

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2018.

Matea Habuš
918/PI

**UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA
VELIČINU ČESTICA I
BIOAKTIVNE SPOJEVE POSIJA
PROSA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Nikoline Čukelj Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad izrađen je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost: Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (IP-2016-06-3).

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nikolini Čukelj koja je svojim znanstvenim i stručnim savjetima oblikovala ideju i pomogla pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem joj se na izrazitoj susretljivosti, nesebičnoj pomoći, te uloženom trudu i vremenu. Također se zahvaljujem Lidiji Drobac, univ. bacc. ing. na pomoći i pristupačnosti prilikom eksperimentalne izvedbe.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci, strpljenju i bezuvjetnoj ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju žitarica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA VELIČINU ČESTICA I BIOAKTIVNE SPOJEVE POSIJA PROSA

Matea Habuš, 918/PI

Sažetak: U ovom radu ispitan je utjecaj vremena i načina mljevenja na raspodjelu veličine čestica, sadržaj ukupnih polifenola, kao i slobodne antioksidanse posija prosa. Mljevenje je provedeno u kugličnom mlinu bez i uz kriogeno hlađenje, odnosno primjenu tekućeg dušika (N_2). Posije prosa mljevene su 2, 4, 8 i 12 minuta, uz frekvenciju od 30 Hz. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva određen je Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijska aktivnost ABTS, DPPH i FRAP metodama. Rezultati pokazuju kako oba načina mljevenja dovode do smanjenja veličine čestica, međutim niti vrijeme niti način mljevenja nisu utjecali na količinu slobodnih ukupnih fenolnih spojeva, kao niti DPPH antioksidacijsku aktivnost. U slučaju ABTS i FRAP metoda, najviša antioksidacijska aktivnost izmjerena je u uzorcima mljevenima uz kriogeno hlađenje 4 minute, ali su te vrijednosti usporedive s uzorcima mljevenima 4 minute bez kriogenog hlađenja. U slučaju FRAP metode, ako nije primjenjeno kriogeno hlađenje, antioksidacijska aktivnost je dodatno rasla s vremenom mljevenja.

Ključne riječi: posije, proso, kriomljevenje, polifenoli, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 60 stranica, 16 slika, 7 tablica, 123 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Nikolina Čukelj, doc.dr.sc.

Pomoć pri izradi: Lidija Drobac, univ. bacc. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Duška Ćurić*
2. Doc. dr. sc. *Nikolina Čukelj*
3. Doc. dr. sc. *Maja Benković*
4. Doc. dr. sc. *Natka Ćurko* (zamjena)

Datum obrane: 19. lipnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Cereal Chemistry and Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE INFLUENCE OF CRYOMILLING ON THE PARTICLE SIZE AND THE BIOACTIVE COMPOUNDS OF THE MILLET BRAN

Matea Habuš, 918/PI

Abstract: *This study explored the effect of time and grinding conditions on the particle size distribution, content of the total polyphenols, as well as the free antioxidants of the millet bran. The milling was conducted in a ball mill without and with cryogenic cooling, i.e. the application of liquid nitrogen (N₂). Millet bran was milled for 2, 4, 8 and 12 minutes at a frequency of 30 Hz. The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalte method and antioxidant activity by ABTS, DPPH and FRAP methods. The results show that both grinding modes reduced particle size, however, neither time nor grinding mode influenced the amount of free total phenolic compounds or DPPH antioxidant activity. In the case of ABTS and FRAP methods, the highest antioxidant activity was measured in samples milled with cryogenic cooling for 4 minutes but these values were comparable to samples milled for 4 minutes without cryogenic cooling.*

Keywords: bran, millet, cryomilling, polyphenols, antioxidant capacity

Thesis contains: 60 pages, 16 figures, 7 tables, 123 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Nikolina Čukelj, Assistant Professor

Technical support and assistance: Lidija Drobac, univ. bacc. ing.

Reviewers:

1. PhD. *Duška Ćurić*, Full professor
2. PhD. *Nikolina Čukelj*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
4. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: June 19, 2018.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Posije	3
2.1.1. Kemijski sastav	4
2.1.2. Bioaktivni profil posija.....	4
2.2. Proso.....	5
2.2.1. Kemijski sastav <i>Panicum miliaceum</i> L.	6
2.2.2. Primjena u prehrambenoj industriji.....	8
2.2.3. Pozitivni učinci na zdravlje.....	8
2.3. Polifenolni spojevi prosa.....	9
2.3.1. Antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva.....	10
2.3.2. Polifenolni spojevi prosa.....	11
2.4. Mljevenje.....	12
2.4.1. Mljevenje primjenom kriogenog hlađenja.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Uzorci	15
3.1.2. Priprema uzoraka.....	15
3.1.2.1. Mljevenje.....	15
3.2. Metode rada.....	16
3.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica.....	16
3.2.2. Određivanje udjela vode.....	16
3.2.3. Određivanje udjela netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana	18
3.2.3.1. Određivanje netopljivih prehrambenih vlakana.....	19
3.2.3.2. <i>Određivanje topljivih prehrambenih vlakana</i>	20
3.2.4. Određivanje količine pepela	21
3.2.5. Određivanje sadržaja dušika (proteina) pod Kjeldahl-u	22
3.2.6. Ekstrakcija.....	24
3.2.6.1. <i>Ekstrakcija slobodnih spojeva</i>	24
3.2.6.2. <i>Ekstrakcija konjugiranih spojeva</i>	25
3.2.6.3. <i>Ekstrakcija vezanih spojeva</i>	25
3.2.7. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola.....	26
3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta.....	27
3.2.8.1. <i>FRAP metoda</i>	28
3.2.8.2. <i>ABTS metoda</i>	30
3.2.8.3. <i>DPPH metoda</i>	32
3.2.9. Statistička obrada podataka.....	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. Vlakna i profil bioaktivnih komponenti u korištenim posijama prosa	35
4.2. Utjecaj mljevenja na raspodjelu veličine čestica posija prosa.....	36
4.3. Udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost u mljevenim posijama prosa.....	39
4.4. Faktorska analiza varijance.....	42
5. ZAKLJUČCI	47
6. LITERATURA	49

1. UVOD

Danas su polifenolni spojevi najčešći predmet znanstvenih ispitivanja zbog svojih bioaktivnih svojstava i povoljnih zdravstvenih učinaka (Sharma i Singh, 2010). Dosadašnja istraživanja sugeriraju da visok unos samih polifenola pruža adekvatnu zaštitu od širokog raspona bolesti, poput kardiovaskularnih bolesti, te im se pripisuje snažno antikancerogeno i antioksidativno djelovanje (Hu, 2011).

Kao dobar izvor polifenola, ali i ostalih bioaktivnih spojeva nameću se posije (Patel, 2012), nusproizvodi mljevenja žitarica. Tijekom samog postupka mljevenja u sastav posija ulaze slijedeći dijelovi zrna žitarica: perikarp, omotač sjemena, aleuronski sloj i klica. Upravo su u aleuronskom sloju koncentrirane najzastupljenije fenolne kiseline žitarica - ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2007). Visok udio bioaktivnih komponenti posijama daje mogućnost primjene u proizvodnji funkcionalnih proizvoda od žitarica i novih sastojaka (Katina i sur., 2012). Posije žitarica bogate su i prehranbenim vlaknima, mineralima te vitaminima (najviše B i E) (Patel, 2012).

U svijetu se uz posije pšenice, riže i kukuruza najviše konzumiraju i posije prosa (Gani i sur., 2012), relativno jeftine i nutritivno važne vrste žitarica. Proso je bogato prehranbenim vlaknima, polifenolnim spojevima, vitaminima, esencijalnim aminokiselinama i mineralima, a u odnosu na ostale žitarice sadrži veći udio masti (Léder, 2004; Ragaee i sur., 2006). Konzumacija ove žitarice pokazuje povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje čime proso ima potencijal biti funkcionalna hrana. Dodatno, ne sadrži gluten pa se može primjeniti u prehrani osoba oboljelih od celijakije (Chandrasekara i Shadidi, 2010; Sanderson i sur., 2017).

Mljevenje uz primjenu kriogenog hlađenja je postupak mljevenja čiji je utjecaj na sama zrna žitarica dosada slabo istražen. Ovim postupkom mljevenja tretirani materijali smrzavaju se u tekućem dušiku na temperaturama do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Singh i Goswami, 1999). Primjena kriogenog hlađenja dovodi do lakše fragmentacije čestica i pruža mogućnost očuvanja termolabilnih spojeva. Pri niskim temperaturama smanjuje se mehanička energija potrebna za njihovo usitnjavanje, a smanjenjem veličine čestica posija povećava se bioraspoloživost bioaktivnih spojeva prosa u probavnom sustavu (Hemery i sur., 2010).

Stoga je cilj ovoga rada istražiti utjecaj tretmana mljevenja bez primjene i uz primjenu kriogenog hlađenja na raspodjelu veličine čestice posija prosa, sadržaj ukupnih polifenola, kao i slobodne bioaktivne spojeve i antioksidanse posija prosa. Postupak mljevenja će se provoditi u kugličnom mlinu bez primjene tekućeg dušika (N_2), te uz njegovu primjenu, odnosno uz

smrzavanje na temperaturi od -196°C , a vrijeme tretmana bit će 2, 4, 8 i 12 minuta, uz vibracijsku frekvenciju od 30 Hz (1800 min^{-1}). Raspodjela veličine čestica odredit će se metodom laserske difrakcije na instrumentu Malvern Mastersizer 2000. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) odredit će se Folin-Ciocalteu metodom, dok će se za određivanje antioksidacijske aktivnosti koristiti ABTS, DPPH i FRAP metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POSIJE

Posije odnosno mekinje predstavljaju nusproizvode mljevenja zrna žitarica. Same žitarice su jednogodišnje biljke iz porodice trava koje karakteriziraju stabljika i klas na kojem se razvija plod, odnosno zrno građeno iz tri osnovna dijela - omotača (perikarp), endosperma koji čini najveći dio zrna (75-86 %) i klice (embrio). Od toga, posije čini:

- perikarp
- omotač sjemena (testa)
- aleuronski sloj smješten u endospermu
- klica (Lebesi i Tzia, 2012).

Sastav posija se razlikuje ovisno o varijetetu žitarica, veličini i obliku zrna, debljini perikarpa, trajanju i uvjetima skladištenja, metodama tretiranja žitarica prije mljevenja, te u konačnici i o samom postupku mljevenja (Zitterman, 2003).

Na iskorištenje i područje primjene posija utječu njihove fizikalne karakteristike. Važan parametar je svakako udio vlage koji se mora prilagoditi i kontrolirati tijekom cijelog perioda skladištenja žitarica. Osim na mikrobiološki sastav vlaga ima utjecaj i na oksidaciju masti u zrnu, zbog čega je potrebno inaktivirati enzime koji sudjeluju u njenim reakcijama. Inaktivacija se postiže mikrovalnim zagrijavanjem, ekstruzijom, zamrzavanjem, tretiranjem klorovodičnom kiselinom, octenom kiselinom ili kalcijevim hidroksidom (Sharma i sur., 2014). Također, važna fizikalna karakteristika posija je i veličina čestica. Ona je pokazatelj stupnja mljevenja i utječe na kemijski sastav, kao i tehnološka svojstva samih posija, jer se promjenom veličine čestica mijenjaju i njihova reološka te fizikalno-kemijska svojstva, sposobnost vezanja vode (bubrenje) i udio masti (Rosell i sur., 2009; Viuda-Martos i sur., 2010). Bitno je spomenuti i boju koja utječe na prihvatljivost posija kao gotovog proizvoda kod potrošača (Lebesi i Tzia, 2012).

