

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2018.

Karla Mamilović

773/PI

**UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA
UDIO STEROLA I
PREHRAMBENIH VLAKANA
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 UDIO STEROLA I PREHRAMBENIH VLAKANA POGAČE ULJANE REPICE

Karla Mamilović; 773/PI

Sažetak: Pogača uljane repice sadrži visoko vrijedne proteine i povoljan sastav masnih kiselina, no unatoč tome, jedino se koristi kao dodatak stočnoj hrani i to zbog prisutnih antinutritivnih sastojaka. Danas se razvijaju tehnologije kojima je cilj povećanje biorasploživosti nutritivnih sastojaka pogače te smanjenje ili uklanjanje antinutritivnih sastojaka. Jedan od takvih procesa je i kriomljevenje. Cilj ovog rada je bio odrediti utjecaj kriogenog mljevenja na sastav i koncentraciju sterola i prehrambenih vlakana pomoću kromatografskih metoda. Rezultati su pokazali da način mljevenja (kriogeno u odnosu na klasično) ima značajan utjecaj na koncentraciju kampestanola, stigmasterola, β -sitosterola i Δ -5,24-stigmastadienola, dok ostali steroli nisu pokazali promjenu u odnosu na kontrolni uzorak pogače. Također, ukupni udio sterola se znatno povećao kod uzorka tretiranim 12 minuta uz upotrebu kriohlađenja. Mljevenjem uz hlađenje udio topljivih vlakana velikih i malih molekulskih masa se znatno povećao. Nasuprot tome, udio netopljivih vlakana nije ovisio o načinu i duljini mjevenja.

Ključne riječi: kriomljevenje, pogača uljane repice, steroli, prehrambena vlakna

Rad sadrži: 58 stranica, 6 slika, 11 tablica, 115 literaturnih 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. Duška Čurić
2. doc.dr.sc. Klara Kraljić
3. doc.dr.sc. Marko Obranović
4. izv.prof.dr.sc. Dubravka Novotni (zamjena)

Datum obrane: 30. studeni, 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 STEROLS AND DIETARY FIBERS OF RAPESEED CAKE

Karla Mamilović;773/PI

Abstract: The rapeseed cake contains highly valuable proteins and a favorable composition of fatty acids, but it is only used as a compound of animal feed due to the presence of antinutritive constituents. Technologies are now being developed to increase the bioavailability of nutrient constituents and to reduce or eliminate antinutritive constituents. One of these processes is cryomilling. The aim of this paper was to determine the effect of cryomilling on the composition and concentration of sterols and dietary fiber by chromatographic methods. The results showed that the method of milling (cryogenic compared to the classical) had a significant effect on the concentration of campestanol, stigmasterol, β -sitosterol and Δ -5,24-stigmastadiene while the other sterols did not show any change compared to the control sample of the cake. Also, the total sterol content has significantly increased in the sample treated for 12 minutes using cryocooling. By milling with cooling, the proportion of soluble fibers of high molecular weight and soluble fibers of small molecular weight increased considerably. However, the proportion of insoluble fibers had no significant impact on the method of grinding.

Keywords: cryomilling, rapeseed cake, sterols, dietary fiber

Thesis contains: 58 pages, 6 images, 11 tables, 115 literary citations

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. Duška Ćurić, Associate professor
2. PhD Klara Kraljić, Assistant professor
3. PhD. Marko Obranović, Assistant professor
3. PhD. Dubravka Novotni, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 30th of November, 2018.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Sjeme uljane repice	2
2.2. Upotreba uljane repice	3
2.3. Proizvodnja i sastav ulja.....	3
2.4. Pogača i sačma uljane repice.....	5
2.4.1. Kemijski sastav i upotreba pogače i sačme	5
2.4.2. Nutritivne komponente pogače uljane repice	6
2.4.2.1. Proteini i mineralne tvari	6
2.4.2.2. Ugljikohidrati.....	8
2.4.2.3. Prehrambena vlakna.....	8
2.4.2.4. Steroli.....	10
2.4.2.5. Polifenolni spojevi	13
2.4.3. Antinutritivne komponente pogače uljane repice	14
2.4.3.1. Tanini	14
2.4.3.2. Fitinska kiselina	15
2.4.3.3. Glukozinolati.....	15
2.5. Kriogeno mljevenje	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijal	18
3.1.1. Sjeme uljane repice.....	18
3.2. Metode rada.....	19
3.1.2. Mljevenje pogače na kugličnom mlinu.....	19
3.1.3. Određivanje veličine čestica.....	20
3.1.4. Ekstrakcija nepolarnih komponenti iz pogače uljane repice	21
3.1.5. Kiselinska hidroliza pogače.....	21
3.1.6. Određivanje koncentracije i sastava sterola.....	22
3.1.7. Određivanje udjela netopljivih i topljivih vlakana	25
3.1.7.1. Ekstrakcija masti po Soxhletu.....	25
3.1.7.2. Određivanje udjela vode	26
3.1.7.3. Određivanje udjela i sastava prehrambenih vakana	27
3.1.7.4. Određivanje udjela proteina u ostatku– Metoda po Kjeldahlu:	31
3.1.7.5. Određivanje udjela pepela u ostatku	33
3.1.7.6. Izračunavanje mase netopljivih vlakana, topljivih vlakana velike molekulske mase i topljivih vlakana male molekulske mase.....	33
3.1.8. Statistička obrada.....	35
4. REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1. Veličina čestica	36
4.2. Udio i sastav sterola	40
4.3. Udio netopljivih i topljivih vlakana	44
5. ZAKLJUČAK	48
6. LITERATURA.....	49

1. UVOD

Uljana repica (*Brassica napus* subsp. *Oleifera*) je jedna od najvažnijih uljarica današnjice.

U posljednjih nekoliko desetaka godina utvrđena je značajna nutritivna vrijednost ulja uljane repice kao i njenih nusprodukata u proizvodnji ulja. Razlog tome je selektivna zamjena tradicionalnih sorti uljane repice kanola sortama (**Canadian Oil Low Acid**) ili tzv. „00“ sortama koje sadrže smanjen udjel glukozinolata ($< 30 \mu\text{mol g}^{-1}$) i eruka masne kiseline ($< 2\%$). Kako bi se riješio problem zbrinjavanja i iskorištavanja pogače i sačme kao nusproizvoda u proizvodnji repičinoga ulja, pozornost se usmjeruje na ispitivanja njihove nutritivne i antinutritivne važnosti, te postoji li mogućnost njihovog iskorištavanja kao izvora bioaktivnih komponenti (Shahidi, 1990). Sačma i pogača se smatraju kvalitetnim izvorom proteina (sadrže oko 30 % proteina) s povoljnim omjerom aminokiselina. Pogača može služiti kao kvalitetan izvor proteina te iako je u kanola srotama postignut smanjen udio eruka masne kiseline i goitrogenih glukozinolata, koji je zakonski prihvatljiv, pogača nije uvrštena u ljudsku prehranu već isključivo kao dodatak u krmnu smjesu ili stočnu hranu. Zbog visokog udjela tanina, fitata i udjela sirovih vlakana dolazi do narušavanja senzorskih osobina (Kozłowska i sur., 1990; Ohlson i Anjou 1979).

Prehrambena vlakna su jestivi dijelovi biljaka koji nisu probavljivi niti se apsorbiraju u tankom crijevu čovjeka, dok se u debelom crijevu djelovanjem bakterija djelomično ili potpuno fermentiraju te time mogu pozitivno utjecati na zdravlje (DeVries, 2003).

Fitosteroli, skvalen i tokoferoli, negliceridni sastojci repičinog ulja, su često predmetom mnogih istraživanja. Biljni steroli, značajni su zbog svojeg djelovanja na smanjenje serumskog kolesterola kod ljudi i kao snažno oružje u borbi protiv mnogih drugih bolesti. Također, najčešće se porijeklo nekog ulja dokazuje preko sastava sterola (Mondragón i sur., 2013). Mljevenje uz primjenu kriogenog hlađenja je postupak mljevenja čiji je utjecaj na sama zrna uljarica dosada slabo istražen i pripada novijim tehnologijama u prehrambenoj industriji. Primjena kriogenog hlađenja dovodi do lakše fragmentacije čestica. Na pogači uljane repice prethodno je provedeno istraživanje s ciljem da se vidi kako bi ovakav način mljevenja utjecao na oslobađanje bioaktivnih spojeva (Mandura, 2018). Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj tretmana mljevenja bez primjene i uz primjenu kriogenog hlađenja na raspodjelu veličine čestice, koncentraciju ukupnih sterola i udio prehrambenih vlakana pogače uljane repice, sirovine koja bi zbog svojeg kvalitetnog nutritivnog sastava mogla obogatiti prehranu ljudi i doprinijeti blagotvornom učinku na zdravlje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sjeme uljane repice

Uljana repica (*Brassica napus* subsp. *Oleifera*) ima vretenasti, osrednje razvijen korjen s uspravnim, zeljastom i razgranatom stabljikom plavkasto-zelene boje. Plod repice je mahuna u kojoj broj sjemenki varira između 10 do 40, što ovisi o vrsti te klimatskim uvjetima. Sjeme repice okruglog je oblika, crne do crvenkaste ili žute boje, a promjer mu iznosi od 1,5 – 2,5 mm. Udio jezgre u sjemenu je 82 %, a ljuske oko 18 %.

Brassica napus subsp. *Oleifera* je predstavnik reda *Capparales*, porodice *Brassicaceae*, roda *Brassica*. Nastala je spontanom hibridizacijom između ogrstice (*Brassica rapa* L., sin. *Campestris*) i kupusa (*Brassica oleracea* L.) (Darlington i La Cour, 1945).

Udio ljuske u sjemenu iznosi 16,5 – 18,7 % što je ekvivalentno 27 – 30 % udjela u pogači nakon izdvajanja ulja. Sjeme uljane repice sadrži 40 % ulja, a udio vode se procjenjuje na oko 8 % (Shahidi, 1990). U sačmi nakon odvajanja ulja zaostaje 38 – 43 % proteina koje imaju povoljan aminokiselinski sastav (Ohlson i Anjou, 1979). Koncentracija esencijalnih aminokiselina poput lizina, metionina, cisteina, treonina i triptofana povoljno utječe na nutritivnu vrijednost ove sirovine.

Zbog potrebe za smanjenjem udjela eruka masne kiseline u ulju i alifatskih glukozinolata u odmašćenoj sačmi, dolazi do oplemenjivanja uljane repice s ciljem povećanja njezine nutritivne vrijednosti (Tablica 1).

Tablica 1. Prikaz oplemenjivanja sorti uljane repice (Abrehdari i sur., 2015; Shahidi, 1990)

	Tradicionalne sorte	Zero „0“ sorta 1968.g.	Double „00“ KANOLA 1974.g.	zero „000“ sorta 1976. g.
Eruka masna kiselina	26-60 %	do 5 %	do 2 %	
Glukozinolati	0,1-0,2 %	-	>30 $\mu\text{mol g}^{-1}$	
Vlakna		-	-	
			Dobivanje GRAS statusa	karakteristike <i>B. napus</i> i <i>B. campestris</i>

↓ prikazuje smanjenje udjela pojedine komponente u navedenim sortama

2.2. Upotreba uljane repice

Uljana repica vrlo je raširena uljarica i, zahvaljujući svojoj prilagodljivosti i mogućnosti uzgoja u gotovo svim klimatskim uvjetima, treća je u svijetu po udjelu u proizvodnji, odmah nakon soje i palme. Osim primjene u raznim industrijama, od prehrambene pa do tekstilne, u Europi raste interes za sadnju uljane repice te proizvodnje ulja u svrhu proizvodnje „ekološkog goriva“, tzv. biodizela, motornog goriva koje se dobiva iz raznih ulja pa tako i repičinog ulja esterifikacijom s metanolom, a kao rezultat se dobiva gorivo koje je moguće usporediti s dizelom iz mineralnih ulja (Wolinetz i sur., 2017).

Uljana repica uzgaja se u raznim dijelovima svijeta, no lideri svjetske proizvodnje su Kina, Indija, Kanada i Europska unija unutar koje je na vrhu Njemačka. 2017. godine je došlo do preokreta trenda pada svjetske proizvodnje uljane repice koji je trajao nekoliko godina, pa je procenjen rekordni uzgoj od 75,6 milijuna tona sjemena zahvaljujući povoljnim vremenskim uvjetima i rekordno visokim prinosima. Proizvođači u EU i Kanadi, objavili su kako su postigli rekordni broj 2017. godine, dok su Kina i Indija, nasuprot tome zabilježile pad proizvodnje no i dalje su lideri u svjetskoj proizvodnji (FAOSTAT, 2017).

Većina proizvodnje u Hrvatskoj smještena je u istočnoj Slavoniji, a podatak Državnog zavoda za statistiku Republike Hrvatske iz 2018. godine ukazuje kako je površina zasijana uljanom repicom u 2018. veća za 4 tisuće hektara, odnosno 8,2 % u usporedbi s godinom prije. To je najveća sjetva uljane repice od 1990.

Danas genetičkim inženjerstvom moguće je napraviti i stvoriti puno toga pa se tako i radi na tome da se razvijaju novi kultivari kojima će biti promijenjen sadržaj masnih kiselina tako što će se smanjiti sadržaj linolenske kiseline, a povećati udio oleinske, palmitinske ili stearinske kiseline (Przybylski i sur., 2005). Također, još jedan cilj je povećati udio ulja u sjemenu kao i poboljšati kvalitetu pogače/sačme i postići veće prinose (Abbadi i Leckband, 2011). Uzgoj GMO sorti uljarica u EU je zabranjen (Direktiva (EU) 2015/412).

2.3. Proizvodnja i sastav ulja

Uspješna proizvodnja ulja i dobivanje proizvoda visoke kvalitete direktno ovisi o kvaliteti upotrijebljene sirovine. Dolaskom u pogon prerada započinje čišćenjem sjemena, kako bi se odvojile nepoželjne primjese koje su potencijalna opasnost u daljnjoj preradi i kao opasnost od ubrzanog kvarenja ulja. Slijedi usitnjavanje na mlinovima s valjcima, a nakon toga

kondicioniranje, odnosno zagrijavanje sjemena uz podešavanje udjela vode prethodno usitnjenog materijala i prešanje (Reynolds i Youngs, 1964).

Cilj predgrijavanja ili kondicioniranja samljevenog materijala uz maleni dodatak vode je bubrenje i koagulacija bjelančevina, pucanje stanične stijenke, razgradnja gel strukture eleoplazme stanica i smanjenje viskoznosti. Ukoliko se proizvodnja odvija s kondicioniranjem, bitno je optimirati temperaturu i vlagu sjemena. Primjenom temperature od minimalno 80 °C prevenira se hidroliza glukozinolata i stvaranje toksičnih derivata u pogači (Newkirk, 2009). Osim toga, kondicioniranjem se osigurava maksimalno očuvanje sastava bioaktivnih komponenti dobivajući ulje koje je i do 7 puta bogatije fenolnim spojevima i povećanim udjelom kanolola u odnosu na hladno prešano ulje iz istog sjemena koje nije prošlo kroz fazu kondicioniranja (Kraljić i sur., 2013).

U fazi predprešanja, odvaja se 60-70 % ukupne količine ulja i dobiva se pogača koja ide dalje na ekstrakciju heksanom u cilju izdvajanja ulja koje je zaostalo u njoj. Ovakvim postupkom se osigurava visoko iskorištenje procesa proizvodnje ulja od 95 % (Mag, 1990). No kako se u takvom procesu koriste organska otapala, sirovo ulje proizvedeno na takav način potrebno je rafinirati. No ukoliko se izostavi proces ekstrakcije ulja organskim otapalima, i ulje se proizvodi isključivo mehaničkim postupcima, takvo ulje može se na tržište stavljati kao hladno prešano ili kao nerafinirano ulje (Mustapić i sur., 1984).

Rafinacija je postupak koji slijedi kako bi se proizvelo jestivo rafinirano repičino ulje. Sastoji se od dvije faze, predrafinacije, tj. degumiranja i rafinacije. Neutralizacija koje se najčešće odvija natrijevom lužinom osigurava ulje s niskim udjelom slobodnih masnih kiselina, a postupkom bijeljenja osim pigmenata, uklanjaju se sapuni, teški metali, fosfolipidi i druge neželjene komponente. Za kraj rafinacije ulje prolazi kroz deodorizator zbog uklanjanja hlapljivih sastojaka neugodnog mirisa i okusa. Taj se proces provodi pri sniženom tlaku (650-1300 Pa) kako bi se spriječila oksidacija ulja i njegova hidroliza vodenom parom (Mag, 1990; Rade i sur., 2001).

Repičino ulje se sastoji primarno od triacilglicerola, estera glicerola i tri molekule masnih kiselina. Ima nizak udio zasićenih masnih kiselina (< 7 %) što je povoljno jer se smatra kako pretjerana konzumacija zasićenih masti dovodi do razvoja određenih bolesti (Katalenić, 2007). Također, sadrži visok udio esencijalnih masnih kiselina, osobito α -linolenske masne kiseline te optimalan 2 : 1 omjer linolne i α -linolenske masne kiseline. Najzastupljenija masna kiselina u repičinom ulju je oleinska masna kiselina koja čini 51-75 % ukupnih masnih kiselina čije su vrijednosti propisane u Pravilniku o jestivim uljima i mastima (Pravilnik, 2012).

Od polarnih lipida većinu čine fosfolipidi, diesteri fosfatne kiseline. Pigmenti koji dominiraju su karotenoidi (u obliku ksantofila i karotena) i klorofili (klorofil *a*, feofitin *a* i *b*, pirofeofitin *a*).

