseed oil produced by conditioning seeds at modest temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 589-599.

Kryger, K., Sosulski, F., Hogge, L. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 2. Composition of phenolic acids in rapeseed flour and hulls. *J. Agric. Food.* **30**, 334-336.

Kushad, M.M., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Juvik, J. A., Klein, B.P., Wallig, M.A., Jeffery, E. H. (1999). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *J. Agric Food Chem.* **47**(4),1541-1548.

Kuwahara, H., Kanazawa, A., Wakamatsu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, T., Maeda, H. (2004) Antioxidative and Antimutagenic Activities of 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (Canolol) Isolated from Canola Oil. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4380-4387

- Larsen, L. M., Sørensen, H. (1985). The value of oilseed rape production in Denmark and the EEC. U: Advances in the production and utilization of cruciferous crops (Sørensen, H., ured.), Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht, str. 1-18.
- Leming, R., Lember, A. (2006). Chemical composition of expeller-extracted and cold-pressed rapeseed cake. *Agraarteadus*. **16**, 103-109.
- Leung, J., Fenton, T. W., Mueller, M. M., Clandinin, D. R. (1979) Condensed tannins of rapeseed meal. *J. Food Sci.* **44** (1), 313-1,316.
- Lo, M., Hill, D. (1971) Evaluation of protein concentrates prepared from rapeseed meal. *J. Sci. Food. Agric.* **22**, 128-130.
- Loomis, W. D. (1974) Overcoming problems of phenolics of quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.* **31**, 528-544.
- Lønnerdal, B., Gillberg, L., Tönell, B. (1977) Preparation of rapeseed protein isolates: A study of rapeseed protein isolates by molecular sieve chromatography. *J. Food.* **42**, 75-78.
- Malcolmson, L., Vaisey-Genser, M., Walker, B. (1978) Some textural and flavour characteristics of canola/rapeseed. Proceedings 5th International Rapeseed Congress,, Malmo, Sweden, str. 47-152.
- Martini, D., Taddei, F., Nicoletti, I., Ciccoritti, R., Corradini, D., M.G., D. (2014) Effects of genotype and nvironment on phenolic acids content and total antioxidant capacity in durum wheat. *Cereal Chem.*, **91**(4), 310-317.
- Matthäus, B. (1998) Effect of dehulling on the composition of antinutritive compounds in various cultivars of rapeseed. *Lipid / Fett.* **100**, 295-301.
- Matthäus, B. (2013) Effect of canolol on oxidation of edible oils. U: Canola and rapeseed: production, processing, food quality and nutrition, (Thiyam-Holländer, U., Michael Eskin, N.A., Matthäus, B., ured.), CRC Press, Boca Raton, Florida, str. 317-329.
- McCurdy, S. (1990) Effects of processing on the functional properties of canola/rapeseed protein. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **67**(5), 281-284.
- Mills, J. T., Chong, J. (1977) Ultrastructure and mineral distribution in heat-damaged rapeseed. *Can. J. Plant Sci.* **57**, 21-34.

Mirjana Cvitanić (2016) Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Mithen, R., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S., Johnson, I. (2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 967-984.

Morinaga, T. (1934) Interspecific hybridization in *Brassica*. VI. The cytology of F1 hybrids of *B.juncea* and *B.nigra*. *Cytologia.* **6**, 62-67.

Naczk, M., Amarowicz, R., Pink, D., Shahidi, F. (2000) Insoluble condensed tannins of canola/rapeseed. *J Agric Food Chem*, **48** (5), 1758-1762.

Naczk, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., Shahidi, F. (1998) Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.* **62** (4), 489-502.

Naczk, M., Diosady, L. L., Rubin, L. J. (1985) Functional properties of canola meals produced by a two phase solvent extraction system. *J. Food Sci.* **50**, 1685–1688.

Naczk, M., Shahidi, F. (1989b) The effect of methanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chem.* **31**, 159-164.

Naczk, M. and Shahidi, F. (1997) Canola phenolics and their nutritional implications. Abstract. U: Antinutrients and phytochemicals in food (Shahidi, F., ured.), American Chemical Society, Washington D.C., SAD, str. 207.

Nagaharu, U. (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.* **7**, 389–452

National Research Council (1982) United States-Canadian tables of feed composition: nutritional data for United States and Canadian Feeds, 3.revizija, The National Academies Press, Washington, D.C.

Newkirk, R. (2009) Canola meal. Feed Industries Guide, 4 izd., Canadian International Grains Institute, Winnipeg.