U prehrambenoj industriji se fizikalno-kemijska svojstva posija (stupanj topljivosti, sposobnost vezanja vode, sposobnost stvaranja gela i različitih struktura) mogu iskoristiti u proizvodnji nove hrane (Foschia i sur., 2013). Primjenu pronalaze i kao stabilizatori emulzija, a ovisno o njihovom udjelu, veličini čestica i načinu na koji su tretirane, posije utječu na senzorska svojstva hrane (Chinma i sur., 2015). Zbog prisutnosti i sadržaja topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana, posijama se pripisuju brojni povoljni učinci (Elleuch i sur., 2011). Vlakna dovode do smanjenja glikemijskog indeksa, djeluju pozitivno na krvnu plazmu, smanjuju rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti, tip 2 dijabetesa ili karcinoma, te potiču rast

crijevne mikroflore i ubrzavaju metabolizam (Fung, 2002; Schatzkin i sur., 2007; Mellen i sur., 2009; Nagendra Prasad i sur., 2011; Foschia i sur., 2013).

2.1.1. Kemijski sastav

Kemijski sastav posija ovisi o vrsti i varijetetu žitarica, načinu obrade zrna te veličini čestica. Od svih posija, rižine sadrže najveći udio pepela i masti, a zobene proteina. S druge strane, rižine posije sadrže manji udio ugljikohidrata u odnosu na ostale žitarice dok kukuruz ima najveći postotak. Ovaj nusprodukt mljevenja kao izvor prehrambenih vlakana predstavlja glavni izvor lignina, celuloze i hemiceluloze (Elleuch i sur., 2011). Netopljivim vlaknima su bogate kukuruzne posije, a zobene topljivima poput β -glukana. β -glukan se povezuje sa smanjenjem razine kolesterola u krvi, a visoku koncentraciju osim zobenih, sadrže i ječmene posije. Rižine posije još su bogate i kalcijem, željezom, magnezijem, fosforom, kalijem i manganom, dok u kukuruznim dominira natrij, a u pšeničnim cink, bakar i selen. Najviše vitamina B i E nalazimo u rižinim posijama, a od masnih kiselina u svim posijama najzastupljenije su palmitinska, oleinska i linolna kiselina. Sastav posija prosa može se usporediti s drugim žitaricama, a udio glavnih komponenti posija prosa prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav posija prosa (Chinma i sur., 2015)

Sastav	Udio (%)
Ugljikohidrati	56
Proteini	11,5
Pepeo	10,5
Masti	8

2.1.2. Bioaktivni profil posija

Bioaktivne tvari su sastojci hrane koji imaju korisnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja i prevenciji bolesti, a u žitaricama se mogu naći fenolni spojevi (fenolne kiseline, flavonoidi, tanini, lignani i alkilresorcinoli), karotenoidi, beta-glukan, fitosteroli, fitati, betain i kolin. Najzastupljenije fenolne kiseline u žitaricama su ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina,

a koncentrirane su u aleuronskom sloju i perikarpu, odnosno posijama (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2007). Visok udio bioaktivnih komponenti posijama daje mogućnost primjene u proizvodnji funkcionalnih proizvoda od žitarica i novih sastojaka, te utjecaj na stabilizaciju masti, odnosno produljenje roka trajanja hrane bogate mastima (Katina i sur., 2012). Bioaktivni profil posija različitih vrsta žitarica prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Bioaktivni profil posija različitih vrsta žitarica

Vrsta žitarice	Bioaktivni spojevi	Referenca
Riža	Antocijani, flavonoidi, fitinska kiselina	Kaneda i sur. 2007; Jang i Xu 2009; Zhang i sur. 2010
Pšenica	Ferulinska kiselina, sinapinska kiselina, <i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, kumarinska kiselina,	Martinez-Tome i sur. 2004; Verma i sur. 2009; Wang i sur. 2010
Zob	Amino-benzojeva kiselina	Martinez-Tome i sur. 2004
Sirak	Antocijani, fenolne kiseline, flavonoidi i tanini	Awika i sur. 2004
Raž	Fenolne kiseline, lignani, folati	Nyström i sur., 2005; Katina i sur. 2007
Kukuruz	Ferulinska kiselina, <i>p</i> -kumarinska kiselina., konjugati poliamina, hidroksicimetne kiseline	Choi i sur. 2007
Proso*	Galna kiselina, vanilinska kiselina, siringična kiselina, klorogenska kiselina, sinapinska kiselina, ferulinska kiselina, kempferol, apigenin, miricetin	Chandrasekara i Shadidi, 2011

*Obično proso

2.2. PROSO

Proso je jedna od najstarijih žitarica koja se koristila za ljudsku prehranu (Singh i sur., 2012). Uzgaja se u toplim i sušnim područjima, a sezona rasta traje 60 – 100 dana (Ačko i sur., 2012; Habiyaremy i sur., 2017). Otporan je na štetnike i bolesti te vrlo produktivan u uvjetima suše u usporedbi s ostalim žitaricama. U svjetskoj poljoprivrednoj proizvodnji proso zauzima šesto mjesto (Devi i sur., 2011). Najviše ga se uzgaja u Africi i Aziji. Glavni svjetski proizvođač

je Indija s 334 500 tona godišnje, a slijede je Nigerija, Niger, Kina i Rusija (FAO, 2012). U mnogim afričkim i azijskim područjima proso služi kao glavni sastojak prehrane i dodatak raznim tradicionalnim oblicima hrane i pića (Chandrsekara i Shahidi, 2011; Chandrsekara i sur., 2012).

U svijetu se razlikuje dvadeset različitih vrsta ove žitarice (Fuller, 2006), a najčešće se uzgajaju *Panicum miliaceum* L. (obično proso), *Pennisetum glaucum* L. (biserni proso), *Eleusine coracana* L. (prstasto proso), *Paspalum setaceum* L. (indijsko proso), *Setaria italica* L. (talijansko proso), *Panicum sumatrense* L. (sitno proso), te *Echinochloa utilis* L. (japansko proso) (Wen i sur., 2014). Kemijski sastav prosa čine ugljikohidrati (64,8 %), proteini (12,9 %), masti (3,8 %), vlakna (4,9 %) i minerali (2,4 %), a još sadrži različite fitokemikalije i antioksidanase. Od fitokemikalija to su polifenoli, lignani, β -glukan, inulin, rezistentni škrob, fitati, steroli, tokoferoli, prehrambena vlakna i karotenoidi, pri čemu najveći udio polifenola čine fenolne kiseline i tanini, a flavonoidi samo manji dio (Thilagavathi i sur., 2015).

2.2.1. Kemijski sastav *Panicum miliaceum* L.

Najčešće uzgajana vrsta prosa, običan proso (Slika 1), proizvodi se u Kini, Rusiji, Indiji te nekim državama istočne Europe i sjeverne Amerike. Iako se u SAD-u od žitarica najviše upotrebljavaju pšenica i kukuruz, posljednjih godina proso pronalazi sve veću upotrebu zbog svojeg sadržaja proteina, odnosno nutritivne vrijednosti slične onoj pšenice, kukuruza ili riže (Kalinová, 2007; Habiyaremye i sur., 2017).



Slika 1. *Panicum miliaceum*, običan proso (Kalinová, 2007)

Sadržaj proteina običnog prosa ovisi o uvjetima rasta. Tako sušni uvjeti uzrokuju porast sadržaja proteina, no dovode do smanjenja njihove kvalitete (Kalinová i Moudrý, 2006). U Tablici 3 prikazan je sastav običnog prosa.

Tablica 3. Kemijski sastav zrna običnog prosa (Kalinová i Moudrý, 2006; Kalinová, 2007)

Sastav	Udio (%)
Ugljikohidrati	64,5 – 81,4
Proteini	11,3 – 12,7
Masti	3,5 – 6,7
Vlakna*	0,8 – 1,2
Minerali	1,5 – 4,2
Polifenoli	0,05 – 0,1

*vrijednosti za oljušteno zrno običnog prosa

Obično proso sadrži najveći udio (oko 12 %) i najkvalitetnije proteine u usporedbi s ostalim vrstama (Kalinová i Moudrý, 2006; FAO, 1995). Na njihov sadržaj utječu vrsta i varijetet prosa, opskrbljenost zemlje vodom i potrebnim nutrijentima, te uvjeti tijekom rasta zrna (Kalinová i Moudrý, 2006). Sastav proteinskih frakcija čine albumini, globulini, prolamini (31 % - 50 %) i glutelini (13 % - 42 %). Zrno prosa bogat je izvor bitnih aminokiselina leucina, izoleucina i metionina, dok je udio lizina i treonina nizak (Ravindran, 1992; Dendy, 1995; Kalinová i Moudrý, 2006). Sadržaj lizina kreće se od 1,4 - 4,3 %, ali ga i dalje ima više nego u zrnu pšenice. Bitno je naglasiti kako proso ne sadrži gluten, zbog čega je prikladan za konzumaciju kod ljudi oboljelih od celijakije (Chandrasekara i Shahidi, 2010).

Škrob čini tri četvrtine zrna prosa, a veličina granula ulazi u raspon od 1,3 do 13,5 μm (Kumari i Thayumanavan, 1998). U žitaricama je građen od dviju glavnih komponenti: amiloze i amilopektina. Udio amiloze u prosu iznosi 17,21 % - 32,60 % i time nadmašuje sadržaj amiloze u kukuruzu. Škrob prosa pokazuje topljivost od 6,89 % pri 90 °C, a toplinskim tretmanom dolazi do bubrenja granula i želatinizacije škroba. Temperature želatinizacije škroba običnog prosa kreću se od 56 °C do 76 °C (Dendy, 1995). Neškrobni polisaharidi, prehrambena vlakna čine oko 1 % oljuštenog zrna prosa (Kalinová i Moudrý, 2006).

Oljušteno zrno prosa sadrži 3,5 - 6,7 % lipida, a udio veći od ovog ima samo zob. Masti običnog prosa čini 86-89% nezasićenih masnih kiselina, od čega je 42 % polinezasićenih masnih kiselina koje igraju važnu ulogu u metabolizmu kolesterola. Glavne masne kiseline običnog prosa jesu linolenska (38,4 - 66,86 %), oleinska (21,4 - 22,7 %) i palmitinska (6,61 -

11,3 %). Ovdje je bitno ograničiti vrijeme skladištenja prosa na tri mjeseca jer su navedene kiseline podložne oksidaciji čime daju neugodan okus oljuštenim zrnima (Kalinová, 2007).

Najveći udio mineralnih komponenata se nalazi u perikarpu, aleuronskom sloju i klici. Obično proso siromašno je kalcijem, ali bogato kalijem, željezom, magnezijem, fosforom, cinkom i bakrom, te vitaminima B1 i B2.

Iz tablice 3 vidljivo je kako udio polifenola u običnom prosu iznosi 0,05 - 0,1 %. Cijelo zrno prosa sadrži ferulinsku kiselinu, *p* - kumarinsku kiselinu i klorogensku kiselinu (Kalinová, 2007).

Proso također sadrži fitate (0,48 %), inhibitore tripsina i prehrambenih vlakana, a sam omotač zrna prosa bogat je izvor fitokemikalija (Ramachandra i sur., 1977; Hadimani i Malleshi, 1993). No, upravo prisutnost fitata, tanina ili polifenola u omotaču kao anti-nutrijenata, smanjuje biodostupnost minerala i proteina (Jingjun i sur., 2007; Shobana i Malleshi, 2007). Iako se ljuštenjem ovaj problem rješava, ono pak dovodi do gubitka nekih minerala, vitamina i prehrambenih vlakana (Lestienne i sur., 2005; Shobana i Malleshi, 2007). Prema nekim istraživanjima se, uz poboljšanje funkcionalnih svojstava, razina anti-nutrijenata smanjuje provođenjem postupka fermentacije (El Hag i sur., 2002; Badau i sur., 2005).