Repičino ulje zbog bogatstva fitosterolima i tokoferolima predstavlja dobar izvor spojeva koji pozitivno djeluju u borbi protiv Alzheimerove bolesti i kardiovaskularnih bolesti jer zaštićuju nezasićene masne kiseline LDL-a od oksidacije (Saldeen i Saldeen, 2005). Osim toga, u usporebi sa sjemenom drugih uljarica, uljana repica sadrži veće količine fenolnih spojeva (Naczki i sur., 1998). Stoga tokoferoli, fenolni spojevi i karotenoidi čine repičino ulje stabilnim prema oksidacijskim promjenama (Matthäus, 2013).

2.4. Pogača i sačma uljane repice

2.4.1. Kemijski sastav i upotreba pogače i sačme

Prilikom proizvodnje ulja iz uljarica, dobivaju se čvrsti nusproizvodi, pogača i sačma. Pogača se dobiva prešanjem sjemena kao nusprodukt, dok ekstrakcijom ulja iz sjemena ili pogače dobivamo ulje i sačmu.

Pogača nakon prešanja sadrži još uvijek 15-22 % ulja i kako bi se povećalo iskorištenje procesa proizvodnje ulja, ona se ponovno melje, kondicionira i podvrgava procesu ekstrakcije. Nakon ekstrakcije dobivena sačma odlazi na tostiranje. Takva termička obrada se provodi u cilju potpunog uklanjanja otapala s parom pri 130 °C. Slijedi sušenje i hlađenje, granulacija i sačma je spremna za skladištenje. Sačma uljane repice sadrži 34,7 % bjelancevina, 2,2 % masti, 12,9 % vlakana i 32,5 % nedušične ekstraktivne tvari (NET) pri 11 % vlage (Grbeša, 2004). Pogača sadrži oko 30-34 % proteina, 6-11 % masti, 27-30 NET, 10-13 % celuloze a udio vlage joj je 10-13 % (Rac, 1964).

Pogača i sačma uljane repice se smatraju kvalitetnim izvorom proteina u koncentriranoj hrani za domaće životinje. Ono što je ograničavajući faktor korištenja iste je sadržaj glukozinolata koji tijekom probave hidroliziraju na izotiocijanate i druge spojeve sa sumporom. Takvi spojevi imaju štetan utjecaj na funkciju tiroidne žlijezde, jetre te utjecaj na hormone rasta. Iz tog razloga, za sigurnu konzumaciju u ishrani domaćih životinja provodi se redukcija glukozinolata koja je kod tradicionalnih sorti iznosila i do 450 mmol g⁻¹, a oplemenjivanjem se taj udio smanjio na 15-20 mmol g⁻¹ (Marjanović-Jeromela i sur., 2010).

Pogača sadrži velike količine fenolnih spojeva koji pridonose tamnoj boji njenom trpkom i gorkom okusu. Kao takvi oni se mogu ekstrahirati iz pogače korištenjem otapala poput

metanola ili etanola te se koristiti kao prirodni antioksidanasi. Naczk i suradnici, su u svom istraživanju 1998. godine zaključili da su najzastupljeniji fenolni spojevi, fenolne kiseline i kondenzirani tanini. Thiyam i suradnici (2004) su proveli istraživanje u kojemu se pokazalo da je najzastupljeniji fenolni spoj pogače uljane repice sinapinska kiselina i da je dodatak izoliranih fenolnih spojeva usporio lipidnu oksidaciju u repičinom ulju.

Saćma sadrži i mineralne tvari 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).

Sa druge strane, nepoželjni spojevi koji utječu na neprobavljivost, nižu energetska vrijednost, ali i na senzorske karakteristike su glukozinolati, sirova vlakna, fitati i tanini. Iz tog razloga ova sirovina nije prikladna za ljudsku upotrebu (Xu i Diosady, 1997).

Ono što se može učiniti je oplemeniti sačmu tako da joj se smanji udio sirovih vlakana i glukozinolata, uz porast udjela proteina, vitamina i mineralnih tvari (Newkirk, 2009).

2.4.2. Nutritivne komponente pogače uljane repice

2.4.2.1. *Proteini i mineralne tvari*

Udio različitih komponenti u pogači i sačmi uvelike ovisi o kultivaru sjemena, agrotehničkim mjerama tijekom proizvodnje, antinutritivnim čimbenicima i slično. Udio kalcija, fosfora, selena, željeza i mangana u pogači je visok. Također sadrži visoki udio fosfora, no kako je do 65 % fosfora je vezano u soli fitinske kiseline, fitate, njegova bioraspodijelivost je vrlo niska (Feng, 2003). Pogača uljane repice se sastoji od približno 30 % proteina, a glavni proteini u repici su skladišni (rezervni) proteini koji zauzimaju 80 – 90 % ukupnog proteinskog dijela. Skladišni proteini su 12S kruciferin i 2S napin (Mohamad i sur., 2002; Campbell i sur., 2016). Probavljivost proteina pogače uljane repice u usporedbi sa sojinim brašnom je niža, ali općenito, pogača repice je bogatija svim vrstama aminokiselina (Tablica 2).

Tablica 2. Prikaz aminokiselinskog sastava pogače i sačme uljane repice (Feng, 2003)

	<i>Pogača uljane repice (%)</i>	<i>Sačma uljane repice (%)</i>
<i>Sirovi proteini</i>	35,70	38,60
<i>Arginin</i>	1,82	1,83
<i>Histidin*</i>	0,83	0,86
<i>Izoleucin*</i>	1,24	1,29
<i>Leucin*</i>	2,26	2,34
<i>Lizin*</i>	1,33	1,30
<i>Metionin*</i>	0,60	0,63
<i>Cistein</i>	0,82	0,87
<i>Fenilalanin*</i>	1,35	1,45
<i>Tirozin</i>	0,92	0,97
<i>Treonin*</i>	1,40	1,49
<i>Triptofan*</i>	0,42	0,43
<i>Valin*</i>	1,62	1,74

*esencijalne aminokiseline

Prema istraživanjima Raab i Schwenke iz 1984. godine većina proteina repice klasificirani su u albumine topljive u vodi i globuline topljive u otopinama soli. Aider i Barbana (2011) dolaze do saznanja kako ostale proteinske frakcije čine prolamini i glutelini.

Napin, kruciferin i manji udio oleosina čine skladišne proteine. Ekspresija kruciferina i napina u *Brassicaceae* vrstama regulirana je s više gena. Studija o europskim sortama podupire da su kruciferin i napin prisutni u omjeru od 0,6 do 2,0 uz znatnu varijaciju između genotipa (Malabat, 2003).

Kruciferin je 12S globulin i pripada superfamiliji kupina (Aider i Barbana, 2011). To je dominantni protein, čini 60 % ukupnog sadržaja proteina. Kruciferin ima molekulsku masu od 300- 360 kDa i izoelektričnu točku pri pH 7,25 (Wanasundara i sur., 2011). To je neutralan protein, koji može djelovati kao sredstvo za geliranje (Aider i Babana, 2011). Unatoč ograničenim informacijama o njihovoj bioaktivnosti, navodi se da aminokiseline kruciferina igraju važnu ulogu u gastrointestinalnom traktu (Haar i sur., 2004).

Napin pripada prolaminskoj superfamiliji (Wanasundara i sur., 2011). To je 2S albumin (ili 1.7S), koji čini 25 % ukupnog sadržaja proteina u uljanoj repici i drugi je najzastupljeniji protein.

Danas, uz rastuću potražnju za bjelančevinama, pogača je, kao nusprodukt proizvodnje ulja, dobro pozicionirana da bude održivi izvor biljnih proteina zbog velikog volumena proizvodnje, kao i nutritivnih i funkcionalnih svojstava proteina, uključujući i esencijalne aminokiseline, aminokiseline koje sadrže sumpor, metionin i cistein (Tablica 2). Sastav proteina pogače uljane

repice je sličniji referentnom uzorku (definira FAO/WHO) i kvalitetniji uzevši u obzir proteine iz drugih biljnih izvora (Wanasundara i sur., 2011).

Trenutačno se pogača uljane repice prvenstveno usmjerava na tržište hrane za životinje, gdje je zbog visoke vrijednosti proteina konkurentan izvor hrane za životinje. Premještanje izvan okvira ishrane domaćih životinja i upotrebe u akvakulturi, te je uz biotehnološko oplemenjivanje izvedivo uključivanje ove namirnice i u ljudsku prehranu, ali zahtijeva istraživanje i prihvaćanje ideje od strane potrošača. Može predstavljati ekonomičan i održiv izvor proteina s visokom biodostupnosti i probavljivosti. Unatoč desetljećima istraživanja, razvija se nekoliko novih tehnologija koje bi to omogućile, ali još uvijek nema komercijalno dostupnih proizvoda s izvorom bjelančevina iz pogače uljane repice (Campbell i sur., 2016).

2.4.2.2. Ugljikohidrati

Sastav ugljikohidrata repice može se podijeliti u 3 skupine: topljivi šećeri, netopljivi ugljikohidrati i vlakna (Daun i sur., 2011). Topljivi ugljikohidrati čine 7-12 % udjela suhe tvari u pogači, odnosno sačmi (Feedipedia, 2012). Saharoza je dominantan šećer, dok celuloza, hemiceluloza i pektin čine netopljivu ugljikohidratnu frakciju. Vlakna su pronađena unutar sjemenskog sloja, endosperma i staničnih stijenki kotiledonskih stanica (Wanasundra, 2011). Udio škroba je 2,5 % a od topljivih šećera posjeduje i rafinozu, stahiozu, glukozu i fruktozu (Barthet i Daun, 2011; Bell, 1993).

2.4.2.3. Prehrambena vlakna

Zbog svog dokazanog blagotvornog djelovanja na zdravlje čovjeka, prehrambena vlakna su važna bioaktivna komponenta u prehrani. To su jestivi dijelovi biljaka ili analogni ugljikohidrati koji nisu probavljivi i također se ne apsorbiraju u tankom crijevu čovjeka, dok se u debelom crijevu djelovanjem bakterija djelomično ili potpuno fermentiraju te time pozitivno utječu na zdravlje (DeVries, 2003).

Podjela vlakana može biti raznolika (Slika 1), ali najčešća je ona koja se dijele prema topljivosti i/ili fermentabilnosti. Sastojci stanične stijenke kao što su celuloza, lignin i hemiceluloza pripadaju netopljivim prehrambenim vlaknima. To su ona koja putuju probavnim sustavom bez razgradnje uz mali dio koji se ipak razgrađuje pomoću bakterija u debelom crijevu, također

imaju mogućnost vezanja vode što pokazuje činjenica da bubrenjem povećavaju svoju težinu i do 15 puta. Time imaju blagotvorni učinak na crijeva.

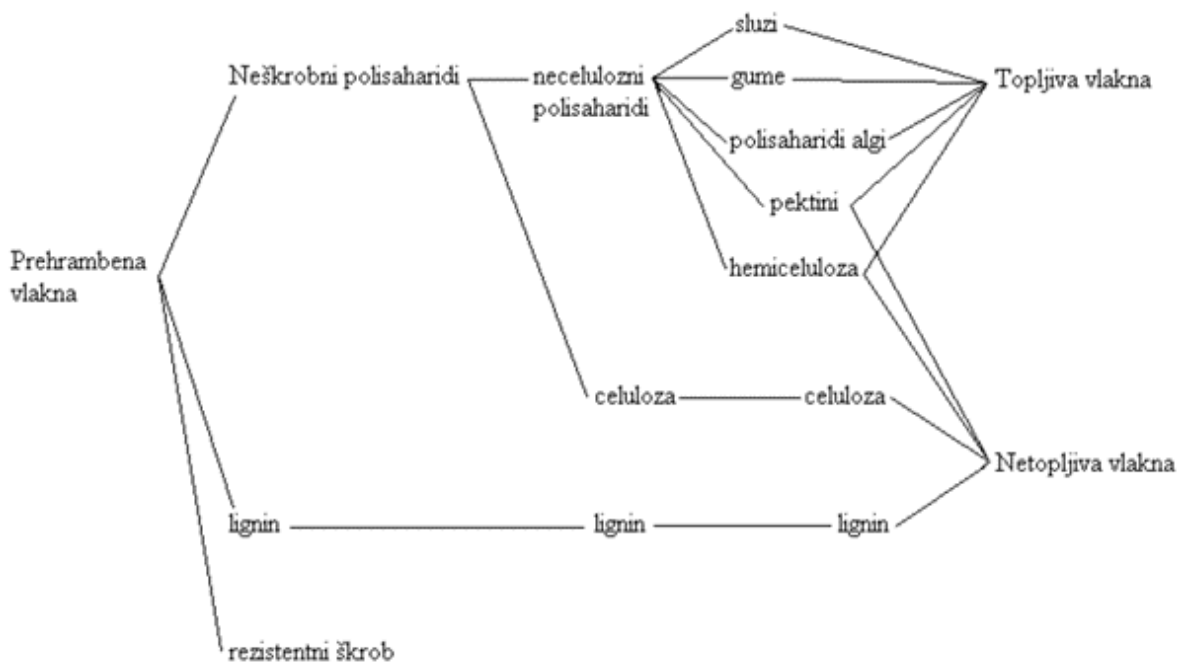
Bitna razlika netopljivih i topljivih vlakana se krije u različitoj viskoznosti (Mandić i Nosić, 2009).

U skupinu topljivih vlakana spadaju necelulozni polisaharidi (pektin, gume, sluzi). Ona se otapaju prilikom probave te pri tome stvaraju viskoznu masu koja nalikuje gelu, podliježu fermentaciji u debelom crijevu nakon čega nastaju kratkolančane masne kiseline koje imaju energetska funkcija. Utječu na snižavanje kolesterola, triacilglicerola i glukoze u krvi (Dhingra i sur., 2012).

Podjela prehranbenih vlakana prema topljivosti/fermentabilnost uz navođenje prehranbenih izvora pojedine skupine vlakana nalazi se u Tablici 3.

Tablica 3. Podjela prehranbenih vlakana prema karakteristikama (Dhingra i sur., 2012; Yangilar, 2013)

<i>Karakteristike</i>	<i>Komponente vlakana</i>	<i>Glavni prehranbeni izvori</i>
<i>netopljiva prehranbena vlakna/manje fermentabilna</i>	celuloza	korjenasto povrće, grašak, šećerna repa, mekinje, cjelovite žitarice, jabuke
	hemiceluloza	cjelovite žitarice, mekinje
	lignin	drvenaste biljke, povrće, brašno
<i>topljiva prehranbena vlakna/lako fermentabilna</i>	pektin	voće, povrće, leguminoze, šećerna repa, krumpir, cjelovite žitarice
	gume	sjemenke mahunarki (guar, rogač) ekstrakti morskih algi (karagenan, alginati) mikrobne gume (ksantan, gelan) zobena kaša, mahunarke
	sluzi	biljni ekstrakti (akacija guma, karaja guma, tragakant guma)



Slika 1. Klasifikacija prehrambenih vlakana (Mandić i Nosić, 2009.)

Hrana koja obiluje prehrambenim vlaknima nema visoku energetska vrijednost, često ima manji udjel masti te je voluminozna i često bogatija mikronutrijentima (Dhingra i sur., 2012). Uključivanjem vlakana u svakodnevnu prehranu, pokazalo se izuzetno pozitivno zbog svojeg fiziološkog učinka povezanog s boljom funkcijom probavnog trakta, pozitivnim utjecajem na dijabetes i bolestima srca (Mudgil i Barak, 2013).

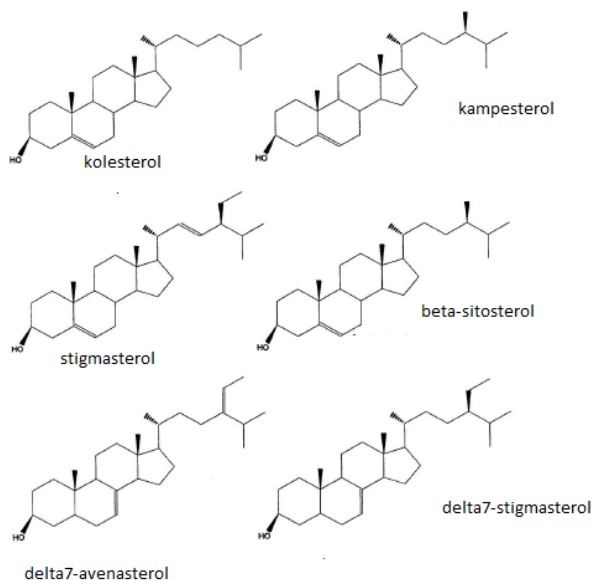
Kod uljane repice dolazi do koncentriranja vlakna tijekom procesiranja sjemena upravo u pogači i sačmi jer se sjeme uljane repice ne ljušti prije proizvodnje ulja (Matthäus, 1998). Celuloza, hemiceluloza, lignin i kutin čine gradivne elemente stanične stijenke uljane repice. Za razliku od soje koja sadrži do 6% sirovih vlakana, uljana repica sadrži skoro dvostruko, oko 12%; čime njihova neprobavljivost predstavlja problem kod preživača (Matthäus, 1998).

2.4.2.4. Steroli

Steroli ili steroidni alkoholi su negliceridni sastojci ulja i masti koji pripadaju skupini steroida. Uz njih skupinu čine žučne kiseline, spolni hormoni, hormoni nadbubrežne žlijezde i srčani aglikoni. To su bitne komponente membrane biljaka, a njihova opća struktura je tetraciklički prstenasti sustav (Pine, 1994). Prema kemijskom sastavu to su visokomolekularni ciklički alkoholi, derivati ciklopentanofenantrena i sastoje se od fenantrenske skupine, a nastaju u procesu biosinteze iz skvalena (Belitz i sur., 2004). Prema porijeklu, dijelimo ih na zoosterole

i na fitosterole. Najpoznatiji predstavnik zoosterola je kolesterol koji se rijetko pojavljuje u biljkama, ali je blisko srodan stigmasterolu koji je važan sastojak biljaka (Pine, 1994). Ovi spojevi čine veći dio neosapunjivih sastojaka koji se tijekom prerade ulja (rafinacije) velikim dijelom gube.

Najzastupljeniji fitosteroli u uljima su β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol (Przybylski i sur., 2005).