Newkirk, R. (2011) Meal nutrient composition. U: Canola: chemistry, production, processing, and utilization, (Daun, J.K., Eskin, N.A.M., Hickling, D., ured.), AOCS Press, Urbana, str. 229-244.

Nowak, H., Kujawa, R., Zadernowski, R., Roczniak, B., Kozłowska, H. (1992) Antioxidative and bactericidal properties of phenolic compounds in rapeseeds. *Fat Sci. Technol.* **94**, 149-152.

NSW Department of Primary Industries (2014) Variability of quality traits in canola seed, oil and meal - a review, <https://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0007/517786/variability-of-quality-traits-in-canola-a-review.pdf> Pristupljeno 20.lipnja 2018.

Oakenfull, D., Pearce, J., Burley, R. W. (1997) Protein gelation. U: Food proteins and their applications, (Damodaran, S., Paraf, A., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 114-141.

Ohlson, R., Anjou, K. (1979) Rapeseed protein products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 431-437.

Patel, J.N. (2016) Production of high quality coriander powder using cryogenic grinding. Disertacija, College of food processing technology & bio-energy, Anand.

Pekkarinen, S.S., Stöckmann, H., Schwarz, K., Heinonen, M., Hopia, A.I. (1999) Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3036–3043.

Pospišil, M. (2013) Ratarstvo; II.dio-industrijsko bilje. Zrinski d.d., Čakovec.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) Narodne novine 041, Zagreb.

Price, M., Van Scoyoc, S., Butler, L. (1978) A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1214-1218.

Prior, R.L., Xianli, W., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290–4302.

Przybylski, R., Mag, T., Eskin, N., McDonald, B. (2005). Canola oil. U: Bailey's industrial oil and fat products, Vol. 2., Edible oil and fat products: Edible Oils, 6.izd., (Shahidi, F., ured.), Wiley, Hoboken, str. 6-121.

Raab, B., Schwenke, K. (1984) Simplified isolation procedure for 12S globulin and the albumin fraction from rapeseed (*Brassica napus* L.). *Nahrung*. **28**, 863-866.

Rac, M. (1964) *Ulja i masti*. Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.

Reddy, N. R., Sathe, S. K., Salunkhe, D. K. (1982) Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* **28**, 1-92.

Reynolds, J. R., Youngs, C. (1964) Effect of seed preparation on efficiency and oil quality in filtration extraction of rapeseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **41**, 63-67.

Russo, J. (1976) Advanced techniques in new spice plant-cryogenic grinding material handling. *Int. J. Food Eng.* **1**(8), 33-35.

Salunkhe, D. K. (1992). World oilseeds: chemistry, technology, and utilization, Van Nostrand Reinhold, New York, str. 59-96.

Scalbert, A., Manach, C., Moran, C., Remesy, C. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **45**, 287-306.

Schwenke, K., Raab, B., Linow, K. U. (1981) Isolation of the 12S globulin from rapeseed (*Brassica napus* L.) and characterization as a neutral protein on seed proteins, part 13. *Nahrung*. **5**, 271-280.

Shahidi, F., Naczk, M. (1992) An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 917-924.

Shahidi, F., i Naczk, M. (1989a) Effect of processing on the content of condensed tannins in rapeseed meals: a research note. *J. Food Sci.*, **54**, 1082-1083.

Shahidi, F., Naczk, M. (1988) Effect of processing on the phenolic constituents of canola. Proceedings 14th Int. Conf. Group Polyphenols, Narbonne, France. 16-19 kolovoza 1988, str. 89-92.

Shahidi, F., i Naczk, M. (1989c) Solvent extraction of tannins from canola. 50th annual meeting of the Institute of Food Tochnologists. Chicago, 25.- 29.lipanj.

Shahidi, F. (1990) Rapeseed and canola: Global production and distribution. U: Canola and rapeseed production, chemistry and processing technology, (Shahidi, F., ured.), Springer, New York, str. 3-15.

Sharma, L., Rathore, S., Saxena, S. (2014) Cryogenic grinding technology enhances volatile oil,oleoresin and antioxidant activity of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Int J. Seed Spices*, **4** (2), 68-72.

Simopoulos A., (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3essential fatty acids, *Biomed. Pharmacother.* **56**, 365-379.

Sosulski, F. (1979) Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: A review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 711-714.

Sörensen, H. (1990) Glucosinolates: structure - properties - function. U: Canola and rapeseed: production,chemistry,nutrition and processing technology, (Shahidi, F., ured.), Van Nostrand Reinhold, New York, str. 149-183.