2.2.2. Primjena prosa u proizvodnji prehrambenih proizvoda

Glavni proizvodi koji se dobivaju preradom prosa su oljuštena zrna, brašno i žitne pahuljice. Proseno brašno se uglavnom koristi kao djelomična zamjena pšeničnome u izradi kruha, keksa i tjestenine (Kalinová, 2007). Proso se prerađuje s ciljem povećanja nutritivne vrijednosti, ali i poboljšanja probavljivosti i bioraspoloživosti nutrijenata (Sarita, 2016). Upravo zbog povoljne nutritivne vrijednosti, ova žitarica prikladna je za primjenu u različitim prehrambenim proizvodima kao što su dječja hrana ili razne grickalice (Kalinová, 2007). Osim za ljudsku potrošnju, proso se koristi i kao sjeme za ptice te u proizvodnji etanola i biofilmova (Taylor i sur., 2007; Li i sur., 2008). U mnogim afričkim i azijskim područjima koristi se kao glavni sastojak tradicionalne hrane - kruha, kaše, grickalice, te alkoholnih i bezalkoholnih napitaka (Kalinová, 2007; Saleh i sur., 2013).

2.2.3. Pozitivni učinci na zdravlje

Proso pokazuje potencijal da bude prihvaćeno kao funkcionalna hrana jer sadrži prehrambena vlakna, proteine, minerale, vitamine i antioksidanse koji imaju brojne pozitivne utjecaje na zdravlje ljudi (Saleh i sur., 2013). Nutritivni sastav prosa omogućuje njegov

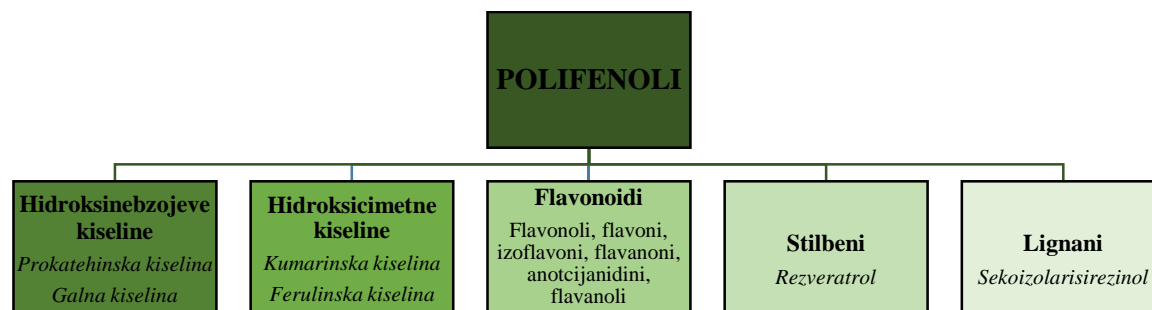
blagotvorni utjecaj na zdravlje koji se očituje u antimikrobnim, antioksidativnim i antidijabetičkim svojstvima (Devi i sur., 2014). Koristi se za sprečavanje kardiovaskularnih bolesti, snižavanje krvnog tlaka, smanjenje pojave tumora i smanjenje kolesterola, a povezuje se i sa značajnim smanjenjem postprandijalne glukoze u krvi, značajnim smanjenjem ukupnog LDL kolesterola i poboljšanjem lipidnog profila (Saleh i sur., 2013; Mcsweeney i sur., 2017). Fermentiranim proizvodima od prosa pripisuje se probiotičko djelovanje, dok cijelo zrno pokazuje prebiotička svojstva (Laminu i sur., 2011; Lei i sur., 2016). Kod populacije koja konzumira ovu žitaricu zabilježen je manji broj slučajeva obolijevanja od dijabetesa (Shobana i sur., 2009).

Također, već je spomenuto kako proso ne sadrži gluten pa se koristi za prehranu ljudi oboljelih od celijakije (Sanderson i sur., 2017). Poželjan je i na jelovniku osoba s atopijskim dermatitisom, a testovima na štakorima dokazano je da proso ubrzava proces zacjeljivanja rana (Rajasekaran i sur., 2004; Saleh i sur., 2013).

Prije konzumacije i pripreme hrane, s ciljem poboljšanja prehrambenih i senzorskih svojstava, proso se prerađuje tradicionalnim tehnikama koje uključuju dekortiranje, proizvodnju slada, fermentaciju, prženje, ljuštenje i mljevenje (Saleh, 2013).

2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenoli čine kompleksnu skupinu prirodnih spojeva koja broji više od 8,000 poznatih struktura. Sve pripadnike ove skupine karakterizira aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih grupa. Produkti su sekundarnog metabolizma biljaka, a osim u voću i povrću, pristuni su u žitaricama (Dai i Mumper, 2010). Dijele se (Slika 2) prema podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi (Tsao, 2010).



Slika 2. Podjela polifenola i najznačajniji predstavnici (Manach i sur., 2014)

Fenolne kiseline dijele se u dvije grupe: derivati benzojeve kiseline i derivati cimetine kiseline. Sadržaj hidroksibenzojevih kiselina u jestivim biljkama je niži u odnosu na hidroksicimetine kiseline, a razlike u strukturi između hidroksibenzojevih i hidroksicimernih kiselina rezultat su metilacije i hidroksilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990). Flavonoidi predstavljaju grupu polifenola čiju osnovnu strukturu čine dva aromatska prstena povezana s tri ugljikova atoma, a dijele se na flavonole, flavone, flavanone, flavanole, antocijanidine i izoflavone. Razlike među njima posljedica su razlika u broju i položaju hidroksilnih grupa glikolizacije ili alkilacije tih istih. Stilbeni su spojevi koji sadrže 1,2 - difeniletan kao funkcionalnu skupinu te je najpoznatiji predstavnik ove skupine resveratrol (3,5,4'- trihidroksistilben). Lignani su difenolni spojevi koji imaju 2,3 - dibenzilbutansku strukturu, odnosno dimeri cimetine kiseline (Pandey i Rizvi, 2009). Polifenolne spojeve odlikuje niska bioraspoloživost, što se najčešće pripisuje njihovoj nestabilnosti i podložnosti metaboličkim procesima u cijelom gastrointestinalnom traktu, kao i visoka osjetljivost na vanjske okolišne uvjete, čime je otežana implementacija polifenola u prehrane i druge proizvode (Bell, 2001). Pokazuju visoku biološku aktivnost te antioksidacijsko, protuupalno i antitumorsko djelovanje (Sun i sur., 2014).

2.3.1. Antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva

Svaka komponenta hrane koja nekim mehanizmom može ukloniti slobodni radikal smatra se antioksidansom, pa se u njih ubrajaju vitamini (posebice vitamin A, C i E), polifenolni spojevi, selen, cink i mnogi drugi (Aljadi i Kamaruddin, 2004). Antioksidansi su molekule koje djeluju na način da nekom reaktivnom, slobodnom radikalu doniraju jedan elektron ili vodikov atom. Time neutraliziraju slobodne radikale, stvaraju manje štetne molekule i na taj način štite ljudski organizam od mogućih bolesti, ali i usporavaju kvarenje hrane bogate mastima (Brand-Williams i sur., 1995; Beretta i sur., 2005; Liviu i sur., 2011).

Slobodni radikal općenito je svaki atom ili molekula koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Većina ih je jako reaktivna, nastoje brzo reagirati s drugim molekulama pri čemu nastaju novi radikali (Pine, 1994). Oni su štetni nusprodukti normalnog metabolizma, a njihov nastanak može izazvati izlaganje zračenju, konzumacija cigareta ili stanje stresa. Izazivaju oksidaciju raznih biomolekula, i to proteina, lipida i DNA. Dodatno, uzrokuju genetske promjene i promjene na molekularnoj razini kod različitih organizama (Ammar i sur., 2009).

Antioksidansi imaju važnu ulogu u prevenciji i liječenju oboljenja uzrokovanih oksidativnim stresom poput ateroskleroze, osteoporoze, malignih bolesti, dermatoloških oboljenja, Chronove bolesti, te preuranjenog starenja (Aljadi i Kamaruddin, 2004).

Antioksidacijska aktivnost polifenola iskazuje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, te inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres (Escarpa i Gonzalez, 2001). Ona ovisi o rasporedu i ukupnom broju hidroksilnih skupina, a veću aktivnost imaju polifenoli koji u svojoj strukturi sadrže kateholnu skupinu, u odnosu na one s fenolnom (Burda i Oleszek, 2001; Scalbert i sur., 2005).

Konkretno, flavonoidi djeluju antioksidativno neutralizacijom slobodnih radikala i prekidanjem lančane reakcije njihova nastajanja, te stvaranjem kelata s ionima metala (Khan i sur., 2000; Sakihama i sur., 2000). Flavanoli i procijanidini se vezama na polarni dio fosfolipida akumuliraju na površini stanične membrane čime stanicu preko hidrofobnog dvosloja brane od štetnih molekula (Verstraeten i sur., 2003). Iako sve fenolne kiseline pokazuje antioksidativno djelovanje, slobodne radikale aktivnije neutraliziraju *p*-kumarinska i ferulinska u odnosu na kafeinsku i klorogensku kiselinu. Hidroksilne grupe u *p*-položaju na hidroksicimetnim kiselinama (*p*-kumarinska kiselina) značajno povećavaju antiradikalni kapacitet u usporedbi s ekvivalentnim *o*- i *m*-položajima (*o*- ili *m*-kumarinska kiselina) (Mikolaj, 2017).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se direktne (ORAC metoda, određivanje antioksidacijskog kapaciteta s β -karotenom) i indirektne (ABTS, DPPH, FRAP) metode, a podaci do kojih se dođe su pouzdaniji ako se međusobno uspoređuju i koreliraju. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti se baziraju na različitim mehanizmima obrambenog sustava antioksidansa, poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala ili kelacije metalnih iona (Roginsky i Lissi, 2004).

2.3.2. Polifenolni spojevi prosa

Dokazano je da je gotovo 60 % polifenolnih spojeva u prosu koncentrirano u sjemenom omotaču koji čini oko 13 % mase samog sjemena. Oni su prisutni kao slobodni, topivi konjugati i netopljivi vezani oblici (Devi i sur., 2011). Obično proso sadrži 0,05 - 0,10 mg fenola na 100 g ekvivalenta katehina (Dendy, 1995). Glavni polifenoli prosa su fenolne kiseline i tanini, a flavonoidi su prisutni u malim koncentracijama (Chandrsekara i Shahidi, 2010). U cijelome zrnju mogu se naći i hidroksicimetne (klorogenska, kafeinska, *trans*-cimetna, *p*-kumarinska, sinapinska, *trans*-ferulinska, *cis*-ferulinska) i hidroksibenzojeve kiseline (galna, protokatehuidna, *p*-hidroksibenzojeva, gentinska, vanilinska, siringična). Dok su hidroksicimetne i njihovi derivati pristupni kao netopljivi spojevi, hidroksibenzojeve se nalaze u obliku topivih konjugata (Shahidi i Chandrasekara, 2013). Najzastupljenije fenolne kiseline u ovoj žitarici su ferulinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, dehidromeri ferulinske kiseline,

cimetna kiselina i topljiva klorogenska kiselina (Kálinova, 2007). Polifenoli u interakciji s proteinima čine tanin-protein kompleks čime smanjuju probavljivost samih proteina (Salunkhe i sur., 1985). Kondenzirani tanini su jači antioksidansi od svojih odgovarajućih monomera (Devi i sur., 2014).

2.4. MLJEVENJE

Mljevenje je tehnološki proces usitnjavanja cijelih zrna u oblik pogodan za konzumiranje ili prevođenje u određeni proizvod, a sastoji se od usitnjavanja materijala pri čemu se različiti materijali odvojeno usitnjavaju, a zatim se usitnjeni dijelovi sijanjem razdvajaju. Cilj samog mljevenja, odnosno razdvajanja zrna na anatomske dijelove jest dobivanje brašna, pri čemu se kao nusproizvodi izdvajaju posije i klica.