Slika 2. Prikaz kolesterola kapesterola, stigmasterola, beta-sitosterola, delta7-avenasterola i delta7-stigmasterola (Bajoub i sur., 2014)

Repičino ulje sadži između 459 do 807 mg fitosterola na 100 g ulja (Vlahakis i Hazebroek, 2000), dvostruko više od sojinog ulja i ulja kikirikija (Tablica 4). Osim toga, sastav sterola je specifičan za pojedinu vrstu ulja, tako je za repičino ulje karakterističan brasikasterol (Tablica 4). Dokazivanje i ispitivanje sterola u uljima može se koristiti za utvrđivanje podrijetla i autentičnosti ulja. Tako da se može reći kako su steroli osnovna identifikacijska oznaka svakog ulja (Swern, 1972).

Tablica 4. Udjel sterola u biljnim uljima (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980)

BILJNA ULJA	ukupno	% od ukupnih			
	(%)	brasikasterol	kampasterol	stigmasterol	sitosterol
<i>Kukuruznih klica</i>	0,58-1,00	/	20	8	12
<i>Masline</i>	0,23-0,31	/	3	/	97
<i>Pamuka</i>	0,26-0,31	/	8-9	/	91-92
<i>Uljane repice</i>	0,35-0,50	10	27	/	63
<i>Soje</i>	0,15-0,38	/	19	24	57
<i>Kikiriki</i>	0,19-0,25	/	3	/	97

Također, steroli mogu biti u slobodnoj ili esterificiranoj formi u različitim udjelima. Esteri nastaju spajanjem sterola na C-3 s masnom kiselinom ili ferulinskom kiselinom, najprisutniji su u ulju kukuruza, pamuka i repičinom ulju (Kamal-Eldin, 2005).

Biološko djelovanje sterola danas je od velike važnosti zbog velike raširenosti koronarnih i srčanih bolesti koji su povezani s povišenim razinama lipida u serumu, odnosno preveliki udio LDL (*low-density lipoprotein*) kolesterola i triglicerida, te smanjenim udjelom HDL (*high-density lipoprotein*) kolesterola.

Nacionalni edukacijski panel za kolesterol III (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) preporučuju povećani unos fitosterola i stanola, oko 2 g dan⁻¹ kako bi se smanjio serumski kolesterol (NHLBI, 2011; EFSA, 2012).

Heggen i suradnici (2010) su ispitali utjecaj konzumacije margarina od repičinog ulja sa i bez dodanih fitosterola u količini od 2 g dnevno da bi došli do zaključka kako se LDL kolesterol smanjio za 8,2-9% i apolipoprotein B za 5,3-6,9%, dok se kontrolnoj skupini LDL kolesterol smanjio za samo 4,5%. Time se ustanovilo kako uistinu fitosteroli mogu imati utjecaj na smanjenje serumskog kolesterola.

Tablica 5. Udio i sastav sterola ulja uljane repice (Pravilnik, 2012.)

<i>Ulje uljane repice (sa malim udjelom eruka masne kiseline)</i>	
<i>Kolesterol</i>	ND*-1,3
<i>Brasikasterol</i>	5,0-13,0
<i>Kampesterol</i>	24,7-38,6
<i>Stigmasterol</i>	0,2-1,0
<i>Beta-sitosterol</i>	45,1-57,9
<i>Delta-5-avenasterol</i>	2,5-6,6
<i>Delta-7-stigmastenol</i>	ND-1,3
<i>Delta-7-avenasterol</i>	ND-0,8
<i>Drugi steroli</i>	ND-4,2
<i>Ukupni steroli (mgkg⁻¹)</i>	4500-11300

ND*- nije određeno, definirano kao < 0,05 %

Informacije o vitaminskom sadržaju pogače uljane repice vrlo su ograničene, pretpostavlja se kako je bogata kolinom, biotinom, folnom kiselinom, niacinom, riboflavinom i tiaminom (Newkirk, 2009).

2.4.2.5. Polifenolni spojevi

Kao što je već ranije napomenuto, sjeme uljane repice sadrži više polifenolnih spojeva od sjemena svih uljarica (Naczki i sur., 1998). Koncentracija fenolnih spojeva povećava se sazrijevanjem sjemena, a maksimalnu vrijednost postiže na posljednjem stupnju sazrijevanja sjemena, pri prijelazu iz zelene u smeđu boju (Wronka i sur., 1994). Najzastupljeniji fenolni spojevi u uljaricama su fenolne kiseline, odnosno derivati hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina, kumarini, flavonoidi, i lignini.

Repica uglavnom sadrži derivate hidroksicimetnih kiselina i kondenzirane tanine (Kozłowska i sur., 1990; Naczki i sur., 1998). Također, sadrži slobodne fenolne kiseline, esterificirane te u obliku netopljivih derivata vezanih na ostale sastojke sjemena.

Od ukupnih slobodnih kiselina 70-85 % čini sinapinska kiselina dok su ostale fenolne kiseline prisutne u znatno manjim udjelima. To su *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, klorogenska, kavaska, *p*-kumarinska, siringinska te *cis*- i *trans*-ferulinska kiselina. Koncentracija fenolnih kiselina, ovisno o sorti, načinu proizvodnje, uvjetima uzgoja i stupnju zrelosti varira između 6400 – 18400 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Kozłowska i sur., 1990).

Sačma i pogača uljane repice imaju do 5 puta veći udio fenolnih kiselina naspram sojine sačme, to pridonosi tamnijoj boji, gorčini i neprobavljivosti proteina repice. Oksidirani fenolni produkti mogu formirati komplekse s esencijalnim aminokiselinama i proteinima, umanjujući im nutritivnu vrijednost (Clandinin, 1961; Malcolmson i sur., 1978).

Esterificirane fenolne kiseline čine najveći udio ukupnih fenolnih kiselina. Dominira sinapin; kolin ester sinapinske kiseline. Sinapin ima skladišnu ulogu sinapinske kiseline i kolina, hidrolizira se zbog sinteze lignina i flavonoida kojima je sinapinska kiselina prekursor. Kolin koji biva oslobođen sudjeluje u metaboličkom ciklusu metilacije (Kozłowska i sur., 1990). Sinapin daje gorki okus, nižu probavljivost i tamniju boju finalnih proizvoda. S ciljem redukcije sinapina u samom sjemenu, razvijen je genotip *B. napus* bez sinapina (Wolfram i sur., 2010).

2.4.3. Antinutritivne komponente pogače uljane repice

Antinutritivne komponente koje zaostaju u pogači nakon ekstrakcije ulja su fitati, fenolni spojevi i glukozinolati (Wanaundara, 2011). Fitati smanjuju bioraspoloživost nekih minerala u organizmu ljudi, kao što su cink i željezo (Lopez i sur., 2002)

2.4.3.1. Tanini

Ovisno o strukturi i reaktivnosti, dijele se na kondenzirane hidrolizirajuće skupine. To su kompleksni fenolni spojevi molekulske mase 500-3000 Da.

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).

Koncentracija tanina varira od 0,2-3 % i ovisi o ekstrakcijskoj metodi, stupnju zrelosti sjemena i sorti (Naczki i sur., 1998). Mogu stvarati komplekse s proteinskim frakcijama i vlaknima sjemena (Naczki i sur., 2000).

Proteini u kompleksu s taninima mogu biti topljivi i netopljivi što uvelike ovisi o konformaciji, veličini i naboju proteinske molekule. Vodikove veze se formiraju između tanina i proteina te čine interakciju između karbonilnog ugljika u peptidnim vezama proteina i fenolnih skupina tanina (Gustavson, 1954), a mogu biti uključene i hidrofobne interakcije, ionske i kovalentne veze.

Ovakvi kompleksi imaju negativan utjecaj na organoleptička svojstva, davajući trpkocu pogače ili sačme uljane repice (Haslam, 1981).

Kondenzirani tanini mogu vezati metionin i tako onemogućiti bioiskoristivost proteina (Armstrong i sur., 1974). Također stvaraju komplekse sa željezom zbog čega su tanini identificirani kao potencijalni inhibitori apsorpcije željeza (Naczki i Shahidi, 1997).

2.4.3.2. *Fitinska kiselina*

Fitinska kiselina je antinutrijent koji je prisutan u visokim koncentracijama u uljanoj repici. Zbog svoje negativne strukture vrlo je reaktivna s drugim pozitivno nabijenim skupinama kao što su minerali i proteini. Formiranje ovih kompleksa se pokazalo da smanjuje dostupnost minerala, posebno Zn. Fitinska kiselina ne utječe značajno na promjenu probavljivost i kvalitetu proteina repice, dokazano *in vitro* i *in vivo*, osobito kada postoji dovoljna količina cinka (Ali i Houde, 1986).

Međutim, omjer proteina i probavljivost škroba može biti usporena fitinskom kiselinom, a u tom pogledu može imati neke zdravstvene posljedice manifestirane kao usporena probavu i apsorpcija. Fitinska kiselina je vrlo stabilna tijekom obične obrade hrane, ali ako dosegne razinu koja može imati štetne učinke na zdravlje ljudi, postoji nekoliko metoda za njeno uklanjanje (Branković i sur, 2011).

2.4.3.3. *Glukozinolati*

Glukozinolati su skupina bioaktivnih spojeva, pripadaju skupini tioglukozida koji se prirodno javljaju u uljanoj repici (Tablica 6) i mnogim drugim biljkama i povrću u obitelji *Brassica*, kao što su rotkvica, brokula, sjemenke gorušice i neke vrste kupusa. Glukozinolati nisu sami po sebi toksični, no dođe li do njihove hidrolize javljaju se antinutritivne komponente i neželjeni efekt na životinje uslijed konzumacije.

Tablica 6. Sastav glukozinolata u uljanoj repici (Sang i sur., 1984)

GLUKOZINOLATI U ULJANOJ REPICI

<i>progoitrin</i>
<i>epiprogoitrin</i>
<i>glukonapoleiferin</i>
<i>glukonapin</i>
<i>4 – hidroksiglukobrasicin</i>
<i>glukobrasikanapin</i>
<i>glukobrasicin</i>
<i>glukorafanin</i>
<i>glukonasturtin</i>

Glukozinolati se mogu razgraditi enzimom mirozinaza-tioglukozid glikohidrolazom tako što dolazi do hidrolize glukozidne veze u spoju. Glukozinolati i mirozinaza pohranjeni su u odvojenim djelovima unutar stanice, međusobno nedostupni dok se sjeme ne ošteti, kao što je prešanje ulja ili žvakanje (EFSA, 2008). Nakon oštećenja stanica, mirozinaza i glukozinolat mogu doći u dodir jedni s drugima zbog lomljenja barijera.

Hidrolizom se dobiva slobodna glukoza i nestabilni intermedijer iz kojeg spontanom degradacijom dolazi do formiranja različitih razgradnih produkata poput tiocijanata, nitrila i izotiocijanata, oksazolidintionina (Das i sur., 2000; Vaughn i Berhow, 2005).

Učinak produkata razgradnje glukozinolata u literaturi se osporava i pokazalo se da imaju i korisne i štetne učinke na zdravlje. Sulforafan, koji je proizvod razgradnje glukozinolata glukoraphanina, aktivira enzime koji su snažno povezani s prevencijom različitih vrsta raka (Vaughn i Berhow, 2005). S druge strane, uočene su različite vrste štetnih učinaka na zdravlje nakon konzumacije glukozinolata u pokusima na životinjama. Uočene nuspojave su povećanje jetre i bubrega i smanjena proizvodnja jaja kod ptica. Kod ljudi, veće razine metabolita glukozinolata pokazale su štetno djelovanje na štitnjaču, što dovodi do smanjenog udjela joda (Wanasundara i sur., 2011).

Danas se u EU dopušta uzgajanje samo „00“ sorti repice zbog negativnih zdravstvenih učinaka glukozinolata. Što znači da sjeme sadrži maksimalno 2 % erukinske kiseline i 25 $\mu\text{mol g}^{-1}$ glukozinolata (na suhoj osnovi). Budući da su glukozinolati topljivi u vodi zaostaju u pogači, kako se ulje odvoji preostala koncentracija glukozinolata vjerojatno je veća od 25 $\mu\text{mol g}^{-1}$ u pogači uljane repice. Udio glukozinolata u repici razlikuje se od različitih vrsta sorti, a na njih utječe geografska regija, tlo i agrotehničke mjere (EFSA, 2008.).

2.5. Kriogeno mljevenje

Kriogeno (krio) mljevenje je tehnološki proces kojim se melje određena sirovina na temperaturama znatno nižim od 0 °C pri čemu se uzorak hladi kriogenicima, tj. kriogenim tekućinama, kao što su tekući helij, tekući neon, tekući argon, tekući kisik ili tekućim dušikom do oko -200 °C i čini ga lomljivijim i sklonijim fragmentaciji. Tekući dušik ima prednost pred ostalima jer je inertan. Pojam „kriogeno“ ima grčke korijene riječi i u prijevodu znači stvaranje ili proizvodnja putem hladnoće (Junghare i sur., 2017).

Prilikom kriogenog mljevenja moguće je postići veličinu čestica oko 50 µm, što je mljevenjem u okolišnim uvjetima moguće postići pri nekoliko ponovljenih mljevenja (Mondragón i sur., 2013).

Smanjenje veličine čestica raznim biljnih materijala, bogatih vlaknima, u istraživanjima je pokazala da utječe na strukturu, površinu i funkcionalna svojstva. Mikronizacijom se postiže razgradnja materijala bez upotrebe kemikalija te mogućnost istraživanja na sub-staničnoj razini. Negativne temperature (ispod - 46 °C) smanjuju rastezljivost slojeva posija i povećavaju njihovu krhkost što je dovelo do veće dostupnosti fenola, što je i dokazano na primjeru ferulinske i sinapinske kiseline (Hemery i sur., 2010). Mikronizacijom također dolazi do oslobađanja bioaktivnih komponenti iz stijenke stanice jer rezultira oštećenjem. Također, povećava aktivnu površinu te su spojevi s antioksidacijskim djelovanjem puno dostupniji za ekstrakciju ili ulazak u reakciju (Mondragón i sur., 2013). Istraživanja Liukkonena i suradnika (2003) su pokazala kako krio mljevenje ima pozitivan učinak na žitarice jer se pokazao veći učinak *in vivo* zbog većeg udjela oslobođenih bioaktivnih spojeva. Mikronizacija može dovesti i do povećanja udjela topljivih naprema netopljivim vlaknim te većim antioksidacijskim potencijalom (Mondragón i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Sjeme uljane repice

Kao sirovina u ovom radu korišteno je sjeme uljane repice uzgojeno 2016./2017. godine na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu proizvedeno je nerafinirano repičino ulje dvostrukim prešanjem na pužnoj preši (Komet, model CA/53, Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka). Prije izdvajanja ulja prešanjem, sjeme je kondicionirano kroz 30 minuta na $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomoću kondicionera. Prešanjem je proizvedeno nerafinirano repičino ulje i pogača koja je nakon drugog prešanja samljevena na mlinu s diskovima i do daljnjih analiza skladištena na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nekoliko mjeseci.

Ovo istraživanje je nastavak na istraživanja provedenog i prikazanog u diplomskom radu Mandura (2018) u kojem je na istim uzorcima pogače ispitivan utjecaj kriogenog mljevenja sa/bez hlađenja tekućim dušikom na koncentraciju antioksidanasa poput slobodnih i vezanih fenolnih spojeva i tanina te sastav masnih kiselina. Istraživanjem se želio ispitati učinak takvog tretmana na prethodno spomenute komponente pogače uljane repice, kako bi se utvrdio smjer njegovog djelovanja (pozitivan, negativan ili neutralan).

Osnovni parametri kvalitete sjemena i pogače uljane repice (udio vode, ulja i proteina) te udio mineralnih tvari prikazani su sljedećoj tablici:

Tablica 7. prikaz osnovnih parametara kvalitete sjemena i pogače uljane repice (Mandura, 2018)

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

* izraženo na suhu tvar

3.2. Metode rada

3.1.2. Mljevenje pogače na kugličnom mlinu

Za potrebe ovog istraživanja izvagano je 8 grama uzorka pogače koje je zatim mljeveno kugličnim mlinom, CryoMill, sa/bez hlađenja tekućim dušikom uz pomoć 12 kuglica promjera 10 mm. Za potrebe ovog istraživanja korištena su 4 različita vremena mljevenja pogače, 2, 4, 8 i 12 minute te 2 načina mljevenja, s i bez hlađenja. Uz kontrolni uzorak pogače uljane repice, koji nije bio dodatno usitnjen, to je činilo ukupno 9 uzoraka pogače (Tablica 8) koja je nakon usitnjavanja skladištena u zamrzivaču na -18 °C do daljnjih analiza. Frekvencija kugličnog mlina je bila 30 Hz, a tlak dušika na izlazu spremnika je održavan na 1,3 bara radi optimizacije procesa.

Uređaj kojim je provedeno kriogeno mljevenje je bio CryoMill (Retsch + Apollo, Haan, Njemačka) (Slika 3), koji je posebno dizajniran za mljevenje na vrlo niskim temperaturama. Spada u skupinu kugličnih mlinova koji se inače koriste za fino usitnjavanje veličine čestica tvrdih i krhkih materijala (Retsch, 2017a).

Tablica 8. Kriogeno mljevenje uzoraka

<i>OZNAKA</i>	<i>KRIOGENO MLJEVENJE (Da/Ne)</i>	<i>PRET- HLAĐENJE</i>	<i>TRAJANJE CIKLUSA MLJEVENJA (min)</i>
<i>P</i> <i>(kontrolni)</i>	Ne	/	0
<i>2BH</i>	Ne	/	2
<i>4BH</i>	Ne	/	4
<i>8BH</i>	Ne	/	8
<i>12BH</i>	Ne	/	12
<i>2H</i>	Da	Da	2
<i>4H</i>	Da	Da	4
<i>8H</i>	Da	Da	8
<i>12H</i>	Da	da	12



Slika 3. CryoMill (Retsch + Apollo, Haan, Njemačka; 2017)

Na uređaju (Slika 3.) se podešavaju parametri hlađenja, frekvencije oscilacija ili vrijeme mljevenja. Također, ono što se može podešavati su i razdoblja međufaznog hlađenja i broj ciklusa kriogenog mljevenja.