Spragg, J., Mailer, R. (2007) Canola meal value chain quality improvement: A final report prepared for AIC and CRC. Project code: 1B-103-0506., <http://www.porkcrc.com.au/Final_Report_1B-103.pdf>. Pristupljeno 20.lipnja 2018.

Thiyam-Holländer, U., Schwarz, K. (2013) Rapeseed and canola phenolic: Antioxidant attributes and efficacy U: Canola and rapeseed: production, processing, food quality and nutrition, (Thiyam-Holländer, U, Michael Eskin, N.A., Matthäus, B, ured.), CRC Press, Boca Raton, Florida, str. 277-299.

Thompson, L. (1990) Phytates in canola/rapeseed. U: Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology, (Shahidi, F., ured.), Springer Pub., New York, str. 173-193.

- Torres-Leon, C., Rojas, R., Contreras-Esquivel, J. C., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R. E., Aguilar, C. N. (2016) Mango seed: functional and nutritional properties. *Trends Food Sci Tech.* **55**, 109-117.
- Tripathi, M., Mishra, A. (2007) Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed Sci.* **132**, 1-27.
- Tzeng, Y., Diosady, L., Rubin, L. (1990) Production of canola protein materials by alkaline, extraction, precipitation, and membrane processing. *J. Food Sci.* **55**, 1147-1151.
- Unger, E. (1990) Commercial processing of canola and rapeseed: Crushing and oil extraction. U: Canola and rapeseed: Production, chemistry, nutrition and processing technology, (Shahidi, F., ured.), Van Nostrand Reinhold, New York, str. 235-251.
- Uppström, B., Svensson, R. (1980) Determination of phytic acid in rapeseed meal. *J. Sci. Food Agric.* **31**, 651-656.
- VanEtten, C.H., Daxenbichler, M.E., Wolff, I.A. (1969) Natural glucosinolates in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* **17**, 483-491.
- Van Soest, P. J. (1992) Nutritional ecology of the ruminant, 2.izd., Cornell University Press, New York.
- Verkerk, R., Dekker, M. (2008) Glucosinolates. U: Bioactive compounds in foods, (Bilbert, J., Senyuva, H., ured.), Blackwell Publishing Ltd, New Jersey, str. 31-51.
- Vourela, S., Meyer, A., Heinonen, M. (2004) Impact of isolation method on the antioxidant ctivity of rapeseed meal phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 8202-8207.
- Wolfram, K., Schmidt, J., Wray, V., Milkowski, C., Schliemann, W., Strack, D. (2010) Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochem.* **71**, 1076-1084
- Wu, J., Muir, A. D. (2008) Comparative structural, emulsifying, and biological properties of 2 major canola proteins, cruciferin and napin. *J. Food Sci.* **73**(2), 210-216.

Xu, L., Diosady, L. (2003) Fats and oils from plant materials. U: Extraction optimization in food engineering, (Tzia, C., Liadakis, G., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str.181-211.

Xu, L., Diosady, L. (2013) Processing of canola proteins; A review. U: Canola and rapeseed: production, processing, food quality and nutrition, (Thiyam-Hollander, U., Michael Eskin, N.A., B. Matthäus, ured.), CRC Press, Boca Raton, Florida, str. 59-79.

Xu, L., Diosady, L. (1997) Rapid method for total phenolic acid determination in rapeseed/canola meals. *Food Res. Int.* **30**, 571-574.

Yiu, S. H., Poon, H., Fulcher, R. G., Altosaar, I. (1982) The microscopic structure and chemistry of rapeseed and its products. *Food Microstruct.* **1**, 135-143.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M. (2002) Antioxidant properties of hard winter wheat extract. *Food Chem.* **78**, 457-461.

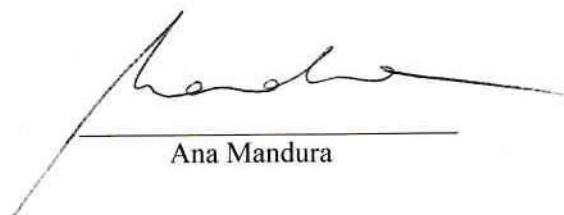
Zadernowski, R., Kozłowska, H. (1983) Phenolic acids in soybean and rapeseed flours. *Lebensm. Wiss. Technol.* **16**, 110-114.

Zhou, K., Su, L., You, L. (2004) Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6108-6114.

Zum Felde, T., Baumert, A., Strack, D., Becker, H. C., Möllers, C. (2007) Genetic variation for sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibration equations. *Plant Breeding.* **126**, 291-296.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Ana Mandura