Faze u industrijskom postupku mljevenja su:

- priprema (miješanje i čišćenje)
- vlaženje
- mljevenje

Različiti postupci mljevenja razlikuju se ovisno o kvaliteti same žitarice te vrsti proizvoda (brašno ili krupica).

Zrna se odvajaju (frakcioniraju) u različite kategorije koje se razlikuju prema veličini i aerodinamičkim osobinama, te po prerađivačkim osobinama i komercijalnoj vrijednosti. Pri tome je komercijalna vrijednost sitne frakcije znatno manja pa se iz nje više isplati proizvesti stočnu hranu nego brašno slabije kvalitete. Zrna se frakcioniraju pomoću sita ili aspiratora, odnosno koncentratora koji zrna razdvaja prema veličini i aerodinamičnim svojstvima. Nakon njihova frakcioniranja, zrna se miješaju s ciljem dobivanja smjese željene kakvoće.

Zrna na vlaženje neposredno prije mljevenja dolaze očišćena od raznih primjesa koje se odvajaju prema fizikalnim karakteristikama, i to prema veličini, obliku, masi, boji, itd. Dodatno, površinskom obradom s površine zrna se uklanjaju nečistoće anorganskog i organskog podrijetla čime se u konačnici dobiva higijenski ispravniji proizvod. U ove metode ubrajaju se ribanje, četkanje, ljuštenje i pranje.

Mljevenje se provodi u mlinovima koji su najčešće opremljeni valjnim stolcima, planskim sitima, pročišćivačima, otresivačima posija i rastresivačima.

Mehaničkoj obradi najviše je podložan najmekši endosperm pa se on usitjava prvi, a nakon njega klica i na kraju ljuska. Nakon usitnjavanja se endosperm krupljenjem odvaja od

klice i perikarpa, slijedi čišćenje i usitnjavanje krupice, a postupak mljevenja završava izmeljavanjem na glatkim i hrpavim valjcima čime se dobije brašno.

Dekortikacijom, odnosno uklanjanjem vanjskog omotača zrna smanjuje se udio pepela i masti običnog prosa. Također, sadržaj lizina pada na polovicu svoje vrijednosti, dok količina ostalih aminokiseline ostaje podjednaka (Serna-Saldivar i Rooney, 1995). Ovim postupkom obrade zrna prosa smanjuje se udio tanina i fenola čime proteini, škrob i minerali postaju bolje probavljivi (Devi i sur., 2011). Ljuštenje zrna pokazuje jednaki učinak na sadržaj polifenola te probavljivost proteina i škroba. Ljuštenjem se od zrna uklanja površinski sloj perikarpa (epidermis), a uzastopnim koracima se mogu zahvatiti i unutarnji slojevi zrna, ovisno o vremenu i stupnju abrazije (Chandrasekara i sur., 2012).

Brašno prosa nakon mljevenja brzo gubi na kvaliteti zbog hidrolitičkih i lipolitičkih promjena na mastima. Kvaliteta i rok trajanja samoga brašna povećavaju se primjenom postupka suhog mljevenja, jer se njime od endosperma odvaja većina sadržaja masti (klica i aleuronski sloj).

2.4.1. Mljevenje primjenom kriogenog hlađenja

Kriogeno mljevenje je postupak mljevenja u kojem se tretirani materijali smrzavaju u tekućem dušiku na temperaturama do -196°C . Dosada je zabilježen mali broj istraživanja utjecaja ove metode na zrna žitarica. Mljevenje uz primjenu kriogenog hlađenja se uglavnom primjenjivalo za usitnjavanje sjemenki različitih začina s ciljem poboljšanja njihove kvalitete (Singh i Goswami, 1999; Goswami i Singh, 2003). Ovim postupkom mljevenja olakšava se fragmentacija čestica i pruža mogućnost očuvanja termolabilnih spojeva. Pri niskim temperaturama zrna postaju lako lomljiva, te se smanjuje mehanička energija potrebna za njihovo usitnjavanje. Tim smanjenjem veličine čestica posija u probavnom sustavu dolazi do povećanja bioraspoloživosti ferulinske i sinapinske kiseline, kao i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta bioraspoloživih frakcija iz kruha obogaćenog posijama. Ultra-finim mljevenjem posija pucaju stanične stijenke što rezultira oslobađanjem sadržaja samih stanica, a to objašnjava veću bioraspoloživost određenih spojeva tijekom probave (Hemery i sur., 2010). Smanjenje veličine čestica može olakšati interakcije spoj-otapalo te ekstrakciju i bioraspoloživost bioaktivnih spojeva prisutnih u posijama. Tran i suradnici (2011) su istraživali razliku u strukturi i očuvanju molekula škroba riže tretirane mljevenjem sa i bez smrzavanja. Dokazali su da molekularna struktura samog škroba ostaje skoro pa nepromijenjena primjenom kriogenog hlađenja, dok kod mljevenja bez primjene kriogenog hlađenja dolazi do degradacije

amilopektina i amiloze. Također, običnim mjevenjem dolazi do cijepanja lanaca samog škroba što negativno utječe na nutritivnu vrijednost takvog proizvoda, jer se škrob sa dužim lancima u svojoj strukturi sporije probavlja. Dodatno, u istraživanju Zhu i suradnika (2010) dokazano je kako se ultra-finim mljevenjem povećava sposobnost stvaranja kelata, sposobnost redukcije slobodnih radikala i sadržaj ukupnih polifenola pšeničnih posija.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za provedbu ovog eksperimenta korištena je frakcija posija običnog prosa sorte Sonček (Mlinopek, Slovenija), koja je sadržavala čestice manje od 500 μm . Kemijski sastav prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Kemijski sastav posija obično prosa, sorte Sonček (% na suhu tvar)

Uzorak	Voda	Pepeo	Proteini	Masti
Posije	$10,20 \pm 0,002$	$5,77 \pm 0,008$	$13,90 \pm 0,042$	$9,98 \pm 0,049$

Sastav vlakana određen je u sklopu ovog diplomskog rada i prikazan je u poglavlju Rezultati.

3.1.2. Priprema uzoraka

3.1.2.1. Mljevenje

Postupak mljevenja provodio se u kugličnom mlinu (CryoMill, Retsch, Njemačka) bez primjene tekućeg dušika (N_2), te uz njegovu primjenu, odnosno uz smrzavanje na temperaturama do -196°C . Posije prosa (8 g) mljevene su 2, 4, 8 ili 12 minuta, uz vibracijsku frekvenciju od 30 Hz. U slučaju kada je bilo primjenjeno kriogeno hlađenje, predhlađenje uzorka provedeno je na automatskom programu. Promjer korištene kuglice iznosio je 25 mm, a zapremnina posudice za mljevenje 50 mL.



Slika 3. Uređaj za kriomljevenje

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica

Kako bi se utvrdila raspodjela veličine čestica, uzorci posija prosa dobiveni mljevenjem na kugličnom mlinu bez i uz primjenu tekućeg dušika analizirani su pomoću metode laserske difrakcije. Pri analizi uzoraka korišten je laserski analizator veličine čestica Malvern 2000 (Malvern Instruments Ltd. Worchestershire, Velika Britanija), koji je opremljen jedinicom za suhu disperziju Scirocco 2000 i povezan s računalom s Mastersizer 2000 softwareom v. 5.60. Uzorak je usipan u kadu jedinice za suhu disperziju koja je opremljena sitom za razbijanje aglomerata i ujednačavanje dotoka uzorka u mjernu ćeliju. Zasićenje laserske zrake je podešeno na 2 - 6 % (Benković i sur., 2013), a za svaki od uzoraka su provedena tri paralelna mjerenja. Brzina snabdijevanja ćelije uzorkom i tlak zraka su prilagođavani tijekom mjerenja kako bi se održala konstantnost zasićenja laserske zrake (Benković, 2013). Rezultati su izražavani kao percentili raspodjele veličine čestica:

- $d(0,5)$ predstavlja promjer čestica za koji vrijedi da je 50 % ukupnog broja čestica ima promjer veći od tog promjera i 50 % ukupnog ima promjer manji od tog promjera [μm]
- $d(0,1)$ predstavlja veličinu čestice od koje je manje 10 % čestica cijelog uzorka [μm]
- $d(0,9)$ predstavlja veličinu čestica od koje je manje 90 % čestica cijelog uzorka [μm]
- $D[3,2]$ predstavlja površinski ekvivalentni promjer, odnosno Sauterov promjer [μm]
- Raspon (span) predstavlja širinu raspodjele čestica i računa se prema formuli:

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

3.2.2. Određivanje udjela vode

Količina vode u prosu određuje se metodom koja je određena Pravilnikom o metodama fizikalno-kemijske analize za žita i mlinske proizvode 28/11, uz modifikaciju mase zbog

limitirane količine uzorka. Podatak količine vode u uzorcima je iskorišten za izračun dobivenih rezultata na masu suhe tvari posija prosa.

Aparatura i pribor:

- 1) Metalna zdjelica
- 2) Sušionik
- 3) Eksikator sa silicagelom i indikatorom zasićenosti
- 4) Laboratorijska žlica
- 5) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,001 g

Postupak rada:

U prethodno osušenu i izvaganu metalnu zdjelicu izvaže se oko 2 g uzorka. Za određivanje količine vode u uzorcima prosa otvorena zdjelica s uzorkom i poklopcem se stavi u sušionik zagrijan na 130 °C u trajanju od 90 minuta. Nakon sušenja zdjelica se izvadi iz sušionika, pokrije poklopcem te se stavi hladiti u eksikator, a nakon hlađenja važe. Za svaki uzorak rade se dvije paralele, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Sušenje se ponavlja u trajanju od 30 minuta sve do konstantne mase. Količina vode u uzorku prikazuje se u postocima, a izračunava prema formuli:

$$\text{Udio vode (\%)} = \frac{(m_0 - m_1) * 100}{m_0}$$

gdje su:

m_0 = masa uzorka [g]

m_1 = masa uzorka nakon sušenja [g]

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:

$$\text{Suha tvar (\%)} = 100\% - \text{udio vode (\%)}$$

3.2.3. Određivanje udjela netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana

Reagensi:

- 1) 96 %-tni etanol
- 2) 78 %-tni etanol
- 3) Aceton
- 4) Enzimi, Megazyme International Ireland
 - 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)
- 5) Destilirana voda
- 6) Celite (filtracijsko sredstvo, dijatomejska zemlja)
- 7) Otopina za pranje filter lončića
- 8) 6,0 M otopina NaOH
- 9) Otopina MES-TRIS pufera- svaki 0,05 M; pH = 8,2 pri 24 °C
- 10) 37 %-tna otopina HCl
- 11) 0,561 M otopina HCl
- 12) 5 %-tna otopina NaOH
- 13) 5 %-tna otopina HCl

Aparatura i pribor:

- 1) Staklene čaše
- 2) Laboratorijske boce, 500 mL i 1 L
- 3) Stakleni filter lončići (50 mL, veličina pora 40 - 60 μ m)
 - priprema lončića za upotrebu: lončići se stave u mufolnu peć na 525 °C preko noći. Celite i pepeo se maknu koristeći vakuum. Lončići se stave u Labex, otopinu za pranje na sobnu temperaturu u trajanju od 1 h, a ispiru se vodovodnom i destiliranom vodom. Za zadnje ispiranje koristi se 15 mL acetona i lončići se ostave sušiti na zraku. U posušene lončiće doda se 1 g Celite i stavi sušiti na 130 °C u sušionik do konstantne mase. Lončići se hlade u eksikatoru oko 1 h, nakon toga se izvažu i zabilježi im se masa.
- 4) Boca za odsisavanje, 500 mL
- 5) Stakleni lijevak za filtraciju

- 6) Gumeni prsten
- 7) Izvor vakuuma
- 8) Vodena kupelj s tresilicom
- 9) Laboratorijska vaga
- 10) Staklena menzura, 50 i 500 mL
- 11) Sušionik
- 12) Štoperica
- 13) Eksikator
- 14) pH metar, JENWAY 3510 (UK)
- 15) mikropipete (50 - 200 μ m i 5 ml) i nastavci, Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- 16) magnetska miješalica, IKA® RT5 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
- 17) špatula
- 18) mufolna peć

Postupak rada:

Metoda za analizu netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana modifikacija je AACC 32 - 05.01 metode za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana (AACC 32 - 05.01) i AACC 32 - 21.01 metode za određivanje topljivih/netopljivih prehrambenih vlakana.