3.1.3. Određivanje veličine čestica

Mjerenje veličine čestica je provedena metodom laserske difrakcije. Za analizu je korišten laserski analizator veličine čestica Malvern 2000 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, Velika Britanija), s opremljenom jedinicom za suhu disperziju Scirocco 2000, koji su povezani s računalnom jedinicom, Mastersizer 2000 softwareom v. 5.60.

Za svaki od uzoraka u provodena tri paralelna mjerenja, tako što je prvo uzorak stavljen u kadnicu za suhu disperziju koja sadrži sito za razbijanje aglomerata i ujednačavanje dotoka uzorka u mjernu ćeliju. Zasićene laserske zrake su podešene na 2 – 6 % (Benković i sur., 2013). Rezultati mjerenja se prikazuju kao vrijednosti $d(0,5)$, $d(0,1)$, $d(0,9)$, $D[3,2]$ (Tablica 9) i veličina 'Raspon' (formula [1]).

Tablica 9. Prikaz raspodjele veličine čestica izraženih kao promjer čestica

d (0,5) [μm]	d (0,1) [μm]	d (0,9) [μm]	D[3,2] [μm]
50% ukupnog broja čestica ima promjer veći od tog promjera i 50% ukupnog ima promjer manji od tog promjera	Veličina čestica od koje je manje od 10% čestica cijelog uzorka	Veličina čestica od koje je manje 90% čestica cijelog uzorka	Površinski ekvivalentni promjer Sauterov promjer

Raspon predstavlja širinu raspodjele čestica.

$$Raspon = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad [1]$$

3.1.4. Ekstrakcija nepolarnih komponenti iz pogače uljane repice

Ekstrakcija nepolarnih komponenti provedena je prema modificiranoj metodi objavljenoj u radu Kraljić i suradnika (2013). U plastične kivete od 50 mL je odvagano 2 g uzorka i potom doda 20 mL heksana. Kivete se horizontalno postave na tresilicu (IKA MS 3 basic, IKA-Works, Staufen im Breisgau, Njemačka) i ekstrakcija se provodi na 1000 okr min⁻¹ 30 minuta. Radi odvajanja krute od tekuće faze uzorci se centrifugiraju 10 minuta na 5000 okr min⁻¹ (Rotina 35, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen). Dobiveni supernatant se profiltrira preko filter papira (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm) na Büchnerovom lijevku. Postupak ekstrakcije nepolarne frakcije ponavlja se još 2 puta s istim uzorkom pogače, nakon čega slijedi otparavanje otapala na vakuumskom otparivaču pri 40 °C (Heidolph, Schwabach, Njemačka). Dobivena masna frakcija korištena je za određivanje sterola, i do same analize skladištena na -20 °C.

3.1.5. Kiselinska hidroliza pogače

Postupak kiselinske hidrolize pogače se provodi s ciljem izdvajanja masti i nepolarnih spojeva iz svih kompleksnih struktura u sjemenu prema metodi istraživanja koju su proveli Novotni i suradnici (2011). U tikvice od 250 mL je odvagano 8 grama (± 0,01 g) uzorka pogače i dodano 10 mL 95 %-tnog etanola (V V⁻¹). Nakon toga se u uzorak doda 8 mL mravlje i 12 mL klorovodične iseline. Zarijavanje se provodi povratnim hladilom u vodenoj kupelji (INKO

d.o.o., Zagreb, Hrvatska) temperature 75 ± 1 °C 1 h. Nakon zagrijavanja, sadržaj tikvice se kvantitativno prenose u lijevak za odjeljivanje pomoću 18 mL etanola i 50 mL heksana. Faze se snažno miješaju 5 minuta zbog boljeg prelaska masne frakcije u heksansku frakciju. Nakon odjeljivanja faza, alkoholni sloj se otpušta u drugi lijevak za odjeljivanje u koji se dodaje 30 mL heksana, miješa i odjeljuje. Postupak se ponavlja 2 puta. Sve heksanske frakcije se spoje, a otapalo se od masne frakcije otpari na rotavaporu (Heidolph, Schwabach, Njemačka) pri 40 °C.

3.1.6. Određivanje koncentracije i sastava sterola

Za određivanje koncentracije i sastava sterola u uzorcima nepolarne frakcije ekstrahirane iz pogača uJane repice korštena je metoda HRN EN ISO 12228-1:2014.

Reagensi:

- Kalijev hidroksid KOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) – otopiti 3 g KOH u 5 mL vode i razrijediti u 100 mL 95 %-tnog etanola ($V V^{-1}$)
- Interni standard, kolestanol ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ u 95 %-tnom etanolu ($V V^{-1}$))
- Etanol 95 % ($V V^{-1}$), Kefo (Sisak, Hrvatska)
- Aluminijev oksid (0,063 mm – 0,200 mm; udio vode 0 %)
- Dietil eter, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Silikagel ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC) (Macherey-Nagel, GmbH, Co. KG)
- Razvijajući reagens (TLC) – heksan/dietil eter (50 mL/100 mL)
- Heksan, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Otopina standarda za TLC ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ kolestanola u acetonu i $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ kolesterola u acetonu)
- Aceton, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Kefo (Sisak, Hrvatska)
- Sililirajući reagens, sililiranje koji se sastoji od piridina, heksametilidisilazana i trimetilklorsilana u omjeru 5:2:1 ($V V^{-1} V^{-1}$)

Aparatura i pribor:

- Tikvice s okruglim dnom (25 mL i 50 mL)
- Povratno hladilo

- Staklena kolona sa sinterom na dnu
- Rotacijski otparivač, Heidolph, Schwabach, Njemačka
- Kapilarne cjevčice
- Sušionik
- Filter papir (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm)
- Vijalice
- Uređaj za plinsku kromatografiju, Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD)
 - maseni detektor tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector
 - računalo
 - kapilarna kolona Agilent DB-17MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm)
- Eksikator
- Razvijajuće kadica za TLC
- Analitička vaga

Princip metode temelji se na saponifikaciji uzorka kojemu je dodan α -kolestanol kao unutarnji standard s etanolnom otopinom KOH. Neosapunjivi dio se izdvaja ekstrakcijom krute faze s dietileterom na koloni ispunjenoj aluminijevim oksidom. Aluminijev oksid služi da bi zadržao anione masnih kiselina, a propustio negliceridne spojeve. Frakcija sterola se od neosapunjivog dijela odvaja separacijom na tankoslojnoj kromatografiji. Kvalitativni i kvantitativni sastav sterolne frakcije se analizira plinskom kromatografijom uz spektrometriju mase.

Za pripremu neosapunjivog dijela u okruglu tikvicu s ravnim dnom od 100 mL se pomoću pipete doda $0,25 \pm 0,001$ g uzorka masne frakcije. U tikvicu s izvaganim uzorkom doda se 1 mL etanolne otopine α -kolestanola i 5 mL etanolne otopine KOH. Dodaju se i tri kuglice za vrenje. Tikvica se spoji na povratno zračno hladilo i zagrijava na plameniku. Kada sadržaj tikvice provri, plamen se smanji na najmanji mogući i ostavlja da kuha 15 minuta. Nakon 15 min tikvica se odvoji od zračnog hladila i u nju se odmah doda 5 mL etanola. Nakon što se sadržaj tikvice ohladi, 5 mL ove otopine se propusti kroz kolonu s prethodno pripremljenim aluminijevim oksidom.

Kolona za kromatografiju u stupcu je bila dugačka 25 cm sa sinterom na dnu kolone, unutarnjeg promjera 1,5 cm. Na dno kolone stavi se vata do sintera i doda malo etanola kako bi vata što bolje prionula. Odvaže se 10 g aluminijevog oksida. U čašu s aluminijevim oksidom postepeno se doda 20 mL etanola kako bi se sva količina adsorbensa kvantitativno prenijela u kolonu za

kromatografiju. Punjenje kolone potrebno je provesti pažljivo kako bi se izbjegle moguće pukotine u stupcu aluminijevog oksida za kromatografiju. Višak etanola se ispusti.

Ekstrakcija neosapunjivog dijela počinje nakon što se uzorak ohladi i pipetom se prebaci se 5 mL otopine uzorka iz tikvice na kolonu. Eluat se skuplja u tikvicu od 50 mL s okruglim dnom. Elucija traje dok otopina ne dosegne sam vrh sloja aluminijevog oksida te se nastavlja s 5 mL etanola. Nakon što etanol dosegne sam vrh sloja aluminijevog oksida u kolonu se dodaje još 30 mL dietil etera kojim se i završava proces eluiranja. Protok otapala tijekom procesa eluiranja treba održavati na oko 2 mL min^{-1} . Dobiveni eluat se otpari do suhog na rotacijskom otparivaču na $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sterolna frakcija se od neosapunjivog dijela odvaja na tankoslojnoj kromatografiji (TLC). Prethodno razrijeđen nesaponificirani dio s 0,5 mL dietil etera se nanese na TLC ploče, pri čemu je svaka točka otopine u razmaku od 2 - 3 cm od ruba ploče. Zatim se TLC ploče uranjaju u kadice sa 100 mL otopine za razvijanje koja je u ovom slučaju smjesa heksana i dietil etera u jednakim omjerima. Kromatogram se razvija pri sobnoj temperaturi do trenutka kada linija otapala dostigne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče. Nakon što se pomoću kapilarnih sila otopina uzvodno razvukla po ploči, slijedi vađenje i špricanje s metanolom dok se zone sterola zajedno s α -kolestanolom ne pojave. Zone se označe (2 mm iznad i 4 mm ispod vidljivog traga), ostružu i kvantitativno prenesu u laboratorijsku čašu. Radi kvantitativnog prenošenja silika gela dodaje se 0,5 etanola 98 % i prenese u lijevak s filter papirom (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm) i sterolna frakcija se izdvoji ispiranjem 3 puta s po 5 mL dietiletera. Potrebno je reducirati eter ekstrakt na otprilike 1 mL na rotacionom otparivaču i prebaciti u epruvete. Do suhoga se otpari uz pomoć dušika se te takvi uzorci mogu čuvati do analize u zamrzivaču.

Analiza sastava neosapunjive frakcije - sterol trimetilsilil etera, provodi se plinskom kromatografijom nakon sililiranja uzorka pomoći reagensa za sililiranje koji se sastoji od piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 5:2:1 ($V V^{-1} V^{-1}$). Uzorak pomiješan s 100 μL reagensa za sililiranje stavi se u sušionik na temperaturu od $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ na 15 min. Sadržaj se zatim ohladi na sobnu temperatura i uzorak je spreman za injektiranje i analizu plinskom kromatografijom.

Pripremljen uzorak analiziran je na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljenom s masenim detektorom tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector koji su preko kanala spojeni na računalo. Korištena je kapilarna kolona Agilent DB-17MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm). Količina injektiranog uzorka je 1 μL . Protok helija kao plina nosioca iznosio je $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ uz konstantan protok kroz cijelo trajanje metode, uz Split 13,3:1. Temperatura injektora je

postavljena na 290 °C, a temperatura pećnice je programirana da raste 6 °C min⁻¹ od 180 do 270 °C, a maksimalna temperatura se zadržava 30 min. Temperatura “aux-a” iznosi 280 °C.

Kvalitativno određivanje sterola provedeno je na osnovu retencijskih vremena te usporedbom s retencijskim vremenima trimetilsililetera standardnih mješavina sterola analiziranih pod jednakim uvjetima. Metodom normizacije površine ispod pikova, računa se pojedinačni udio sterola i izražava kao % od ukupnih sterola.

Analiza je provedena u minimalno 4 paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

Udjel ukupnih sterola izražen je u mg kg⁻¹ i izračunat je po formuli [2] :

$$UKUPNI\ STEROLI = \frac{\sum A_s \times 1000}{A_\alpha \cdot m} \quad [2]$$

Gdje je:

A_s – površina svakog pojedinačnog pika fitosterola

A_α - površina ispod pika α -kolestanola

m – masa uzorka repičinog ulja (g)

Udjel pojedinačnih sterola izražen je kao % od ukupnih sterola te je izračunat po formuli [3]:

$$\% \text{ od UKUPNIH STEROLA} = \frac{A \times 100\%}{\sum A_i} \quad [3]$$

Gdje je:

A – površina ispod pika određenog fitosterola

A_i – površina ispod pika svakog pojedinačnog sterola

3.1.7. Određivanje udjela netopljivih i topljivih vlakana

3.1.7.1. Ekstrakcija masti po Soxhletu

Kako pogača uljane repice ima udio masti veći od 10 %, za određivanje topljivih i netopljivih vlakana prvo ju je potrebno odmastiti.

Ekstrakcija se provodi u aparaturi po Soxhletu prema metodi HRN EN ISO 660:2010. Aparatura se sastoji od kupelji za zagrijavanje (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska), ekstraktora s umetnutom čahuricom u koju se odvažuje 10 g samljevenog uzorka pogače (s točnošću od 0,0001 g). Čahure su napravljene od filter papira (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm) kako na vati u standardnim čahurama ne bi zaostalo vlakana. Ulje se ekstrahira petroleterom koji se nakon ekstrakcije otpari, a tikvica s ostatkom se suši 1 sat na temperaturi od $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, hladi u eksikatoru i važe. Sušenje se nastavlja po 30 minuta sve do konstantne mase. Zaostala odmašćena pogača u čahurama se suši prvo na sobnoj temperaturi u digestoru preko noći, a nakon toga 4 sata na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ u sušioniku, a nakon toga kvantitativno prenese u petrijeve zdjelice gdje se čuva do daljnje analize

3.1.7.2. Određivanje udjela vode

Aparatura i pribor:

- Metalna zdjelica
- Sušionik
- Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
- Laboratorijska žlica
- Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,001 g

U prethodno osušenu, ohlađenu i izvaganu posudicu se izvažuje 3 g uzorka pogače koje smo prethodno odmastili. Uzorci se suše u sušioniku pri $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 sata, ohlade u eksikatoru i izvažuju. Postupak sušenja na $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ po jedan sat se ponavlja do konstantne mase.

Udio vlage se prikazuje u postocima prema sljedećoj formuli [4]:

$$\text{udio vlage} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100 \quad [4]$$

Dobiveni podaci o količini vode u uzorku koriste se za izračun udjela količine suhe tvari, koja se prikazuje u postocima, a izračunava se prema formuli [5]:

$$\text{udio suhe tvari (\%)} = 100 (\%) - \text{udio vlage (\%)} \quad [5]$$

m_1 – masa prazne posudice [g]

m_2 – masa posudice s uzorkom prije sušenja [g]

m_3 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja [g]

3.1.7.3. *Određivanje udjela i sastava prehrambenih vakana*

Reagensi:

- 96 %-tni etanol ($V V^{-1}$), Kefo (Sisak, Hrvatska)
- 78 %-tni etanol ($V V^{-1}$)– priprema: odmjernu tikvicu od 1 l stavi 180 mL destilirane vode te se tikvica do oznake napuni 96 %-tnim etanolom ($V V^{-1}$)
- aceton, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska)
- enzimski set K-TDFC, Megazyme International Ireland (Wicklow, Irska) - čuvaju se na temp. 0 - 5 °C
 - termostabilna α -amilaza (E-BLAAM); 3000 Ceralpha Units mL^{-1}
 - proteaza (E-BSPRT); 50 mg mL^{-1} ; 350 Tyrosine Units mL^{-1}
 - amiloglukozidaza (E-AMGDF); 200 pNP β -maltoside Units mL^{-1} (ili 3,300 Units mL^{-1} on soluble starch)
- D-sorbitol, Megazyme set
- voda
- Celite, Sigma-Aldrich
- otopina za pranje filter lončića, Labex, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 6,0 M otopina NaOH ($V V^{-1}$) - 24 g NaOH se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom
- otopina MES-TRIS pufera- svaki 0,05 M; pH = 8,2 pri 24 °C
 - kalcijev klorid dihidrat, Sigma-Aldrich
 - maleatna kiselina, ≥ 99 %, ReagentPlus, Sigma-Aldrich
 - Priprema: u 800 mL vode u odmjernoj tikvici od 1 L otopiti 5,8 g maleinske kiseline te potom podesiti pH na 6,0 s 4 M NaOH. Dodati 0,3 g kalcijevog klorida dihidrata i nadopuniti tikvicu do oznake.
- 37 % ($V V^{-1}$) HCl, Carlo Erba
- 0,561 M otopina HCl ($V V^{-1}$) - 9,63 mL 37 %-tne otopine HCl-a se otpipetira u odmjernu tikvicu od 200 mL u koju je prethodno stavljeno oko 100 mL vode te se nadopuni do oznake destiliranom vodom
- 5 %-tna otopina NaOH ($V V^{-1}$)- u odmjernu tikvicu od 100 mL se stavi 5 g NaOH te se otopi u 95 mL destilirane vode

- 5 %-tna otopina HCl ($V V^{-1}$)-12,24 mL 37 %-tne HCl se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL u koju je prethodno stavljeno oko 50 mL destilirane vode te se nadopuni do oznake destiliranom vodom
- smola Amberlite 200CNa, ROHM AND HAAS FRANCE S.A.S., Dow (aktivacija natapanjem 30 minuta u dvostruko većem volumenu 7 % HCl ($V V^{-1}$), potom ispiranje)
- smola Amberlite FPA53, ROHM AND HAAS FRANCE S.A.S., Dow
- octena kiselina, 2 M ($V V^{-1}$)

Aparatura i pribor:

- analitička vaga, ALS220-4N, Kern
- vodena kupelj s tresilicom, SBS40, Stuart (UK)
- pH metar 3510, Jenway 3510 (UK)
- magnetska miješalica KA® RT5 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
- rotacijski otparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka).
- termometar, Quartz
- sušionik
- staklena menzura 50 i 500 mL
- mufolna peć, KR170,W. C. HERAEUS HANAU
- najlonski membranski filter, 0,45 μ m HNWP, Kefo
- najlonski filter za špricu, 0,45 μ m, Labex Ltd., FilterBio
- HPLC uređaj, Shimadzu
 - pumpa LC-10AD, Shimadzu
 - odzračivač DGU-14A, Shimadzu
 - pećnica CTO-10AS, Shimadzu
 - detektor indeksa loma RID-10A, Shimadzu
 - program LCsolution Version 1.22 SP1, Shimadzu
- staklene Duran boce s čepom, 250 mL, 500 mL i 1 L
- lončići za filtraciju, Duran 2
- odsisna boca
- stakleni adapter za lončiće za filtraciju
- gumeni prsten
- eksikator
- graduirane pipete (20 mL)

- automatska propipeta
- menzura (50 mL, 100 mL, 1 L)
- okrugla tikvica s ravnim dnom (250 mL, 500 mL)
- plastične Eppendorf epruvete (1,5 mL)
- plastične Falcon epruvete (15 mL, 50 mL)
- set magneta
- kolona za deionizaciju
- staklena čaša (100 mL)
- špatula
- vata

Udio i sastav prehrambenih vlakana određen je prema metodi AOAC 2011.25 (Megazyme, 2017).