3.2.3.1. Određivanje netopljivih prehrambenih vlakana

U svaku od četiri laboratorijske boce (500 mL) izvaže se po 1 g prethodno odmašćenog uzorka te se doda 40 mL otopine MES-TRIS pufera. Slijepa proba pripremi se na isti način samo bez uzorka i pripremi se u dvije laboratorijske boce. Nakon dodatka pufera u svaku bocu stavi se magnet te se boce stave miješati na magnetsku miješalicu (MOT = 1,5) dok se uzorak ne otopi. U iste boce, miješajući na magnetskoj miješalici, doda se 50 μ L otopine termostabilne α -amilaze. Boce se poklope sa čepom (ne zatvara se do kraja), stave u vodenu kupelj sa tresilicom (jačina postavljena na 120) te se konstanto miješaju na 98 - 100 °C i inkubiraju 30 min. Slijepa proba analizirana je na isti način. Uzorci su se stavili u lonac sa kipućom vodom koja se zagrijavala na rešou te su bili miješani ručno svakih 5 min. Nakon završetka inkubacije uzorci se izvade iz vodene kupelji i ohlade na otprilike 60 °C. Sa stijenki boca sastruže se prsten pomoću špatule te se špatula i stijenka isperu sa 10 mL destilirane vode koristeći pipetu. Temperaturu vodene kupelji potrebno je podesiti na 60 °C na način da se iz kupelji odlije nešto

vode i doda se hladna voda. U ohlađene uzorke doda se 100 µL otopine proteaze te se boce poklope sa čepom (ne zatvara se do kraja) i stave se u vodenu kupelj sa konstantnim miješanjem u trajanju od 30 min. Vrijeme se počne mjeriti kada temperatura u kupelji dosegne 60 °C. Nakon završene druge inkubacije zaustavi se miješanje, a boce se ostave u kupelji kako bi se podesila pH vrijednost na 4,1 - 4,8. U svaku bocu doda se 5 mL 0,561 M otopine HCl-a te se za konačno postavljanje pH vrijednosti dodaje nekoliko kapi (otprilike 5 - 10) 5 %-tne otopine HCl-a pomoću jednokratne plastične pipete. Nakon što se podesi pH vrijednost, u boce se doda po 200 µl otopine amiloglukozidaze, poklopi se čepom (ne zatvara se do kraja) i ostavi se inkubirati u vodenoj kupelji sa konstantnim miješanjem na 30 min. Vrijeme se počne mjeriti kada temperatura u kupelji dosegne 60 °C. Završetkom treće inkubacije uzorci idu na vakuum filtraciju. Vakuum filtracija provodi se na način da je boca za odsisavanje spojena na izvor vakuuma te se filtracija vrši preko staklenih lončića. Prije filtracije uzorka potrebno je rasporediti Celite po lončiću koristeći nekoliko mililitara destilirane vode koja se zatim usisa. Lončići s Celitom su prethodno izvagani i zabilježena im je masa. Uzorak iz boca koje su se inkubirale u vodenoj kupelji se filtrira kroz lončić u odsisnu bocu. Talog koji je zaostao u boci se ispire sa 4 x 5 mL destilirane vode koja je zagrijana na 70 °C. Filtrat i voda prebace se iz boce za odsisavanje u čistu, izvaganu laboratorijsku bocu te se kasnije koriste za određivanje topljivih prehrambenih vlakana. Talog u lončiću ispere se sa 2 x 10 mL 96 %-tnog etanola i acetona. Nakon ispiranja taloga u lončiću, lončić se stavi u sušionik na 103 °C te se suši preko noći. Osušeni lončić stavi se u eksikator, a nakon hlađenja se izvaže i zabilježi se masa. Masa taloga izračuna se na način da se oduzme masa lončića i Celita od mase osušenog lončića i Celita sa uzorkom. Za izračun netopljivih vlakana potrebno je odrediti količinu pepela (metoda je opisana u poglavlju 3.2.3.) i količinu proteina (metoda je opisana u poglavlju 3.2.4.).

3.2.3.2. Određivanje topljivih prehrambenih vlakana

Za određivanje topljivih prehrambenih vlakana koristi se uzorak (filtrat i voda) koji je skupljen u prethodno izvaganu laboratorijsku bocu prilikom određivanja netopljivih vlakana. Boca sa skupljenim uzorkom se izvaže te se izračuna masa uzorka. Dobivena masa koristi se za izračun potrebnog volumena 96 %-tnog etanola, zagrijanog na 60 °C koji se dodaje u bocu sa uzorkom u volumenu koji je 4 puta veći od mase uzorka. Nakon dodatka etanola uzorak se ostavi stajati na sobnoj temperaturi 1 h u svrhu taloženja topljivih prehrambenih vlakana (slika 9). Prije filtracije uzorka potrebno je rasporediti Celite po lončiću koristeći nekoliko mililitara (oko 15 ml) 78 %-tnog etanola koji se zatim usisa. Lončići s Celitom su prethodno izvagani i

zabilježena im je masa. Uzorak se filtrira kroz lončić. Za kvantitativno prenošenje i ispiranje ostatka taloga iz boca u lončić koristi se špatula i 78 %-tni etanol. Nakon filtracije talog se ispere sa 2 x 15 mL 78 %-tnog etanola, 96 %-tnog etanola i acetona. Isprani talog u lončiću suši se u sušioniku preko noći na 103 °C. Osušeni lončić stavi se u eksikator, a nakon hlađenja se izvaže i zabilježi masa. Masa taloga izračuna se na način da se oduzme masa lončića i Celita od mase osušenog lončića i Celita sa uzorkom. Za izračun topljivih prehrambenih vlakana potrebno je izračunati količinu proteina i pepela na jednak način kao i kod netopljivih prehrambenih vlakana.

3.2.4. Određivanje količine pepela

Metoda za određivanje pepela modificirana je i rađena prema protokolu za određivanje prehrambenih vlakana - AACC 32 - 05.01 metode za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana i AACC 32 - 21.01 metode za određivanje topljivih/netopljivih prehrambenih vlakana (Megazyme International Ireland, 2016).

Aparatura i pribor:

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

Postupak rada:

Lončići za određivanje prehrambenih vlakana se stave u hladnu mufolnu peć te spaljuju 5 sati nakon postizanja odgovarajuće temperature na 525 °C +/- 20 °C. Izgaranje se smatra završenim kad je ohlađeni uzorak bijele boje. Kad se izgaranje završi, posuda se hladi u eksikatoru do sobne temperature. Nakon hlađenja, uzorak se brzo izvaže. Količina pepela iskazuje se prema postocima mase prema suhoj tvari i izračunava prema formuli:

$$\text{Količina pepela (\%)} = m_1 * \frac{100}{m_0} * \frac{100}{100 - v}$$

gdje su:

m_0 = masa ispitanog uzorka [g]

m_1 = masa ostatka [g]

v = količina vode u ispitanom uzorku [%]

3.2.5. Određivanje sadržaja dušika (proteina) po Kjeldahl-u

Sadržaj proteina određuje se prema normi HRN ISO 1871 : 1999 (ISO 1871 : 1975 (E))
ICC 105 / 2 i metodi AACC Method 46 - 12.

Reagensi:

- 1) Konc. H_2SO_4
- 2) 40% NaOH
- 3) 4% H_3BO_3
- 4) Katalizator: Kjeldahl-ove tablete (bez žive i selena)
- 5) HCl, 0,1 N titrival

- određivanje faktora otopine (F) HCl ($c = 0,1 \text{ mol / L}$) s Na_2CO_3
 - Na_2CO_3 se osuši na $250 \text{ }^\circ\text{C}$ i ohladi se u eksikatoru
 - odvaži se 0,15 - 0,2 g Na_2CO_3 na desetinu miligrama
 - otopi se u 100 ml vode
 - titrira se kiselinom ($c = 0,1 \text{ mol / L}$) uz metil-crvenilo do promjene boje iz žute u crvenu
 - kuhanjem se istjera CO_2 i ponovno se titrira do crvene boje
- Faktor otopine se odredi prema formuli:

$$F = \frac{2 \cdot 1000 \cdot m(Na_2CO_3)}{V(HCl) \cdot 106,004 \cdot 0,1}$$

- 6) obojeni indikator (kada se upotrebljava ručna ili kolorimetrijska titracija)
 - 1 % metil-crvenilo - otopi se 100 mg u 100 ml 95 % alkohola
 - 1 % bromkrezol-zeleno - otopi se 100 mg u 100 ml 95 % alkohola

7) Destilirana voda

Aparatura i pribor:

- 1) laboratorijska vaga
- 2) uređaj za mineralizaciju
- 3) Kjeldahl-ove kivete za mineralizaciju sa stalkom
- 4) Efikasni sistem za odvod pare: aspirator ili pročištač plina ili tekuća voda
- 5) Uređaj za destilaciju
- 6) Posudice za vaganje
- 7) 25 mL birete (graduacija = 0,1 mL)
- 8) 250 mL Erlenmayerove tikvice
- 9) 10 mL dispnzeta za konc. H₂SO₄
- 10) 25 mL dispnzeta za bornu kiselinu

Postupak rada:

U Tecator kivete metodom dvostrukog vaganja stavi se uzorak vlakna. U svaku kivetu se doda 1 tableta Kjeldahl katalizatora i 12 ml koncentrirane sulfatne kiseline te se lagano miješa dok se uzorak potpuno navlaži kiselinom. Nakon toga se stalak s epruvetama stavi u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i uključi se sistem za odvod pare. Mineralizacija je završena nakon otprilike 60 minuta, a tekućina u epruvetama je bistra i svjetlo-zelene boje. Epruvete se sa stalkom izvade iz digestijske jedinice i ostave hladiti zajedno s poklopcem do sobne temperature. Nakon hlađenja se u svaku epruvetu stavi 80 ml destilirane vode.

Za vrijeme trajanja mineralizacije za svaki uzorak pripremi se jedna Erlenmayer tikvica od 250 mL te se u njih stavi 25 mL borne kiseline i 3 kapi indikatora.

Uključi se aparat za destilaciju, pusti se voda da se napuni generator pare (ventil ispuštanja vode mora biti zatvoren) te se na postolje predviđeno za prihvatnu tikvicu stavi prazna tikvica, a na mjesto predviđeno za Kjeldhalovu kivetu stavi se prazna kiveta. Pokrene se generator pare. Nakon što se u prihvatnu tikvicu skupi kondenzat, otvore se zaštitna vratašca te se prihvatna tikvica zamijeni tikvicom u koju je stavljeno 25 ml borne kiseline (destilacijska cjevčica mora biti uronjena u otopinu), a Kjeldhalova kiveta se zamijeni kivetom u koju je stavljen spaljeni uzorak i 80 ml destilirane vode te se ponovno zatvore vratašca. Dozira se 50 ml 40 %-tnog NaOH u Kjeldhalovu kivetu i pokrene se destilacija koja se odvija oko 4 minute (do volumena 125 ml). Dobiveni destilat je zelene boje (ukazuje na prisustvo amonijaka) te mora biti hladan jer u protivnom dolazi do gubitka amonijaka. Nakon završetka destilacije,

Kjeldhalova kiveta se isprazni u izljev uz puštanje hladne vode, a destilat se titrira kloridnom kiselinom te se zabilježi utrošak.

Slijedi titracija koja se vrši pomoću birete koja je napunjena 0,1 N HCl-om te se titrira izravno u prihvatnu tikvicu. Titracija je završena kada se boja otopine promijeni u blijedo ružičastu (Novak, 2017).

Masa proteina izračunava se na slijedeći način:

$$\%N = \frac{\{(a-b) \cdot N_{\text{kis.}} \cdot f_{\text{kis.}} \cdot 1,4007\}}{m \text{ uzorak}}$$

gdje su:

a = volumen HCl utrošen za titraciju uzorka [mL]

b = volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe [mL]

N = molaritet kiseline

f = faktor kiseline

m = masa uzorka (talog u lončiću nakon sušenja) [g]

$$\% \text{ bjelančevina} = \%N \cdot F$$

gdje je:

F = faktor za preračunavanje dušika u bjelančevine (6,25)

3.2.6. Ekstrakcija

3.2.6.1. Ekstrakcija slobodnih spojeva

U Eppendorf epruvete volumena 1.5 mL izvaži se 250 mg uzorka i doda 50 uL internog standarda (c ~ 0,075 mg/mL), te 1 mL 80 %-tnog etanola. Uzorci se homogeniziraju na vortex-u te stavljaju u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. Po završetku ekstrakcije epruvete se vade iz kupelji te stavljaju u mikrocentrifugu 15 minuta na 8000 o / min. Tako dobiveni supernatant prelije se u nove epruvete volumena 2 mL i stavi na uparavanje pod dušikom uz lagano grijanje do 40 °C. Ekstrakcija se ponovi još dva puta, ali uz dodatak 800 µL 80 %-tnog etanola. Supernatanti se nakon svakog centrifugiranja spajaju i stavljaju na uparavanje pod dušikom. U uparene uzorke dodaje se 500 uL 2 %-tne octene kiseline, te se takvi homogeniziraju na vortex-u, a nakon toga slijedi dodatak 500 µL etil acetata, te ponovna homogenizacija. Eppendorf

epruvete se polažu u centrifugu 5 minuta na 14000 o / min. Po završetku centrifugiranja gornji sloj etil acetatne frakcije se otpipetira u nove epruvete i stavi na uparavanje pod dušikom, uz lagano grijanje do 40 °C. Postupak se ponovi još dva puta, gornji slojevi se odvoje i sva tri supernatanta spoje. Upareni uzorci se spremaju u frizer na temperaturu od - 20 °C do analize. Za analizu se dodaje 100 µL metanola te homogenizira na vortexu.

3.2.6.2. Ekstrakcija konjugiranih spojeva

U Eppendorf epruvete volumena 2 mL izvaže se 250 mg uzorka i doda 50 uL internog standarda ($c \sim 0,075 \text{ mg / mL}$), te 1 mL 80 %-tnog etanola. Uzorci se homogeniziraju na vortex-u te stavljaju u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. Po završetku ekstrakcije epruvete se vade iz kupelji te stavljaju u mikrocentrifugu 15 minuta na 8000 o / min. Tako dobiveni supernatant prelije se u nove epruvete volumena 2 mL i stavi na uparavanje pod dušikom uz lagano grijanje do 40 °C. Ekstrakcija se ponovi još dva puta, ali uz dodatak 800 µL 80 %-tnog etanola. Supernatanti se nakon svakog centrifugiranja spajaju i stavljaju na uparavanje pod dušikom. Budući da je ovdje riječ o konjugiranim spojevima potrebno je provesti hidrolizu. U uparene uzorke dodaje se 500 uL NaOH (2M), te se sav sadržaj volumenima NaOH od 500 uL kvantitativno prenese u staklene epruvete. Ukupni volumen NaOH iznosi 4 mL. Uzorci se nakon toga homogeniziraju na vortex-u i ostavljaju 4 sata na hidrolizi. Po završetku hidrolize uzorci se zakiseljavaju dodatkom 800 µL koncentrirane klorovodične kiseline, te se vrijednost pH korigira dodatkom NaOH (2 M ili 6 M) na ~ 2 . Slijedi dodatak 4 mL etil acetata, homogenizacija na vortex-u i centrifugiranje 10 minuta na 2000 o / min. Ekstrakcija s etil acetatom se ponovi još dva puta, a etil acetatne frakcije spoje i stave na uparavanje pod dušikom. Upareni uzorci se spremaju u zamrzivač na temperaturu od - 20 °C do analize. Za analizu se dodaje 100 µL metanola te homogenizira na vortex-u.

3.2.6.3. Ekstrakcija vezanih spojeva

U Eppendorf epruvete volumena 1.5 mL izvaže se 100 mg uzorka i doda 1 mL 80 %-tnog etanola. Ekstrakcija s etanolom se provodi kako je već opisano za slobodne i konjugirane spojeve. Slijedi dodatak 50 uL internog standarda ($c \sim 1,5 \text{ mg / mL}$), te hidroliza uz pomoć NaOH (kao kod konjugiranih spojeva). Ostatak postupka je identičan postupku za konjugirane spojeve. Za daljnju analizu uzoraka dodaje se 1 mL metanola i homogenizira na vortex-u.

3.2.7. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Reagensi:

- 1) Folin-Ciocalteu reagens
- 2) 20 %-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Aparatura i pribor:

- 1) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 2) Mikropipete volumena 10-100 μL i 100-1000 μL
- 3) Spektrofotometar (Analytik Jena, SPECORD 50 PLUS)

Postupak rada:

U kivete za spektrofotometrijsko mjerenje otpipetira se 400 μL destilirane vode, 15 μL uzorka za određivanje slobodnih i konjugiranih spojeva, odnosno 30 μL uzorka za određivanje vezanih spojeva, te 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute dodaju se 300 μL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te 1170 μL destilirane vode. Reakcijska smjesa u kivetama se dobro promiješa te se pripremljeni uzorci ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 15 ili 30 μL uzorka sadrži isti volumen metanola. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,9436 x + 0,0162$$

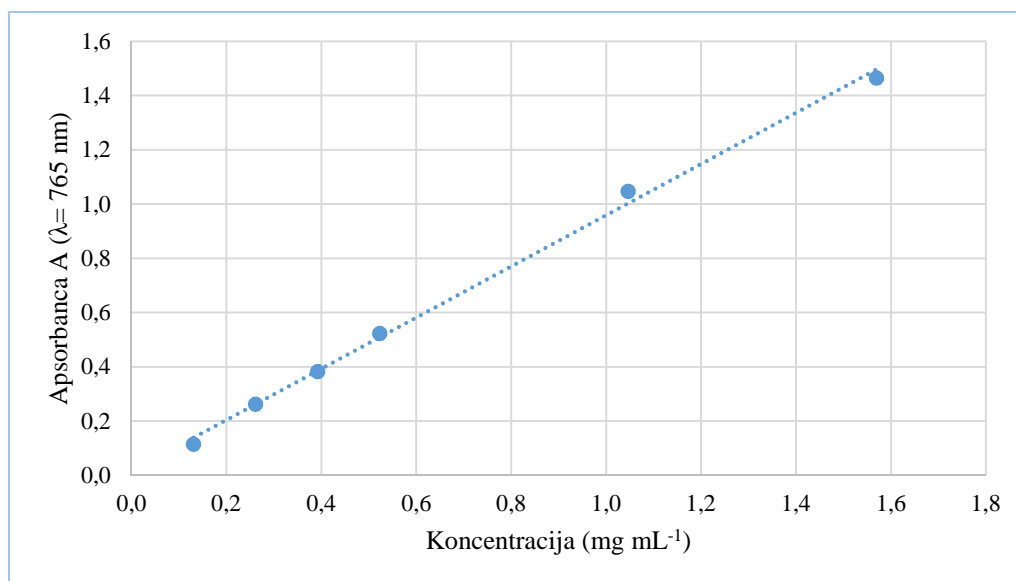
$$R^2 = 0,9972$$

gdje su:

x – koncentracija ukupnih polifenola (mg / mL)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg / L), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u 3 paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalentima galne kiseline (EGK) /g s. tv. uzorka (Yu i sur., 2002). Za izradu baždarnog pravca (Slika 4) pripremljena je otopina galne kiseline u metanolu u šest različitih koncentracija.



Slika 4. Baždarna krivulja za ukupne fenolne spojeve

3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva provedeno je korištenjem DPPH (1,1 - difenil - 2 - pikrilhidrazil), ABTS i FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metode.

3.2.8.1. FRAP metoda

Princip metode:

Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa Fe (III) - TPTZ u intenzivno plavi kompleks Fe (II) - TPTZ pri niskom pH. Reakcija se odvija u prisutnosti antioksidansa koji donira elektron te se spektrofotometrijski mjeri na valnoj duljini od 593 nm na kojoj kompleks pokazuje intenzivno obojenje (Benzie i Strain, 1996, Ou i sur., 2002). Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa.

Reagensi:

- 1) Trolox (6 - hidroksi - 2, 5, 7, 8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina)
- 2) 20 mM otopina $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- 3) 10 mM otopina TPTZ (2, 4, 6 - Tris (2 piridil) - s - triazin)
- 4) 40 mM otopina klorovodične kiseline
- 5) 300 mM otopina acetatnog pufera

Aparatura i pribor:

- 1) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 2) Mikropipete volumena 10 - 100 μL i 100 - 1000 μL
- 3) Pipete (5 mL i 20 mL)
- 4) Spektrofotometar (Analytik Jena, SPECORD 50 PLUS)

Postupak rada:

Smjesa od 2,5 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 mL TPTZ u 40 mM HCl i 20 mL 300 mM acetatnog pufera se neposredno prije upotrebe zagrije na temperaturu od 37 °C i pri toj temperaturi održava. Ova smjesa predstavlja FRAP reagens. U mikrokiveti se pomiješa 10 μL ekstrakta prosa i 1 mL FRAP reagensa te se nakon 4 minute izmjeri apsorbancija pri 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 10 μL uzorka sadrži isti volumen metanola. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

$$Y = 1,585 x + 0,0142$$

$$R^2 = 0,9999$$

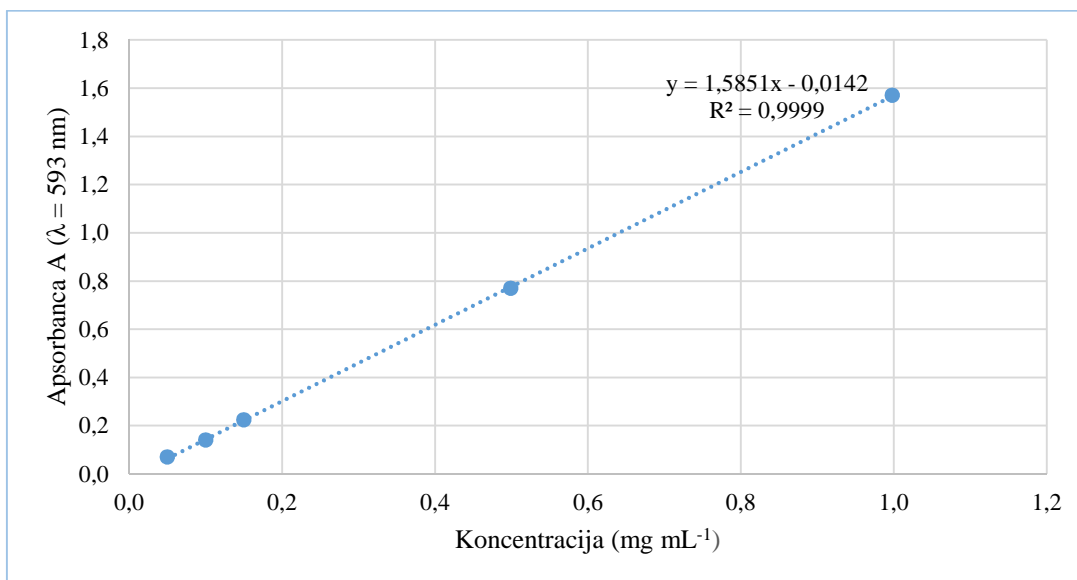
gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a ($\mu\text{g} / \text{mL}$)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Troloxa, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/mL), određuje se antioksidacijska aktivnost u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je u tri paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u μmol Troloxa/g s.tv. uzorka.