U Duran bocu od 250 mL s čepom odvažuje se 1 g odmašćene pogače s točnošću $\pm 0,0001$ g. Prethodno je potrebno je pripremiti otopinu pankreasne α -amilaze i amiloglukozidaze u N-maleatnom puferu. Koncentracija pankreasne α -amilaze iznosi 50 jedinica mL^{-1} , a koncentracija amiloglukozidaze 3,4 jedinice mL^{-1} .

Uzorak se zatim navlaži s 1 mL 95 % etanola i menzurom se dodaje 40 mL pripremljene otopine enzima u maleatnom puferu (pH 6). Tako pripremljenu otopinu potrebno je homogenizirati nekoliko minuta na magnetskoj miješalici. Uzorci se potom inkubiraju u vodenoj kupelji prethodno temperiranoj na 37 °C. Bocama se lagano olabavi čep i takve se stavlja u kupelj nakon čega slijedi inkubacija od točno 16 sati uz miješanje brzinom 120 okr min^{-1} . Nakon točno 16 sati zaustavlja se reakcija dodatkom 3,0 mL Tris pufera i uzorak se lagano promiješa. Slijedi inkubacija u kupelji na 90 – 100 °C, 20 minuta uz povremeno miješanje uzorka. Nakon 20 minuta, Duran boce s uzorkom je potrebno ohladiti dok ne dostignu temperaturu od 60 °C i nakon toga se dodaje 100 μL proteaze i homogenizira 2 minute na magnetskoj miješalici. Boce se vraćaju na inkubaciju 30 minuta na 60 °C uz orbitalno miješanje brzinom 120 okr min^{-1} . Nakon 30 minuta boce se vade van i uzorku se najprije dodaje 4 mL octene kiseline, potom 1 mL otopine internog stanarda (D-sorbitola).

Analiza je provedena u dva paralelna mjerenja za svaki uzorak.

Priprema lončića za određivanje vlakana

Lončići za filtraciju potrbno je prethodno pripremiti za analizu tako što se stave u mufolnu peć na 525 °C 4 sata, ohlade preko noći i u hladne lončice staviti 2 %tnu otopinu Labexa, u trajanju od 1 h. Slijedi ispiranje s vodom i destiliranom vodom, a zadnje ispiranje se provodi s 15 mL acetona i lončići se ostave sušiti na zraku. U čiste i suhe lončice odvažuje se 1 g Celite i stavi ih se sušiti na 525 °C u mufolnoj peći 4 sata, suše se u eksikatoru oko 1 h, a nakon toga se izvažu i zabilježi se masa.

Određivanje netopljivih vlakana (IDS) :

Postupak se provodi na vakuum filtraciji i prethodno pripremljen lončić s celitom se ispiru s 10 mL 78% etanola kako bi se celit ravnomjerno rasporedio na površini i podesi se vakuum. Odsisna boca se mijenja za prikupljanje filtriranog uzorka i za ispiranje lončića. Uzorak se kvantitativno prenosi na filter lončić ispiranjem s oko 35 mL vode zagrijane na 60 °C, u obrocima od 10 mL. Filtrat se prelijeva u Duran boce od 500 mL i čuva se za određivanje topljivih vlakana (SDFP). Ostatak, odnosno talog, na lončiću za filtraciju potrebno je odmah isprati dva puta s 15 mL 78% etanola, dva puta s 15 mL 95% etanola i dva puta s 15 mL acetona. Nakon toga se pokriva aluminijskom folijom i stavlja sušiti preko noći na 105 °C.

Određivanje topljivih vlakana velike molekulske mase (SDFP):

Prethodno dobiveni filtrat i 95 % etanol zagrijan na 60 °C kojeg se dodaje u suvišku, odnosno 4 puta više nego filtrata, se stavlja na taloženje najmanje 1 sat pri sobnoj temperaturi. Odvajanje SDFP odvija se također u lončićima kao i IDS osim što se stijenke boce gdje je prethodno bio uzorak ispiru u 3 navrata sa 78 % etanolom kako bi se sav uzorak kvantitativno prenio. Dobiveni filtrat se stavlja u menzuru i pola od tog volumena se prebaci u tikvicu s okruglim dnom i uparava na rotavaporu pod vakuumom pri 60 °C do suhoga. Upareni uzorak se otapa u 5 mL deionizirane vode uz miješanje 2 minute kako bi se sav uzorak otopio. Dobiveni koncentrirani filtrat se koristi za određivanje topljivih vlakana male molekulske mase. Lončić s talogom se ispiru dva puta s 15 mL 78 % etanola, dva puta s 15 mL 95 % etanola i dva puta s 15 mL acetona. Isprani lončić s vlaknima pokrije se aluminijskom folijom i stavlja sušiti preko noći na 105 °C nakon čega se hladi u eksikatoru i važe.

Određivanje topljivih vlakana male molekulske mase na HPLC-u (SDFS):

Prvo se provodi deionizacija uzorka kako bi se odvojile sve soli koje bi mogle pokazivati odziv na HPLC-u. Deionizacija uzorka se provodi tako da se odvaže potrebnu odvagu smole (ovisno o broju uzoraka) Amberlite 200 na koja je prethodno prošla aktivaciju, odnosno otpuštanje Na⁺ i vezanje H⁺ iona) i istu količinu smole Amberlite FPA53 u čašu. Kolone za deionizaciju se postavljaju na postolje s otvorenim ventilom iznad Falcon epruvete. Dobro homogeniziranu smolu prelije se u kolone i na vrh se stavi malo vate te se tako pripremljena kolona ispere s 20 mL vode. Na kolonu se nanosi 2 mL koncentriranog filtrata dobivenog prilikom filtriranja topljivih vlakana velike molekulske mase, te potom 2 mL vode. Brzina elucije treba iznositi 1 mL min⁻¹ (1 kapi u 3 sekunde). Nakon elucije uzorka, na kolonu doda 20 mL vode i nastavi eluirati istom brzinom. Eluat se sakuplja u okruglu tikvicu od 250 mL, a otapalo se otpari na rotavaporu pri 60 °C do suhog. U tikvicu se nakon otparavanja doda 2 mL deionizirane vode, miješa 2 minute kako bi se otopili svi šećeri. Nakon toga se pripremljeni uzorak pipetom prenese u Eppendorf epruvetu i čuva u zamrzivaču do određivanja topljivih vlakana male molekulske mase HPLC metodom.

Topljiva vlakna se određuju na HPLC-u s detektorom koji mjeri indeks refrakcije (RI). Uvjeti analize podešavaju se prema sljedećim parametrima:

Kolona: METACARB 67C, Agilent Technologies

Mobilna faza: vodena otopina Na-EDTA, 50 mg L⁻¹

Protok: 0,5 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 80 °C

3.1.7.4. Određivanje udjela proteina u ostatku– Metoda po Kjeldahlu:

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.

Aparatura i pribor:

- laboratorijska vaga
- uređaj za mineralizaciju
- Kjeldahl-ove kivete za mineralizaciju sa stalkom

- Efikasni sistem za odvod pare: aspirator ili pročistač plina ili tekuća voda
- Uređaj za destilaciju
- Posudice za vaganje
- 25 mL birete (graduacija = 0,1 mL)
- 250 mL Erlenmayerove tikvice
- 10 mL dispnzeta za konc. H₂SO₄
- 25 mL dispnzeta za bornu kiselinu

Jedan od dva paralena lončića za topljiva i jedan za netopljiva vlakna za svaki uzorak pogače se zajedno s celitom nakon vaganja prenose u Kjeldahl kivete (svaki u svoju). U kivetu se doda jedna Kjeldahl tableta i 12 mL 96 % sumporne kiseline. Uzorak se spaljuje u bloku za spaljivanje sve dok nema više vidljivih crnih ostataka i plavo-zelene je boje. Kivete s uzorkom nakon digestije se ohlade 45 minuta na sobnoj temperaturi do daljnje analize kako ne bi došlo do burne reakcije sumporne kiseline i vode koja se dodaje u volumenu od 70 ml. Pripremi se Erlenmeyerova tikvica s 25 mL 4 % borne kiseline te se postave uvjeti analize na Kjeltec uređaju. Destilacija se provodi 4 minute, a volumen dodane lužine je 50 ml. Dobiveni destilat se titrira klorovodičnom kiselinom do promjene boje iz zelene u ružičastu. Udio dušika računa se prema sljedećoj formuli [6]:

$$Udio\ dušika = \frac{(T-B) \times N \times 14,007 \times 100}{m} \quad [6]$$

T – volumen titranta V (HCl; ml)

B – volumen titranta slijepe probe V (HCl; ml)

N – koncentracija klorovodične kiseline (mol kg⁻¹)

m – masa uzorka (mg)

Udio proteina u uzorku se prikazuje u postocima prema formuli [7]:

$$Udio\ proteina = \%N \times F \quad [7]$$

% N – udio dušika

F – faktor pretvorbe za proteine uljarica iznosi 6,25

3.1.7.5. Određivanje udjela pepela u ostatku

Aparatura i pribor:

- Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
- Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g , KERN ALS 220-4N (Balingen, Njemačka)
- Mufolna peć s regulatorom temperature
- Laboratorijska kliješta

Drugi lončići iz paralelnih određivanja topljivih i netopljivih vlakana se s uzorkom spale u mufolnoj peći na 525 °C kroz 4 sata. Korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 2171:2010) uz izmjene. Lončići se nakon spaljivanja ostavljaju preko noći u ugašenoj mufolnoj peći kako bi se djelomično ohladili, a nakon toga dodatno se hlade u eksikatoru do sobne temperature (1 h) i izvažu. Udio pepela u uzorku računa se prema formuli [8]:

$$\text{udio pepela} = \frac{m_3 - m_2}{m_1} * 100 \quad [8]$$

m_1 – masa vlakana bez korekcije [g]

m_2 – masa lončića s celitom [g]

m_3 – masa lončića s celitom i pepelom [g]

3.1.7.6. Izračunavanje mase netopljivih vlakana, topljivih vlakana velike molekulske mase i topljivih vlakana male molekulske mase

Masa topljivih vlakna velike molekulske mase je izračunata prema formuli [9]:

$$m_1 = m_3 - m_2 \quad [9]$$

m_1 – masa vlakana netopljivih u 78% etanolu iz uzorka [g]

m_2 – masa lončića s celitom [g]

m_3 – masa lončića s celitom i vlaknima netopljivim u 78% etanolu iz uzorka [g]

Udio vlage u uzorku i rezultat se izražava kao masa netopljivih vlakana u 1 g suhe tvari [g] prema formuli [10]:

$$m_4 = \frac{m_1 - \frac{\text{udio proteina [\%]} * m_1}{100} - \frac{\text{udio pepela [\%]} * m_1}{100}}{m_5} \quad [10]$$

m_1 – masa netopljivih vlakana u uzorku [g]

m_4 – masa netopljivih vlakana, korigirana za udio proteina i pepela, u 1 g uzorka [g]

m_5 – masa uzorka uzetog u analizu [g]

Udio vlage e u uzorku i rezultat se izražava kao masa netopljivih vlakana u 1 g suhe tvari [g] prema formuli [11]:

$$m(SDFP) = \frac{m_4}{\text{udio suhe tvari}} \quad [11]$$

$m(IDS)$ – masa netopljivih vlakana u 1 g suhe tvari uzorka [g]

m_4 – masa netopljivih vlakana, korigirana za udio proteina i pepela, u 1 g uzorka [g]

Masa SDFS-a [$\text{mg } 100\text{g}^{-1}$] izračunata je prema formuli [12]:

$$m(SDFS) = Rf * m(IS) * \frac{PP_SDFS}{PP_IS} * \frac{100}{m} \quad [12]$$

$m(SDFS)$ – masa topljivih vlakana [$\text{mg } 100\text{g}^{-1}$]

Rf – faktor odgovora

$m(IS)$ – masa internog standarda u 1 mL otopine

PP_SDFS – površina pika topljivih vlakana

PP_IS – površina pika internog standarda

m – masa uzorka čiji filtrat je analiziran

Kako bismo uklonili greške u analizi izazvane utjecajem reagenasa i postupka, potrebno je napraviti slijepu probu. U slijepu probu se ne dodaje uzorak. Daljnja priprema mora biti identična ostalim uzorcima, prema protokolu metode. Izračunati masu slijepe probe (mg) prema formuli [13]:

$$\text{slijepa proba [mg]} = \frac{m_{s.p.1} - m_{s.p.2}}{2} - m(\text{proteina}) - m(\text{pepela}) \quad [13]$$

$m_{s.p.1}$ – masa rezidua za prvu paralelu slijepe probe

$m_{s.p.2}$ – masa rezidua za drugu paralelu slijepe probe

$m(\text{proteina})$ – masa proteina određena iz rezidua slijepe probe

$m(\text{pepela})$ – masa pepela određena iz rezidua slijepe probe

3.1.8. Statistička obrada

Statistička analiza dobivenih rezultata analize provedena je u programu Microsoft Excel 2003 (Microsoft, 2003). Za izračun udjela netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana korišten je Megazyme Mega-Calc™ (Megazyme, 2018). Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Analiza varijance (ANOVA) provedena je kako bi se utvrdio utjecaj dvije nezavisne varijable (vremena i načina mljevenja) kao i njihovih interakcija, na veličinu čestica te udio sterola i prehrambenih vlakana. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zbog rastućeg broja stanovništva na globalnoj razini i ograničavajuće površine poljoprivrednog zemljišta stvara se potreba za novim inovativnim prehrambenim proizvodima za postizanje globalnog održivog razvoja i zdrave populacije. Nusproizvodi prerade namirnica biljnog porijekla imaju veliku mogućnost uporabe kao alternativne sirovine. Pogača uljane repice je nusprodukt proizvodnje ulja uljane repice i bogata je bjelančevinama i vlaknima. Proteini uljane repice u usporedbi s proteinima soje sadrže visoke koncentracije S-aminokiselina kao što su metionin i cistein. Kako raste potražnja mesnih analoga zbog povećanja veganske potražnje u svijetu, sve se više širi tržište u potražnji proizvoda koji su nutritivno bogati, no ograničavajući faktor korištenja ove pogače je prisustvo antinutritivnih komponenti (Kozłowska i sur., 1975). Osim proteina, istraživanja su usjerena na polifenolne spojeve, sastav masnih kiselina, oksidacijsku stabilnost, udio vlakana i sterola. Pretpostavka je kako bi se pronalaskom odgovarajućeg procesa u prehrambenoj industriji, kojim bi se regulirala koncentracija željenih i neželjenih komponenti, omogućila široka upotreba ovog nusproizvoda proizvodnje ulja i time bi se asortiman industrije ulja povećao za još jedan proizvod na prehrambenom tržištu (Campbell i sur., 2016).

Pregledom baza podataka znanstvenih radova primijećeno je kako se mljevenje kugličnim mlinom uz primjenu kriogenog hlađenja nije istraživalo na pogači uljane repice. Cilj ovog rada je utvrditi utjecaj mljevenja na veličinu čestica, udio i sastav sterola kao i topljivih i netopljivih vlakana.

4.1. Veličina čestica

Raspodjela veličine čestica određena je metodom laserske difrakcije, a prikazana je vrijednostima parametara raspodjele veličine čestica - $D [3,2]$, $d (0,1)$, $d (0,5)$, $d (0,9)$, te je definiran raspon (span). Laserska difrakcija čestica je jedna od najrasprostranjenijih metoda za mjerenje veličine čestica. Glavni razlozi koji prionose tome su širok raspod mjerenja, brzina, ponovljivost, trenutačna povratna informacija, velika količina uzorka, provedba kalibracije nepotrebna te dobra utvrđenost metode (Malvern Instruments, 2015).

Rezultati utjecaja mljevenja pogače uljane repice s krio mlinom (CryoMill) i njegov utjecaj na raspodjelu veličine čestica prikazani su u tablici 10. i 11. te na slikama 4. i 5.

Parametar D [3,2] predstavlja Sauterov promjer. To je površinski ekvivalentni promjer. Parametar d (0,5) je promjer čestice za koji vrijedi da 50 % ukupnog broja čestica ima promjer veći od d (0,5) i 50 % čestica ima promjer manji od d (0,5). Span odnosno raspon predstavlja širinu raspodjele čestica.

Tablica 10. Parametri raspodjele veličine čestica (μm) uzoraka mljevenih bez (BH) i uz primjenu kriogenog hlađenja (H) 2,4 8 ili 12 minuta u odnosu na kontrolni uzorak pogače

<i>Uzorak*</i>	<i>Parametri raspodjele veličine čestica (mm)</i>				
<i>P</i>	<i>d(0,1)</i>	<i>d(0,5)</i>	<i>d(0,9)</i>	<i>D [3,2]</i>	<i>Raspon</i>
<i>(kontrolni)</i>	128,22 ± 3,84	393,63 ± 8,96	881,57 ± 19,66	238,82 ± 6,04	1,91 ± 0,01
2BH	60,05 ± 0,31	273,04 ± 2,20	770,90 ± 6,22	130,55 ± 0,93	2,60 ± 0,01
4BH	48,48 ± 1,04	229,43 ± 7,13	698,35 ± 20,30	108,55 ± 2,09	2,83 ± 0,01
8BH	41,32 ± 0,45	202,42 ± 5,01	669,70 ± 13,56	95,12 ± 1,14	3,10 ± 0,04
12BH	33,50 ± 0,42	174,85 ± 4,98	615,21 ± 10,57	79,65 ± 1,07	3,33 ± 0,04
2H	39,56 ± 2,87	164,20 ± 2,83	360,35 ± 1,51	83,10 ± 4,24	1,95 ± 0,04
4H	35,54 ± 0,10	137,36 ± 0,13	288,23 ± 1,12	75,05 ± 0,20	1,84 ± 0,01
8H	20,73 ± 0,37	92,31 ± 0,22	204,87 ± 0,67	49,84 ± 0,54	1,99 ± 0,02
12H	13,80 ± 0,17	61,78 ± 1,22	148,80 ± 0,98	34,28 ± 0,52	2,19 ± 0,03

*Opis uzoraka se nalazi u Tablici 8.

Prema podacima prikazanim u tablici 10. primjeti se kako parametri veličine čestica, tj. vrijednosti d (0,1), d (0,5), d (0,9) i D [3,2] smanjuju s dužim vremenom trajanja mljevenja. Kod mljevenja uzoraka značajna promjena parametra d (0,1) se postiže već nakon 2 minute mljevenja u oba slučaja sa kriogenim hlađenjem (H) (smanjenje za 68 %) i bez kriogenog hlađenja (BH) (smanjenje za 54 %). Primjećeno je kako se vrijednost dodatno smanjivala s dužim vremenom mljevenja. Također, vrijednost d (0,1) je znatno manja kod svih uzoraka mjevenih s primjenom H, iz tog razloga je najmanja vrijednost upravo kod 12-te minute tretmana s H (smanjenje za 89 %). Vrijednost d (0,5) se također najviše smanjila nakon 12 minuta mljevenja, za 56 % BH i za 84 % uz hlađenje (H). Smanjenje d (0,5) vrijednosti je proporcionalno vremenu, pa se tako sa svakim intervalom postigne smanjenje veličine čestica za 30 – 40 mikrometara. Zanimljivo je primjetiti kako je mjevenjem kugličnim mlinom nakon 12 minuta pri sobnoj temperaturi došlo do redukcije veličine čestica sa 393,63 μm (d(0,5)) na

174,85 μm . S druge strane, primjenom kriogenog hlađenja, veličina čestica nakon samo 2 minute mljevenja manja je nego nakon 12 minuta mljevenja bez hlađenja uzorka i iznosi 164,20 μm .

Uz upotrebu hlađenja d (0,9) vrijednosti se značajno razlikuju od onih BH, pa tako se d (0,9) vrijednost najviše smanjila nakon 12 minuta mljevenja uz primjenu hlađenja (za 83 %), dok se kod uzoraka mljevenih BH 12 minuta smanjila za svega 30 %.

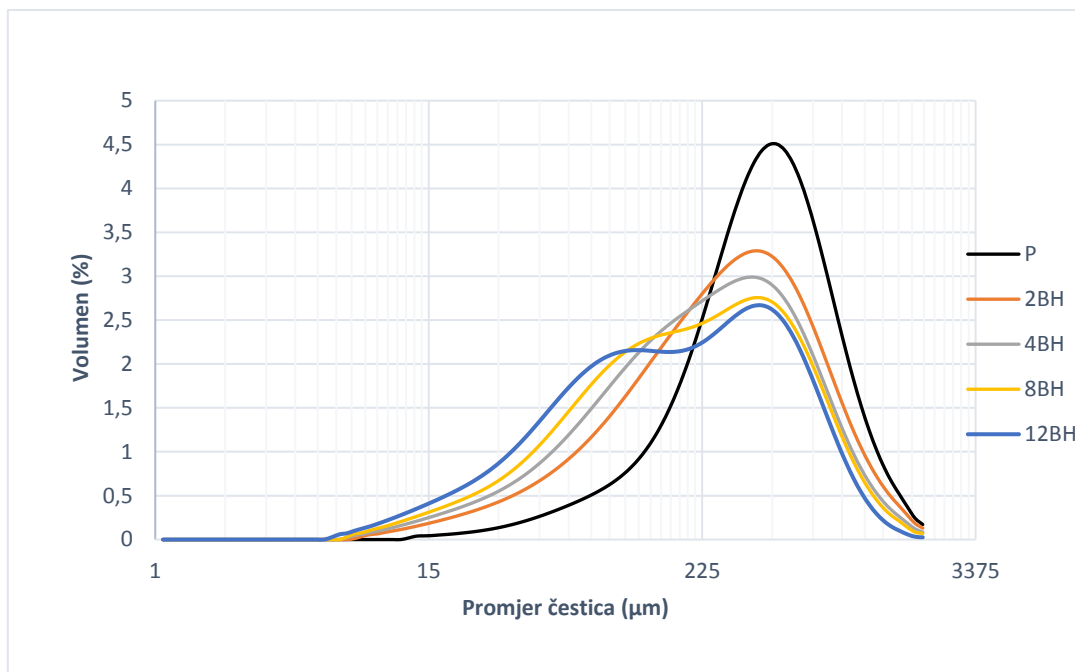
D [3,2], odnosno omjer volumena i površine predstavlja vrijednost reaktivnosti površine mljevenih čestica. Što je manja vrijednost D [3,2], to znači da je reaktivnost površine pogače veća (Singh i sur., 1999). Kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi D [3,2] vrijednost se očekivano najviše smanjila nakon 12 minuta mljevenja (za 3 puta), također s H u 12-toj minuti dolazi do najveće razlike u odnosu na kontrolni uzorak pogače (za 7 puta).

'Raspon' je dostigao najveću vrijednost postupkom bez tretmana hlađenjem i to 12 minuta (povećao se za 1,73 puta), dok je uz hlađenje najveća promjena također kod tretmana u trajanju od 12 minuta, no svega za 1,14 puta). Velika je razlika između tretmana sa i bez hlađenja pa tako možemo zaključiti da je za manji raspon pogodniji tretman sa hlađenjem jer ukoliko je ono prisutno, nema velikih promjena osim kod 12 minutnog tretmana gdje poraste.

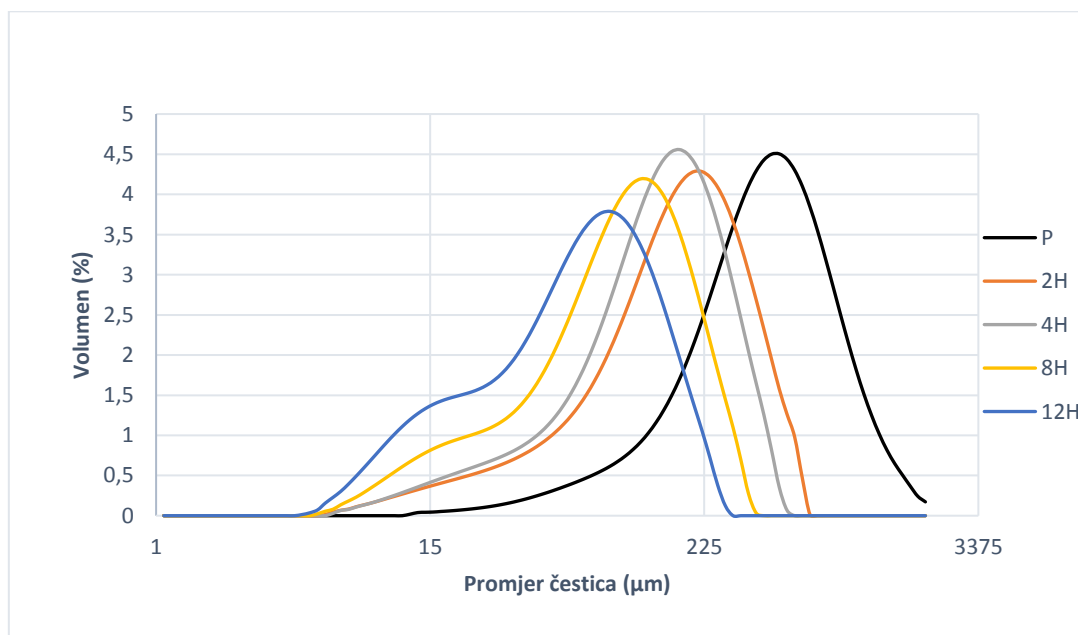
Uz ovakve rezultate, može se zaključiti da uz duže tretmane mljevenja sa i bez hlađenja dolazi do smanjenja vrijednosti d (0,1), d (0,5), d (0,9) i D [3,2]. Došlo je do značajnog povećanja raspona veličine čestica u uzorcima BH, dok je upotrebom kriogenog hlađenja (H) taj porast značajno manji, tj dolazi do uniformiranijeg mljevenja i čestice su sličnije veličine.

Upotrebom hlađenja kao dodatnim procesom uz kuglično mljevenje pokazalo se učinkovitim za dodatno smanjenje promjera čestica, što je bilo i očekivano jer pri niskim temperaturama čestice pogače postaju lako lomljiva, te se smanjuje mehanička energija potrebna za njihovo usitnjavanje i ono se provodi lakše nego bez KH.

Na grafičkim prikazima (Slike 4. i 5.) možemo vidjeti promjenu u raspodjeli čestica mljevenjem 2, 4, 8, 12 minuta sa/bez H u usporedbi s uzorkom pogače koja nije mljevena kugličnim mlinom.



Slika 4. Prikaz raspodjele veličine čestica obične pogače u usporedbi s mljevenjom pogačom na 2,4,8 i 12 minuta bez hlađenja. Opis uzoraka nalazi se u Tablici 8.



Slika 5. Prikaz raspodjele veličine čestica obične pogače u usporedbi s mljevenjom pogačom na 2,4,8 i 12 minuta uz hlađenje. Opis uzoraka nalazi se u Tablici 8.

Može se uočiti kako se prilikom mjevenja kugličnim mlinom bez hlađenja tekućim dušikom (Slika 4.) dobivaju krivulje na kojima se osim glavnog pika nazire još jedan pika koji ukazuje na manju uniformnost veličine čestica. Taj je pik izraženiji s produljenjem vremena mjevenja.

Te su krivulje i skladu s vrijednostima raspona. Ta je pojava uočena i kod mjevenja sa kriogenim hlađenjem, ali tek nakon 12 minuta mjevenja. Ovi su rezultati u skladu s istraživanjem koje su proveli Hemery i suradnici (2011) koji su prikazali u svom istraživanju kako je krio mljevenje rezultiralo manjim rasponom čestica nego mljevenje bez smrzavanja tekućim dušikom.

Pretpostavka je kako masni uzorci poput uljane repice mogu predstavljati problem za većinu mlinova jer dolazi do lijepljenja uzorka za stjenke mlina. Primijećeno je da upotrebom mlina bez krio hlađenja (kuglični mlin) dolazi do stvaranja većih aglomerata zbog zagrijavanja tijekom mljevenja te je učinak usitnjavanja poprilično manji nego u slučaju s KH. Upotrebom tekućeg dušika, zamrzava se uzorka što omogućava kvalitetnije usitnjavanje. Za masne uzorke poput pogače uljane repice poželjno bi bilo nastaviti istraživanje upotrebom većeg broja intermedijarnih hlađenja kako bi se osiguralo da je uzorak većinu vremena zamrznut.

U istraživanju Hemery i suradnika (2010) dokazano je kako kriogenim mljevenjem posija pucaju stanične stijenke što rezultira oslobađanjem sadržaja samih stanica, što dovodi do veće biodostupnosti određenih spojeva. Također, olakšavaju se interakcije spoj-otapalo i sama ekstrakcija željenih komponenti. Na primjeru molekule škroba Tran i suradnici (2011) su istražili utjecaj na strukturu molekule tretirane mljevenjem s i bez primjene KH. Došli su do zaključka kako struktura samog škroba ostaje nepromjenjena primjenom KH, dok u odsutnosti KH dolazi do degradacije amilopektina i amiloze kao i cijepanja lanca samog škroba čime se negativno utječe na nutritivnu vrijednost proizvoda.

4.2. Udio i sastav sterola

Fitosteroli, skvalen i tokoferoli su negliceridni spojevi ulja s bioaktivnim djelovanjem važnim za očuvanje samog ulja, ali imaju ulogu i u očuvanju ljudskog zdravlja (Azadmard-Damirchi i sur., 2010). Jedan od ciljeva ovog rada bio je ispitati utjecaj vremena mljevenja s i bez hlađenja na sastav i udio fitosterola pogače koja zaostaje nakon proizvodnje repičinog ulja.

Steroli su važne komponente ulja i pogače te se također koriste za istraživanje i identifikaciju ulja. Fitosteroli ili biljni steroli u pogači čine veći dio neosapunjive frakcije. U nutritivnom smislu su od velike važnosti zbog njihovog pozitivnog utjecaja na kolesterol, ali i zbog protuupalnog, antibakterijskog, antiulceroznog i antitumorskog djelovanja. Također pridonose oksidacijskoj i termičkoj stabilnosti i trajnosti biljnih ulja (Azadmard-Damirchi i sur., 2010).

U ovom radu određen je sastav i udjel sterola ispitivanih uzoraka pogače uljane repice koji su se razlikovali prethodnim tretmanom (različiti vremenski intervali mljevenja i +/- H). Pojedinačni pikovi sterola identificirani su na osnovi retencijskih vremena poznatih standarda te na temelju njihovih masenih spektara koji su uspoređeni s spektrima dostupnim u NIST knjižnicama. Rezultati dobiveni plinskom kromatografijom izraženi su u mg kg^{-1} , te je iz njih izračunat udjel (%) pojedinih sterola. U Tablici 11. prikazan je udio pojedinačnih te ukupnih fitosterola u analiziranim uzorcima.

Detektirani su sljedeći fitosteroli: brasikasterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^7 -avenasterol, Δ -5,24-stigmastadienol, Δ^5 -avenasterol i Δ^7 -stigmasterol. Rezultati analize udjela pojedinih fitosterola i njihova ukupna koncentracija u uzorcima ulja podudaraju se sa zahtjevima iz Pravilnika (2012), osim za stigmasterol koji se nalazi u većem udjelu u pogači koja je prethodno tretirana postupkom kiselinske hidrolize kao i Δ^5 -avenasterol koji je u nešto nižem udjelu od propisanog u uzorcima mljevenim 8 minuta bez KH i uzorku mljevenom 4 minute s KH.

Tablica 11. Sastav i udio sterola u uzorcima pogače uljane repice mljevenim bez (BH) i sa krio-hlađenjem (H) 2-12 minuta

Uzorak*	Steroli (% od ukupnih)										Ukupno u ulju (mg kg ⁻¹)	Ukupno u pogači (mg kg ⁻¹)
	Brasika-sterol	Kampe-sterol	Kampe-stanol [‡]	Stigma-sterol [‡]	β-sito-sterol [‡]	Δ5-avena-sterol	Δ7-avena-sterol	Δ7-stigma-sterol	Δ-5,24-stigma-stadienol [‡]	n.i.		
P (kis. h.)**	11,43 ± 0,33	27,89 ± 0,73	0,64 ± 0,03	1,18 ± 0,05	55,12 ± 0,64	2,18 ± 1,45	0,57 ± 0,04	0,05 ± 0,10	0,76 ± 0,02	0,18 ± 0,21	12445 ± 712	1590 ± 91
P	11,58 ± 0,46	29,35 ± 1,05	1,08 ± 0,04	0,66 ± 0,06	51,47 ± 0,53	3,54 ± 2,33	0,79 ± 0,38	0,09 ± 0,17	1,26 ± 0,06	0,18 ± 0,22	10708 ± 448	1483 ± 62
2BH	11,02 ± 0,04	27,20 ± 0,41	1,08 ± 0,03	0,68 ± 0,02	51,79 ± 0,57	5,77 ± 1,12	0,60 ± 0,05	0,28 ± 0,05	1,38 ± 0,07	0,22 ± 0,38	10039 ± 404	1382 ± 55
4BH	11,42 ± 0,48	28,88 ± 1,44	1,09 ± 0,08	0,66 ± 0,02	51,23 ± 0,87	4,74 ± 2,19	0,72 ± 0,63	nd***	1,22 ± 0,02	0,04 ± 0,07	10392 ± 188	1428 ± 25
8BH	11,78 ± 0,16	29,95 ± 0,20	1,09 ± 0,04	0,47 ± 0,41	52,33 ± 0,38	2,22 ± 1,01	0,82 ± 0,16	nd***	1,22 ± 0,07	0,13 ± 0,22	10785 ± 545	1487 ± 75
12BH	11,71 ± 0,07	29,12 ± 0,01	1,18 ± 0,02	0,71 ± 0,02	51,33 ± 0,04	3,17 ± 0,11	0,95 ± 0,03	nd***	1,35 ± 0,01	0,48 ± 0,07	10627 ± 168	1468 ± 23
2H	11,52 ± 0,28	28,65 ± 0,46	1,10 ± 0,03	0,73 ± 0,03	51,81 ± 0,70	3,46 ± 0,97	0,90 ± 0,44	0,14 ± 0,16	1,31 ± 0,07	0,37 ± 0,25	10654 ± 214	1493 ± 30
4H	12,10 ± 0,21	28,57 ± 0,66	1,07 ± 0,03	0,74 ± 0,03	52,80 ± 1,84	1,09 ± 0,16	1,15 ± 1,50	0,74 ± 0,23	1,23 ± 0,03	0,50 ± 0,59	10093 ± 473	1403 ± 65
8H	11,39 ± 0,20	28,79 ± 1,05	1,08 ± 0,08	0,80 ± 0,09	51,09 ± 1,04	4,36 ± 2,27	0,79 ± 0,42	0,05 ± 0,10	1,39 ± 0,18	0,27 ± 0,31	10393 ± 562	1450 ± 78
12H	11,62 ± 0,41	28,23 ± 0,89	1,09 ± 0,03	0,85 ± 0,02	51,66 ± 0,62	3,59 ± 1,82	1,10 ± 0,11	0,15 ± 0,14	1,29 ± 0,05	0,41 ± 0,14	11315 ± 387	1568 ± 53

*opis uzoraka nalazi se u Tablici 8; ** pogača tretirana postupkom kiselinske hidrolize; ***nije detektirano

[‡]statistički značajan utjecaj vremena mljevenja i interakcije mljevenja i hlađenja (p ≤ 0,05)

U odabiru optimalnog načina tretiranja važan faktor za odlučivanje trebao bi biti zadržavanje i dostupnost određenih nutrijenata u ulju poput sterola. Udjel ukupnih sterola u uzorcima (Tablica 11) bio je unutar vrijednosti navedenih u Pravilniku (2012) no statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) načina tretiranja pogače uljane repice ima na udio kampestanola, stigmasterola, β -sitosterola i Δ -5,24-stigmastadienola, dok ostali steroli nisu pokazali značajan utjecaj u odnosu na kontrolni uzorak pogače.