Za izradu baždarnog pravca (Slika 5) pripremljena je otopina Troloksa (6 – hidroks i- 2, 5, 7, 8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) u metanolu u pet različitih koncentracija (Benzie i Strain, 1996; Čukelj i sur., 2015).



Slika 5. Baždarna krivulja za FRAP

3.2.8.2. ABTS metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Reagensi:

- 1) 7 mM otopina 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS)
- 2) 140 mM otopina kalijevog persulfata
- 3) Etanol (96 %-tni)

Aparatura i pribor:

- 1) Pipeta volumena 10 mL
- 2) Mikropipeta volumena 100 μ L
- 3) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 4) Spektrofotometar (Analytik Jena, SPECORD 50 PLUS)

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS⁺ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 μ L otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1 : 0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12 - 16 h) na sobnoj

temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96 %-tnim) do konačne koncentracije ABTS⁺ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,700 \pm 0,02$. Volumen od 20 μL uzorka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS⁺ radikala u kivetu za spektrofotometrijsko mjerenje te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzorka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 4 mL otopine ABTS⁺ radikala pomiješa s istom količinom metanola. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 1,238x - 0,0025$$

$$R^2 = 0,9999$$

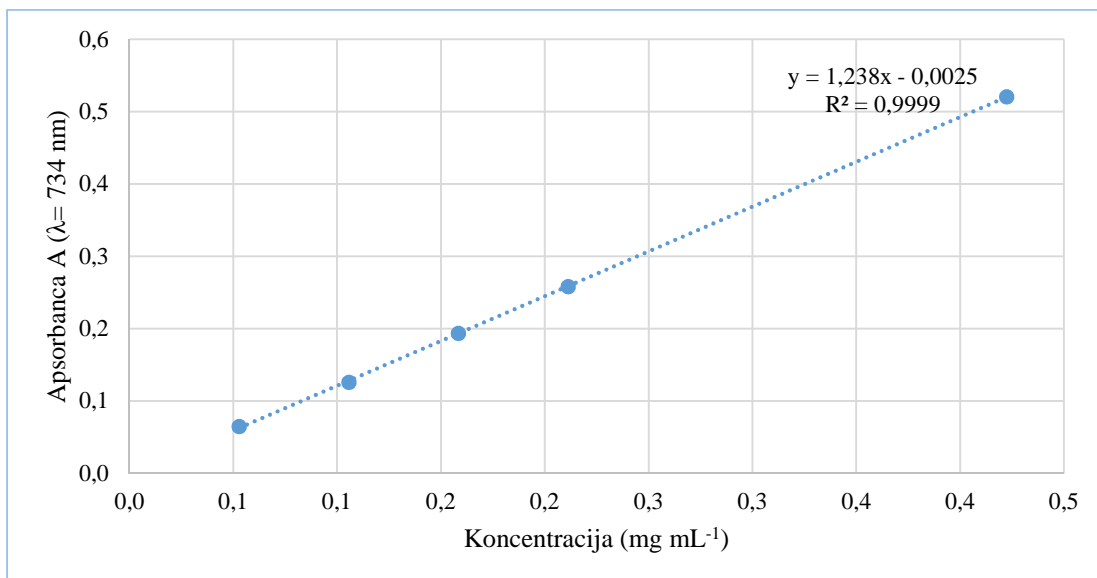
gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol / L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg / mL), određuje se antioksidacijska aktivnost u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom provedeno je u tri paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u μmol Troloxa / g s. tv. uzorka.

Za izradu baždarnog pravca (Slika 6) pripremljena je otopina Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u metanolu u pet različitih koncentracija (Benzie i Strain, 1996; Čukelj i sur., 2015).

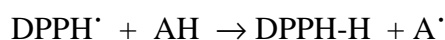


Slika 6. Baždarna krivulja za ABTS

3.2.8.3. DPPH metoda

Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbanacije u opadanju (Brand - Williams i sur., 1995).



Reagensi:

- 1) Trolox
- 2) 0,06 mM otopina 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (Sigma)
- 3) Metanol

Aparatura i pribor:

- 1) Mikropipeta volumena 100 μL
- 2) Analitička vaga
- 3) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 4) Spektrofotometar (Analytik Jena, SPECORD 50 PLUS)

Postupak rada:

Pripremi se 0,06 mM otopina 2,2 - difenil - 2 - pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U mikrokivetu za spektrofotometrijsko mjerenje se otpipetira 20 μL ekstrakta prosa za određivanje antioksidacijskog kapaciteta slobodnih i konjugiranih spojeva, odnosno 50 μL ekstrakta prosa za određivanje antioksidacijskog kapaciteta vezanih spojeva i doda 950 μL otopine DPPH te se nakon 30 minuta po dodatku otopine DPPH mjeri apsorbancija pri 517 nm. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 950 μL otopine DPPH pomiješa s istom količinom metanola. U drugu Izračunom postotka redukcije dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 314,41 x - 3,5734$$

$$R^2 = 0,9962$$

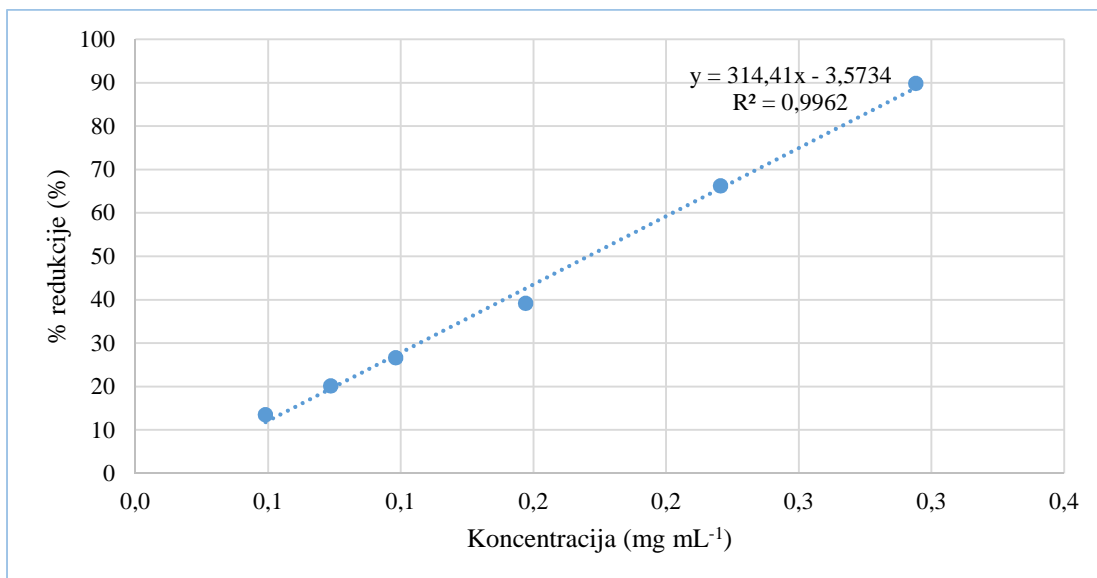
gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 517 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je u tri paralelene probe (n = 3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u μmol Troloxa/g.s.tv. uzorka.

Za izradu baždarnog pravca (Slika 7) pripremljena je otopina Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u metanolu u pet različitih koncentracija (Benzie i Strain, 1996; Čukelj i sur., 2015).



Slika 7. Baždarna krivulja za DPPH

3.2.9. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu i izradu grafičkih prikaza eksperimentalnih podataka korišteni su Microsoft Office Excel 2013 i Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka korištena je analiza varijance (ANOVA) s Tukey post-hoc testom. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za $p \leq 0,05$. Faktorska analiza varijance provedena je kako bi se utvrdio utjecaj dvije nezavisne varijable (vremena i načina mljevenja) kao i njihovih interakcija, na veličinu čestica te bioaktivne spojeve posija prosa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pregledom baza podataka znanstvenih radova uočeno je kako se utjecaj mljevenja na kugličnom mlinu uz primjenu kriogenog hlađenja istraživao na sirovinama kao što su pšenica i riža, dok njihov utjecaj na bioaktivni profil prosa i posija prosa do sada nije uopće istraživan. Stoga se u ovom radu ispitivao utjecaj postupka mljevenja bez i sa primjenom kriogenog hlađenja na raspodjelu veličine čestica posija prosa, sadržaj ukupnih polifenola, kao i slobodne bioaktivne spojeve i antioksidanse prosa. Također, ispitan je i utjecaj vremenskog trajanja samog mljevenja.

4.1. Vlakna i profil bioaktivnih komponenti u korištenim posijama prosa

Za ispitivanje utjecaja načina i vremena mljevenja odabrana je frakcija posija dobivena prosijavanjem na situ od 500 μm , a za koju se pokazalo da ima prehrambeno vrijedan sastav karakteriziran visokim udjelom masti, proteina i pepela (Tablica 4) te vrlo vjerojatno sadrži aleuronski sloj. Osim toga, u ovom diplomskom radu utvrđeno je da korištena frakcija posija sadrži oko 34 % netopljivih i topljivih vlakana (Tablica 5), a obiluje i visokim udjelom bioaktivnih spojeva (tablica 6).

Rezultati dobiveni spektrofotometrijskom analizom ekstrakata prikazuju ukupnu količinu fenolnih spojeva (TPC) i antioksidacijsku aktivnost u navedenim uzorcima. Ukupna količina fenolnih spojeva određena je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa dok je antioksidacijska aktivnost određena pomoću ABTS, DPPH i FRAP metode. Dobiveni rezultati za ukupnu količinu fenolnih spojeva prikazani su kao mg GAE po g uzorka, a rezultati za antioksidacijsku aktivnost kao μmol Troloksa po g uzorka.

Tablica 5. Sadržaj prehrambenih vlakana prosa (% na suhu tvar)

Uzorak	Vlakna		
	Netopljiva	Topljiva	Ukupna
Posije < 500 μm	33,85 \pm 0,50	0,47 \pm 0,14	34,32 \pm 0,65

Tablica 6. Ukupni fenolni spojevi posija prosa (TPC) i antioksidacijska aktivnost određena DPPH, ABTS i FRAP metodama (izraženo na suhu tvar)

Spojevi	TPC [mg GAE g ⁻¹]	DPPH [μmol Trolox g ⁻¹]	ABTS [μmol Trolox g ⁻¹]	FRAP [μmol Trolox g ⁻¹]
Slobodni	0,48 ± 0,01	0,41 ± 0,00	0,95 ± 0,04	1,74 ± 0,12
Konjugirani	0,64 ± 0,07	0,70 ± 0,11	1,58 ± 0,14	3,08 ± 0,14
Vezani	0,76 ± 0,04	1,94 ± 0,06	1,36 ± 0,39	2,85 ± 0,24

U tablici 6 je prikazan udio slobodnih (S), konjugiranih (K) i vezanih (V) oblika bioaktivnih spojeva ispitivanih posija običnog prosa. Iz dobivenih rezultata za sadržaj ukupnih fenola vidi se kako najveći udio čine vezani (40,5 %), zatim nešto manji konjugirani (33,9%), te u konačnici najmanji udio slobodni spojevi (25,6 %). Isti trend prate i rezultati za DPPH metodu i ABTS metodu. Jedino rezultati dobiveni provedbom FRAP metode prikazuju najveći udio konjugiranih oblika bioaktivnih spojeva (40,2 %). Ovakva dominacija vezanih spojeva je bila očekivana jer se u literaturi navodi da većinski udio polifenola prosa čine spojevi vezani glikozidnim i esterskim vezama za polimere staničnih stijenki (Fardet i sur., 2008; Devi i sur., 2011; Arendt i Zannini, 2013). Ipak, sam udio ovih spojeva ovisi o vrsti i varijetetu prosa (Chandrasekara i Shadidi, 2011). Uz to, Rao i Muralikrishna (2002) su u svojem istraživanju dokazali kako, od fenolnih kiselina najveći udio spojeva u vezanom obliku čini ferulinska kiselina, a u slobodnom obliku protokatehnična kiselina.