Iz prikazanih udjela sterola (Tablica 11) može se vidjeti da je u svim uzorcima u najvećem udjelu zastupljen β -sitosterol a slijedi ga kampesterol. Udio brasikasterola, koji je specifičan fitosterol za uljanu repicu, se podudara s podacima iz koje navode Aparicio i Aparicio-Ruiz (2000) te Przybylski i sur. (2005), i on obično služi za određivanje patvorenja drugih ulja s repičinim uljem.

Uspoređujući ove vrijednosti s vrijednostima Pravilnika (2012) i literaturnim navodima (Vlahakis i Hazebroek, 2000; Prior i sur., 1991; Przybylski i sur., 2005) ovakav sastav sterola odgovara sastavu sterola u repičinom ulju.

U tablici 11. prikazana je i koncentracija fitosterola preračunata na masu pogače. Vidljivo je kako nije bilo značajnog utjecaja na udio ukupnih sterola preračunat na pogaču uljane repice, osim u slučaju uzorka pogače tretirane kiselinskom hidrolizom i uzorka tretiranim 12 minuta uz upotrebu KH koji sadrže nešto veće koncentracije fitosterola u odnosu na druge uzorke.

Očekivano je da upotrebom kiselinske hidrolize dolazi do većeg oslobađanja slobodnih sterolnih alkohola te da je udio sterola u tom uzorku veći. Hidrolizom se degradira kompleksna struktura biljnog materijala i poboljšava ekstrakcija sterola iz okolne matrice te dolazi do hidrolize sterola u slobodne sterola (iz različitih konjugata). Kao takvi sadrže sličnu polarnost te se mogu ekstrahirati s jednim otapalom bez potrebe za kompromitiranjem s različitim polarnostima otapala i analita. Napolarna otapala prikladna su za ekstrakciju slobodnih sterola i sterolnih estera, ali polarniji konjugati (sterolni glikozidi, acilirani sterolni glikozidi i esteri sterolnih fenolnih kiselina) zahtijevaju polarnije otapalo za ekstrakciju lipida (Nyström i sur., 2009). No primjenom kiselinskog predretmana dolazi do promjene u udjelima nekih fitosterola. Tako je na primjer poznato da Δ 5-avenasterol djelomično izomerizira na stigmastadienol kao rezultat kiselinske hidrolize (Kamal-Eldin i sur., 1998). Smanjenje udjela Δ 5-avenasterola u ulju ekstrahiranom nakon kiselinske hidrolize uočeno je i u ovom istraživanju.

Veći udio fitosterola, kao dio negliceridnih spojeva, u uljima ekstrahiranim organskim otapalima može se objasniti selektivnim prijelazom tih spojeva u otapalo (Van Hoed i sur., 2010). Veći udio ukupnih sterola u masnoj frakciji izoliranoj iz pogače tretirane 12 minuta s hlađenjem kriogenikom može biti rezultat dužeg mehaničkog djelovanja kugličnog mlina kao i

bolje lomljivosti staničnih struktura što rezultira lakšoj dostupnosti sterola. Kao što je već prethodno spomenuto, dokazano je na primjeru posija kako kriogenim mljevenjem pucaju stanične stijenke što rezultira oslobađanjem sadržaja samih stanica, što dovodi do veće biodostupnosti određenih spojeva. Također, olakšava interakcije spoj-otapalo te ekstrakciju željenih komponenti (Hemery i sur., 2010).

Δ -5,24-stigmastadienol koji je prisutan u svakom uzorku ne pojavljuje se vrlo često u literaturi kao sterol koji se može detektirati u uljanoj repici, više je karakterističan za maslinovo ulje (Angerosa i sur., 2006). U usporedbi s maslinovim uljem, za koje se smatra da ima blagotvoran utjecaj na zdravlje, repičino ulje i njegova pogača imaju značajniji utjecaj na metabolizam kolesterola u organizmu. Repica ima tendenciju smanjenja apsorpcije kolesterola, povećava izlučivanje kolesterola i žučnih kiselina te povećava serumski marker sinteze žučnih kiselina i smanjuje razine seruma u kolesterolu u usporedbi s maslinovim uljem. To se može dijelom objasniti zbog različitosti i udjelu prirodnih biljnih sterola (Ellegard i sur., 2005).

4.3. Udio netopljivih i topljivih vlakana

Fizikalno-kemijska svojstva vlakana mogu se modificirati čime se mijenja njihova funkcionalnost. Takva promjena se postiže kemijskim, enzimskim, mehaničkim (npr. mljevenje), termalnim ili termo-mehaničkim (npr. ekstruzija) tretmanima (Matthäus, 1998).

Mljevenjem se mijenjaju hidratacijska svojstva vlakana, dok grijanjem i hlađenjem se mijenja omjere topljivih i netopljivih vlakana, što je dokazano kod heljde (Dhingra i sur., 2012). U radu Dziedzic i suradnici (2012) dokazano je da se, upotrebom topline u bilo kojem obliku može povećati sadržaj vlakana, no cilj ovog rada je bio vidjeti ima li kriogeno hlađenje i različiti vremenski intervali mljevenja utjecaj na veću ili manju rupturu strukture pogače i mijenja li se udio i sastav vlakana.

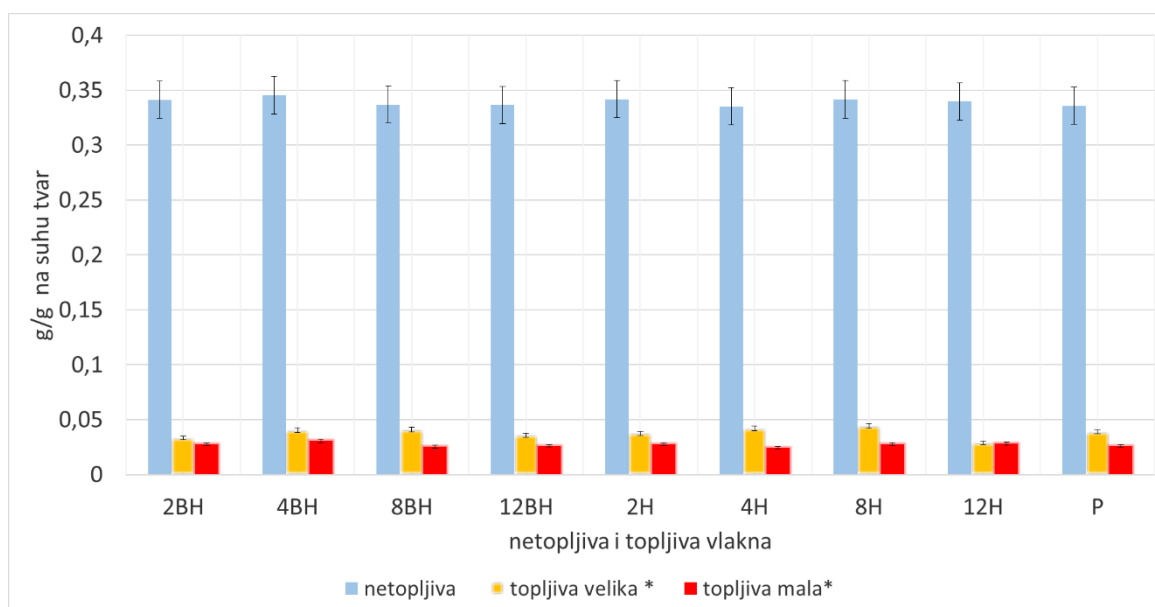
Iskorištavanje pogače uljane repice ponekad je ograničena zbog relativno visoke razine vlakana u usporedbi s pogačom soje, što smanjuje raspoloživi sadržaj energije u obroku. Za razliku od drugih uljarica, sjemenke repice se ne ljušte prije ekstrakcije ulja. Kako je visok udio vlakana sadržan u vanjskom čvrstom sloju sjemena, udio vlakana u njenog pogači obično je znatno veći nego u pogači soje (Matthäus, 1998).

Netopljiva vlakna čine glavne komponente stanične stijenke, uključujući celulozu, hemicelulozu, lignin, netopljivi pepeo (silicijev dioksid) i kutin (Van Soest, 1992).

Dok se topljiva vlakna dijele na ona veće i manje molekulske mase, otapaju se tijekom procesa probave tvoreći viskoznu masu nalik na gel. Podložna su fermentaciji u debelom crijevu pri

čemu nastaju kratkolančane masne kiseline koje organizam koristi kao energetski materijal. Njihovo fiziološko djelovanje očituje se u smanjenju koncentracije kolesterola, triglicerida i glukoze u krvi tj. usporavaju resorpciju glukoze iz tankog crijeva, te im se zbog toga prepisuje zaštitno djelovanje na kardiovaskularne bolesti i dijabetes (Shehzad i sur.,2017).

Dokazano je kako ljuštenjem repice, a posljedično redukcijom neprobavljivih vlakana iz pogače uljane repice dolazi do povećanja probavljivosti jer su oni upravo limitirajući faktor upotrebe pogače kod većine životinja (Leslie 1973; Jones i Sibbald 1979; Sarwar i sur. 1981.)



Slika 6. Udjel netopljivih i topljivih prehranbenih vlakana u odmašćenim kontrolnoj (netretiranoj hlađenjem) i tretiranoj pogači. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija. Opis uzoraka prikazan je u Tablici 8.

* razlika u vremenu mljevenja je imala utjecaja kao i međusobna interakcija vremena i mljevenja

Utjecaj kriomljevenja, vrijeme trajanja procesa kao i njihova međusobna interakcija nisu imali statistički značajni učinak ($p \leq 0,05$) na ukupnu količinu netopljivih (IDF) vlakana pogače.

Udio topljivih vlakana velike molekulske mase (SDFP) u tretiranom uzorku pogače uljane repice za razliku od kontrolnog uzorka se promijenio. Mljevenjem kugličnim mlinom do 8 minuta došlo je do povećanja udjela topljivih vlakna u uzrocima i sa i bez upotrebe kriogenog hlađenja. Suprotno tome, u 12 – toj minuti došlo je do smanjenja njihovog udjela. ANOVA-om je utvrđeno da su te promjene uistinu statistički značajne ($p \leq 0,05$). Utvrđeno je kako različiti vremenski intervali tretiranja pogače imaju različiti utjecaj na topljiva vlakna velike molekulske

mase. Moguće objašnjenje te pojave bi bilo kako je do 8 minute tretmana kuglični mlin djelovao na način da mljevenjem oslobađa topljiva vlakna i kako ona kao takva ostaju stabilna u frakciji i možemo ih dokazati, dok suprotno tome tretman od 12 minuta djelovanjem mehaničkih sila dolazi do oslobađanja ali i degradiranja strukture vlakna na jednostavnije ugljikohidrate koji nisu u mogućnosti dati pozitivan odziv i biti detektirani.

Postupak mikronizacije također je značajno ($p \leq 0,05$) utjecao na udio topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS), određen HPLC-om, povećanjem vremena mljevenja kao i upotrebom kriogenog hlađenja kao i njihovom međudobnom interakcijom. Najveća razlika od koncentracije SDFS u kontrolnom uzorku pokazala se u uzorku tretiranom 4 minute bez hlađenja (BH) (18,4 % povećanje) i uzorku tretiranom 12 minuta sa hlađenjem (H) (8,8 % povećanje). Razlog ovakve promjene možemo pripisati tome kako je pri djelovanju mehaničkih sila došlo do pucanja stanične stijenke te su se oslobodila navedena vlakna koja su bila detektirana kao topljiva vlakna male molekulske mase HPLC-om. Uzorak tretiran 4 minute BH je pokazao najveći udio detektiranih SDFS što možemo objasniti da je upravo pri tom vremenskom intervalu i bez upotrebe kriogenog hlađenja došlo do najznačajnije promjene matične strukture i veličine vlakana koje su zatim detektirane HPLC-om. Manje povećanje je detektirano kod uzoraka mljevenim 2 i 12 minuta BH i uzorcima tretiranim 2 i 8 minuta sa H. Povećanjem koncentracije prehrambenih vlakana u probavi dolazi do smanjenja apsorpcije ulja i zadržavanja vode, što se pokazalo korisnim tijekom implementacije vlakana u različitim konvencionalnim namirnicama (Tosh i Yada, 2010). Dodatak mikroniziranih posija u krušno tijesto rezultira povećanjem udjela slobodnih amino kiselina, ukupnih fenola i vlakana, kao i fitaze i antioksidacijske aktivnosti (Rizzello i sur., 2012).

Pretpostavka je bila kako će doći do izmjene udjela netopljivih i topljivih vlakana, čime bi se povećao omjer topljivih vlakana, što blagotvorno utječe na zdravlje crijeva kao što je dokazano u istraživanju Shehzad i suradnika (2017). Razlog tome je smanjenje udjela IDF koje je nastupilo nakon mljevenja i razgradnje celuloze, hemiceluloze i lignina, koji su prešli u topljivu frakciju (Ye, 2016). Slični ishod je bio s frakcijama dijetalnih vlakana od citrusa i mrkve (Chau i sur., 2007; Ye, 2016). Također, u istraživanju Mondragón-a i suradnika (2003) udio topljivih naprema netopljivim vlaknima se povećao te se u rezultatima očitao i veći antioksidacijski potencijal.

U ovom istraživanju je pokazano da, kriomljevenje sa/bez hlađenja ima utjecaj na omjere i količinu topljivih vlakana te topljivih vlakana male molekulske mase. Kriomljevenje ne utječe samo na općenito smanjenje čestica, već i na duboke strukturne modifikacije vlakana. Pokazalo se u prethodno spomenutoj literaturi da se udio topljivih vlakana različitih sirovina povećao na

osnovu smanjenja netopljivih vlakana, što nije slučaj u ovom istraživanju. U ovom se istraživanju pokazalo kako u pogači uljane repice ne dolazi do smanjenja udjela netopljivih vlakana, ali dolazi do većeg oslobađanja topljivih vlakana upotrebom krio mljevenja.

Utjecaj kriomljevenja na vlakna pogače uljane repice nisu još dovojno istražena, ali ovaj rad daje uvid u promjenu fizikalno-kemijske strukture koje mogu biti početak nekog daljnjeg istraživanja u prehrambenoj industriji u svrhu obogaćivanja pogače povećanjem udjela topljivih vlakana koje imaju blagotvorni učinak na organizam.

Također treba napomenuti kako sastav nusprodukata varira ovisno o sorti, uvjetima uzgoja, sastavu sjemena te zaostatku ulja i ugljikohidrata u pogači (Bell, 1993; Spragg i Mailer, 2007; Newkirk, 2009) pa bi ovakva istraživanja trebalo provesti i na drugim kultivarima uljane repice.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja utjecaja kriomljevenja, bez primjene i uz primjenu kriogenog hlađenja u različitim vremenskim intervalima, na raspodjelu veličine čestice, sadržaj ukupnih sterola i udio prehrambenih vlakana pogače uljane repice može se zaključiti sljedeće:

- 1) Mljevenje pogače uljane repice na kugličnom mlinu uz hlađenje uzrokuje veće i brže smanjenje veličine čestica te uniformniju raspodjelu čestica od mljevenja pri sobnoj temperaturi.
- 2) Najzastupljeniji fitosterol u svim uzorcima uljne frakcije izdvojene iz pogače je β -sitosterol, sljede ga po zastupljenosti kampesterol i za repičino ulje svojstven brasikasterol. Rezultati analize udjela fitosterola u nepolarnoj frakciji pogače uljane repice podudaraju se s zahtjevima iz Pravilnika (2012).
- 3) Tretiranje pogače uljane repice mljevenjem sa ili bez hlađenja u različitim vremenskim intervalima ima statistički značajan utjecaj na povećanje udjela kampestanola, stigmasterola, β -sitosterola i Δ -5,24-stigmastadienola u odnosu na kontrolni uzorak pogače, dok za ostale sterole nije utvrđena ovisnost njihovog udjela o vremenu i načinu mljevenja.
- 4) Mljevenjem pogače na kugličnom mlinu kroz 12 minuta uz kriogeno hlađenje dolazi do povećanja koncentracije ukupnih sterola u pogači uljane repice, tj. do povećanje njihove biodostupnosti.
- 5) Većinu ukupnih vlakana pogače uljane repice čine netopljiva vlakna na čiji udio nije utjecalo ni vrijeme ni način mjevenja pogače.
- 6) Primjenom mljevenja sa i bez hlađenja pri 8 minuta dolazi do značajnog povećanja udjela topljivih vlakana velike i male molekulske mase. Suprotno tome, udio topljivih vlakana velike molekulske mase se smanjuje primjenom mljevenja od 12 minuta, što se može pripisati njihovoj razgradnji dužim mehaničkim djelovanjem. Posljedično, udio topljivih vlakana male molekulse mase se povećao mljevenjem uz kriogeno hlađenje .

6. LITERATURA

- Abbadi, A., Leckband, G. (2011) Rapeseed breeding for oil content, quality, and sustainability. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1198–1206.
- 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.
- Ackman, R.G. (1983) Chemical composition of rapeseed oil, in High and Low Erucic Acid Rapeseed Oils, (Kramer, J.K.G, Sauer, F., D., Pigden W., J., ured.), Academic Press, New York, 85-129.
- 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.
- Alii, L, Houde, R. (1986) Characterization of phytate in canola. Research on Caoola Seed, Oil, Meal and Meal Fractions, Canola Council of Canada, Winnipeg, str. 159-165.
- Amarowics, R., Raab, B., Shahidi, F. (2003) Antioxidant activity of phenolic fractions of rapeseed. *J. Food Lipids.* **10**, 51–62.
- Anderson, R.J. (1914) A contribution to the chemistry of phytin: I. Composition of barium phytate and phytic acid. Ii. A study of the properties of phytic acid and its decomposition products. Eighth paper on phytin. *J. Biol. Chem.* **17**, 171-190.
- Angerosa, F., Campestre, C., Giansante L. (2006) Analysis and Authentication. U: Olive oil Chemistry and technology, 2. izd., (Boskou D., ured.), Champain: AOCS Press, str. 113-172.
- Aparicio, R., Aparicio-Ruíz, R. (2000) Authentication of vegetable oils by Chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* **881**, 93-104.
- 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**, 2137-2,142.
- Azadmard-Damirchi, S., Habibi-Nodeh, F., Hesari, J., Nemati, M., Achachlouei, B.F. (2010) Effect of pretreatment with microwaves on oxidative stability and nutraceuticals content of oil from rapeseed. *Food Chem.* **121**, 1211-1215.

- Bajoub, A., Carrasco-Pancorbo, A.O., Nouredine, Fernández-Gutiérrez, A. (2014) UHPLC–MS in Virgin Olive Oil Analysis, *J. Agric. Food Chem.* **52**, 213-235.
- Barthet, V.J., Daun, J.K. (2011) Seed morphology, composition, and quality. U: *Canola: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, (Daun, J., K., Eskin, N., A., Hickling H., ured.), AOCS Press, Urbana, str. 135-145.
- Belitz, H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2004) *Food Chemistry*, 3. izd., Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York, 640-669.
- Bell, J. (1993) Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. *Can. J. Anim. Sci.* **73**, 689-697.
- Benković, M. (2013) Fizikalno-kemijska i senzorska svojstva obogaćenih praškastih mješavina na bazi kave, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Benković, M., Srećec, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Bauman, I. (2013) Flow properties of commonly used food powders and their mixtures. *Food Bioprocess Tech.* **6**, 2525 - 2537.
- Bille, N., Eggum, B.O., Jacobsen, I., Olsen, O., Srorensen, H. (1983) The effects of processing on antinutritional rape constituents and the nutritive value of double low rapeseed meal. *Z. Tierphysiol. Tierernihrg. Futtermittelkunde* **40**, 148-163.
- Campbell, L., Rempel, C., Wanasundara, J. (2016) Canola/Rapeseed Protein: Future Opportunities and Directions—Workshop Proceedings of IRC 2015. *Plants*, **5**, 17.
- Chau, C.F., Wen, Y.L. Wang, Y.T. (2006). Improvement of the functionality of a potential fruit insoluble fibre by micron technology. *Int. J. Food Sci. Tech.* **41**, 1054–1060.
- Clandinin, D. (1961). Effect of sinapine, the bitter substance in rapeseed oil meal on the growth of chickens. *Poultry Sci.* **40**, 484-487.
- Darlington, G., La Cour, L. (1945) Chromosome breakage and the nucleic acid cycle. *J. Gener.* **46**, 180-267.
- Das, S., Tyagi, A.K. (2000) Cancer modulation by glucosinolates: A review. *Curr. Sci. India*, **79**, 1665-1671.

Daun, J.K., Eskin, N.A., Hickling, D. (2011) Canola- Chemistry, Production, Processing and Utilization. AOCS Press, Urbana, str. 119-162.

DeVries, J.W. (2003) On defining dietary fibre. *P. Nutr. Soc.* **62**, 37-43.

Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., Patil, R.T. (2012) Dietary fibre in foods: a review. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 255-266.

Direktiva (EU) 2015/412 Europskog parlamenta i Vijeća od 11. ožujka 2015. o izmjeni Direktive 2001/18/EZ u pogledu mogućnosti država članica da ograniče ili zabrane uzgoj genetski modificiranih organizama (GMO-a) na svojem državnom području.

Dziedzic, K., Górecka, D., Kucharska, M., Przybylska, B. (2012) Influence of technological process during buckwheat groats production on dietary fibre content and sorption of bile acids. *Food Res. Int.* **47**, 279-283.

EFSA (2008) Glucosinolates as undesirable substances in animal feed, Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* **590**, 1-76.

Ellegard, L., Andersson, H., Bosaeus, I. (2005) Rapeseed oil, olive oil, plant sterols, and cholesterol metabolism: an ileostomy study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **59**, 1374-8.

FAOSTAT (2017) Food and Agriculture Organization of United Nations, <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD>>. Pristupljeno 12. listopada 2018.

Feedipedia (2012) Rapeseed meal, <<https://www.feedipedia.org/node/52>>. Pristupljeno 14. listopada 2018.

Feng, D. (2003) Compound Feed Science. China Agricultural Press, Peking, str. 78-80.

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

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

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

Heggen, E., Granlund L., Pedersen, J.I., Holme, I., Ceglarek, U., Thiery, J., Kirkhus, B., Tonstad, S. (2010) Plant sterols from rapeseed and tall oils: Effects on lipids, fat-soluble vitamins and plant sterol concentrations. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **20**, 258-265.

Hemery, Y, Chaurand, M, Holopainen, U, Lampi, AM, Lehtinen, P, Piironen, V, Sadoudi, A, Xavier, R. (2011) Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part I: Influence of ultra-fine grinding. *J. Cereal Sci.* **53**, 1–8.

Hemery, Y., Mabilbe, F., Martelli, M.R., Rouau, X. (2010) Influence of water content and negative temperatures on the mechanical properties of wheat bran and its constitutive layers. *J. Food Eng.* **98**, 360-369.

HRN EN ISO 12228:2004, Životinjske i biljne masti i ulja -- Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola -- Metoda plinske kromatografije (osnovna referentna metoda).

HRN EN ISO 20483:2014 Žitarice i mahunarke -- Određivanje sadržaja dušika i proračun sadržaja sirovih proteina -- Prema Kjeldahl metodi.

HRN EN ISO 2171:2010 Žitarice -- Određivanje ukupnog pepela spaljivanjem.

HRN EN ISO 660:2010 Životinjske i biljne masti i ulja -- Određivanje kiselinskog broja i kiselosti .

Jones, J.D., Sibbald, I.R. (1979) The true metabolizable energy values for poultry of fractions of rapeseed (*Brassica napus* cv. Tower). *Poultry Sci.* **58**, 385-391.

Junghare, H., Hamjade, M., Patil, C.K., Girase, S.B., Lele M.M. (2017) A review on Cryogenic Grinding, *Int. J. Current Eng. Technol. Special Issue-7*, 1-4.

Kamal-Eldin, A. (2005) Minor Components of Fats and Oils. U: Bailey's industrial oil and fat products, 6. izd. (Shahidi F. ured.), John Wiley & Sons, Hoboken, str. 319-359.

Kamal-Eldin, A., Määtä, K., Toivo, J., Lampi, A.M., Piironen, V. (1998) Acid-catalyzed isomerization of fucosterol and Δ^5 -avenasterol, *Lipids* **33**, 1073-1077.

Katalenić, M. (2007) Masti i ulja u prehrani. *Hrana i zdravlje, Hrvatski časopis za javno zdravstvo* **3**, 1-5.

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

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

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

Latte, K.P., Appel, K., Lampen, A. (2011) Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 3287–3309.

Leslie, A.J., Summers, J.D., Jones, J.D. (1973) Nutritive value of air-classified rapeseed fractions. *Can. J. Animal Sci.* **53**, 153-156.

Liukkonen, K., H., Katina, K., Wilhelmsson, A., Myllymaki, O., Lampi, A.-M., Kariluoto, S., Pironen, V., Heinonen, S.M., Nurmi, T., Adiercreutz, H., Peltoketo, A., Pihlava, J.M., Hietaniemi, V., Poutanen, K. (2003) Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 117–122.

Lopez, H.W., Leenhardt, F., Coudray, C., Remesy, C. (2002) Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **37**, 727-739.

Mag, T (1990) Further processing of canola and rapeseed oils. U: *Canola and Rapeseed. Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology*, (Shahidi, F., ured.), Van Nostrand Reinhold, New York, str. 251 – 276.

Malabat, C., Atterby, H., Chaudhry, Q., Renard, M, Guéguen, J. (2003) Genetic variability of rapeseed protein composition. Proceedings of the 11. International Rapeseed Congress. Toward

Enhanced Value of Cruciferous Oilseed Crops by Optimal Production and Use of the High Quality Seed Components, Copenhagen, str. 205–208.

Malcolmson, L., Vaisey-Genser, M., Walker, B. (1978) Some textural and flavour characteristics of canola/rapeseed. Proceedings 5th International Rapeseed Congress, Malmo, str. 47-152.

Malvern Instruments Ltd. (2015). A basic guide to particle characterization. <https://www.cif.iastate.edu/sites/default/files/uploads/Other_Inst/Particle%20Size/Particle%20Characterization%20Guide.pdf>. Pristupljeno 16. listopada 2018.

Mandić, M., Nosić, M. (2009) Funkcionalna svojstva prehrambenih vlakana. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.

Marjanović-Jeromela, A., Terzić, S., Zorić, M., Marinković, R., Atlagić, J., Mitrović, P., Milovac, T. (2011) Ocena stabilnosti prinosa semena i ulja NS sorti uljane repice (*Brassica napus* L.). *Ratar. Povrt/Field Veg. Crop Res.* **48**, 67-76.

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, str. 317-329.

Megazyme (2017) <<https://secure.megazyme.com/Total-Dietary-Fiber-Assay-Kit>>. Pristupljeno 8. studeni 2018.

Mohamad, R., Maruyama, N., Adachi, M., Bontani, N., Saka, S., Kato, N., Ohkawa, Y., Utsumi, S. (2002) Comparison of Protein Chemical and Physicochemical Properties of Rapeseed Cruciferin with Those of Soybean Glycinin. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 7380-7385.

Mondragón, R., Juliá, J.E., Barba, A., Jarque, J.C. (2013). Influence of the particle size on the microstructure and mechanical properties of grains containing mixtures of nanoparticles and microparticles: Levitator tests and pilot-scaled validation. *J. Eur. Ceram. Soc.* **33**, 1271–1280.

Mudgil, D., Barak, S. (2013) Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fibre: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **61**, 1-6.

Mustapić, Z., Vratarić, M., Rajčić, L. (1984) Proizvodnja i prerada uljane repice, Zadrugar, Sarajevo, str. 5-45.

Naczk, M., 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., str. 207.

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

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

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. (Newkirk, R., ured.) Canadian International Grains Institute, Winnipeg str. 5-48.

NHLBI (2011) National Heart Lung and Blood Institute, <<https://www.nhlbi.nih.gov/>>. Pristupljeno 15. listopada 2018.

Novotni, D., Ćurić, D., Galić, K., Škevin, D., Neđeral, S., Kraljić, K., Gabrić, D., Ježek, D. (2011) Influence of frozen storage and packaging on oxidative stability and texture of bread produced by different processes. *Food Sci. Technol-LWT.* **44**, 643-649.

Nyström, L., Nurmi, T., Lampi, A.M., Piironen, V. (2009) Healthgrain, Methods Analysis of Bioactive Components in Small Grain Cereals, U: Sterols (Peter, R., Shewry, J., Ward, L., ured.), American Associate of Cereal Chemists International, Elsevier, Helsinki, str. 7-14.

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

Oštrić – Matijašević, B., Turkulov, J. (1980) Tehnologija ulja i masti, I dio, Tehnološki fakultet Univerziteta Novi Sad, Durieux, str. 78-79, 149-157, 171-205, 229-238.

- 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.
- Pine, S.H. (1994) *Organska kemija*, 3. promij. izd. (preveli Bregovec, I., Rapić, V.) Školska knjiga, Zagreb, str. 873-876.
- Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) *Narodne novine* **22**, Zagreb.
- Prior, E.M., Vadke, V.S., Sosulski, F.W. (1991) Effect of Heat Treatments on Canola Press Oils. I. Non-Triglyceride Components. *J. Am. Oil Chem.Soc.* **68**, 401-406.
- Przybylski, R., Meg, T., Eskin, N.A.M., McDonald, B.E. (2005) *Canola Oil. U: Bailey`s Industrial Oil and Fat Products*, 6. izd., (Shahidi, F., ured.), John Wiley & Sons, Publication, Hoboken, New Jersey, str. 61-121.
- 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, str. 448-461.
- Rade, D., Mokrovčak, Ž., Štrucelj, D. (2001) *Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida*, Durieux, Zagreb, str. 23-27, 46-47.
- Retch, milling sieving assisting (2018) <<https://www.retsch.com/products/milling/ball-mills/mixer-mill-cryomill/function-features/>> Pristupljeno 15. listopada 2018.
- Retsch GmbH (2017a) *The Art of Milling*. Preuzeto s <<http://online.fliphtml5.com/uebb/ftup/#p=14>> Pristupljeno 15. listopada 2018.
- Retsch GmbH (2017b) *CryoMill Manual: Cryogenic Mixer Mill CryoMill*.
- 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.
- Rizzello C.G., Coda, R., Mazzacane, F., Minervini D, Gobbetti, M. (2012). Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced the nutritional, textural and sensory features of bread. *Food Res. Int.* **46**, 304–313.

- Saldeen, K., Saldeen, T. (2005) Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutr. Res.* **25**, 877-889.
- Sang J.P., Minchinton, I.R., Johnstone P.K., Truscott R.J.W. (1984) Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Can. J. Plant Sci.* **64**, 77-93.
- Sarwar, G., Bell, J.M., Sharby, T.F., Jones, J.D. (1981) Nutritional evaluation of meals and meal fractions derived from rape and mustard seed. *Can. J. Animal Sci.* **61**, 719-733.
- Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., Lampi, A.M. (2008) Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 152-161.
- 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.
- Shehzad, H., Jie, J., Wenjun, J., Shoulei, Y., Qingzhang, W. (2017). Effect of micronisation on dietary fibre content and hydration properties of lotus node powder fractions. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **53**, 590-598.
- Singh, K.K., Goswami, T.K. (1999) Design of a cryogenic grinding system for spices. *J. Food Eng.* **39**, 359 - 368.
- 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 11. listopada 2018.
- Swern, D. (1972) Bailey`s industrial oil and fat products, 1. izd, (Shahidi, F., ured.), John Wiley and Sons, New York, str. 9 -13, 170 –173, 185-216.
- Tan, S., Mailer, R.J., Blanchard, C.L., Agboola, S.O. (2011) Canola Proteins for Human Consumption: Extraction, Profile, and Functional Properties. *J. Food Sci.* **76**, 16- 28.
- Thiyam, U., Kuhlmann, A., Stöckmann, H., Schwarz, K. (2004) Prospects of rapeseed oil by-products with respect to antioxidative potential. *C.R. Chim.* **7**, 611-616.

- Tosh, S.M., Yada, S. (2010). Dietary fibres in pulse seeds and fractions: characterization, functional attributes, and applications. *Food Res. Int.* **43**, 450–460.
- Van Hoed, V., Ali, C.B., Slah, M., Verhé, R. (2010) Quality differences between pre-pressed and solvent extracted rapeseed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 1241-1247.
- Vaughn, S.F., Berhow, M.A. (2005) Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Ind. Crops Prod.* **21**, 193-202.
- Vlahakis, C., Hazebroek, J. (2000) Phytosterol Accumulation in Canola, Sunflower, and Soybean Oils: Effects of Genetics, Planting Location, and Temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**, 49-53.
- Von Der Haar, D., Müller, K., Bader-Mittermaier, S., Eisner, P. (2014). Rapeseed proteins- Production methods and possible application ranges. *Oilseed. Fat. Croop. Lipid.* **21**, 1-8.
- Wanasundara, J.P.D., Abeysekara, S.J., McIntosh, T.C., Falk, K.C. (2011). Solubility Differences of Major Storage Proteins of Brassicaceae Oilseeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **89**, 869-881.
- 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.
- Wolinetz, M., Hein, M. (2017) Biofuels in Canada 2017, Tracking biofuel consumption, feedstocks and avoided greenhouse gas emissions. *Navius Research Inc.* **15**, 22.
- Wronka, M., Lewak, S., Tykarska, T., Kuras, M., Zobel, A. (1994) Localisation of phenolic compounds in the root cap columella of six-year old seeds of *Brassica napus* during inhibition and germination. *Ann. Bot.* **74**, 321-326.
- Xu, L., Diosady, L. (2003) Fats and oils from plant materials. U: Extraction optimization in food engineerin, (Tzia, C., Liadakis, G., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str.181-211.
- Ye, F., Tao, B., Liu, J., Zou, Y., Zhao, G. (2016) Effect of micronization on the physicochemical properties of insoluble dietary fiber from citrus (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) pomace. *Int. J. Food Sci. Tech.* **22**, 246–255.

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.

Karla Mamilović

Karla Mamilović