4.2. Utjecaj mljevenja na raspodjelu veličine čestica posija prosa

Raspodjela veličine čestica određena je metodom laserske difrakcije uz upotrebu jedinice za suhu disperziju, a definirana je vrijednostima parametara raspodjele veličine čestica - D [3,2], d (0,1), d (0,5), d (0,9), te je promatran raspon (span) raspodjele veličine čestica. Rezultati mjerenja za uzorke običnog prosa prikazani su u tablici 7, te na slikama 8 i 9. Parametar D [3,2] je Sauterov promjer i on predstavlja površinski ekvivalentni promjer, koji u slučaju tretiranog prosa ima manju vrijednost kod čestica manje veličine. 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.

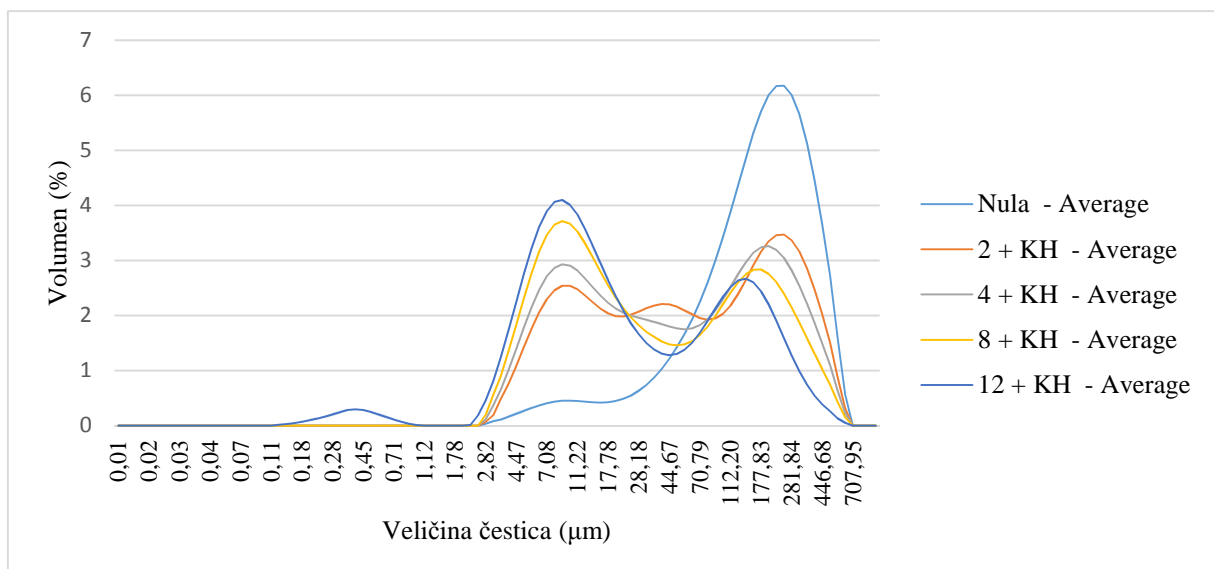
Za čestice s užom distribucijom, manja je vrijednost raspona. U slučaju posija prosa, raspon se povećavao s duljim vremenom mljevenja, osim u slučaju mljevenja bez kriogenog hlađenja u trajanju 12 minuta.

Tablica 7. Parametri raspodjele veličine čestica uzorka mljevenog bez i uz primjenu kriogenog hlađenja (KH)

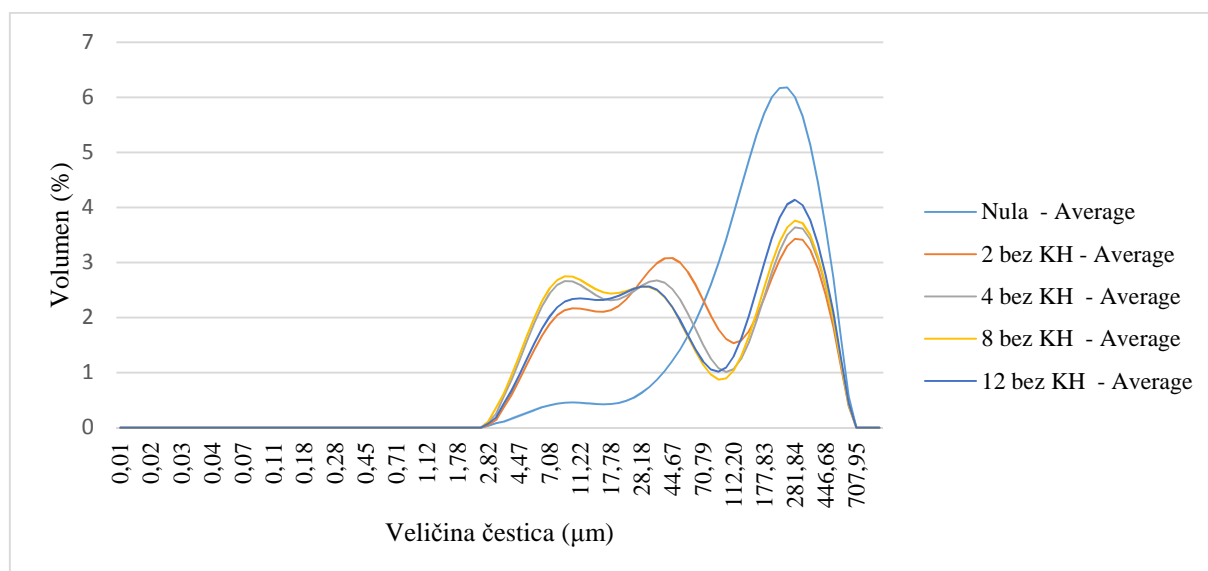
UZORAK	D [3,2] (μm)	d (0,1) (μm)	d (0,5) (μm)	d (0,9) (μm)	Raspon (<i>span</i>)
Nula	65,75 \pm 3,53	38,84 \pm 3,28	171,45 \pm 3,25	382,61 \pm 2,78	2,01 \pm 0,04
2 min bez KH	22,86 \pm 0,28	7,87 \pm 0,08	50,47 \pm 1,11	337,29 \pm 2,92	6,53 \pm 0,09
4 min bez KH	19,29 \pm 0,10	6,73 \pm 0,03	41,84 \pm 0,50	344,28 \pm 2,40	8,07 \pm 0,05
8 min bez KH	18,57 \pm 1,07	6,52 \pm 0,24	39,57 \pm 5,18	345,99 \pm 7,53	8,58 \pm 0,93
12 min bez KH	22,00 \pm 0,23	7,51 \pm 0,05	53,81 \pm 2,05	353,61 \pm 1,43	6,43 \pm 0,22
2 min + KH	20,82 \pm 0,49	7,04 \pm 0,09	56,34 \pm 4,19	316,80 \pm 5,38	5,50 \pm 0,31
4 min + KH	18,03 \pm 0,54	6,33 \pm 0,11	45,96 \pm 4,56	282,70 \pm 6,37	6,01 \pm 0,46
8 min + KH	14,74 \pm 0,02	5,64 \pm 0,01	26,29 \pm 0,30	242,20 \pm 1,14	8,99 \pm 0,11
12 min + KH	5,92 \pm 0,04	4,59 \pm 0,01	16,75 \pm 0,31	178,63 \pm 4,07	10,39 \pm 0,18

Parametar raspodjele čestica kod netretiranih posija iznosi oko 39 μm , dok se mljevenjem bez kriogenog hlađenja njegova vrijednost smanjuje, i to primjerice nakon 12 minuta je vrijednost više od 5 puta manja. Bitno je napomenuti kako se vrijednost $d(0,1)$ smanjuje do vremenskog intervala mljevenja od 8 minuta, a nakon toga u 12 minuti poraste. Ovakav ishod može se objasniti aglomeracijom vlažnih čestica posija uslijed povećanja temperature (Sharif i sur., 2013). Nasuprot toga, vrijednost $d(0,1)$ mljevenjem uz kriogeno hlađenje pada i nakon 8 minute, pa nakon 12 minuta mljevenja iznosi oko 5 μm . Značajna promjena $d(0,1)$ vrijednosti postiže se već nakon 2 min mljevenja bez primjene i uz primjenu kriogenog hlađenja, kada su u oba slučaja postignute vrijednosti od oko 7 μm .

Parametar raspodjele čestica $d(0,9)$ kod netretiranih posija iznosi oko 383 μm , a mljevenjem bez kriogenog hlađenja u vremenu od 12 minuta ta vrijednost se smanjuje za 50 μm . Mljevenjem uz kriogeno hlađenje postiže se veći učinak, te $d(0,9)$ nakon 12 minuta tretiranja pada za čak 204 μm . To znači da je 90 % čestica netretiranih posija manje od 382,61 μm , nakon mljevenja bez kriogenog hlađenja manje su od 353,61 μm , a primjenom kriogenog hlađenja od 178, 63 μm . Oznaka "bez KH" označava postupak mljevenja bez primjene kriogenog hlađenja, oznaka "+ KH" označava mljevenje uz smrzavanje tekućim dušikom (kriogeno mljevenje), a Nula označava native nemljevene posije prosa. Brojke 2, 4, 8, 12 predstavljaju vrijeme tretmana.



Slika 8. Raspodjela čestica posija običnog prosa mljevenog uz primjenu kriogenog hlađenja

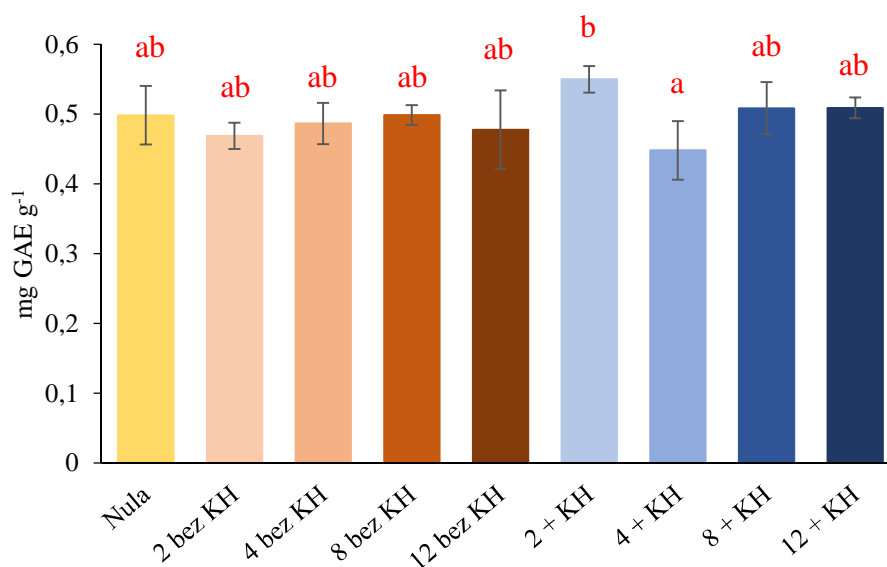


Slika 9. Raspodjela čestica posija običnog prosa tretiranog mljevenjem bez primjene kriogenog hlađenja

Na slikama 8 i 9 se i vizualno vidi kako duži tretman mljevenja dovodi do smanjenja veličine čestica, pri čemu je u slučaju primjene smrzavanja tekućim dušikom pomak krivulje prema manjim veličinama čestica bio izraženiji.

4.3. Udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost u mljevenim posijama prosa

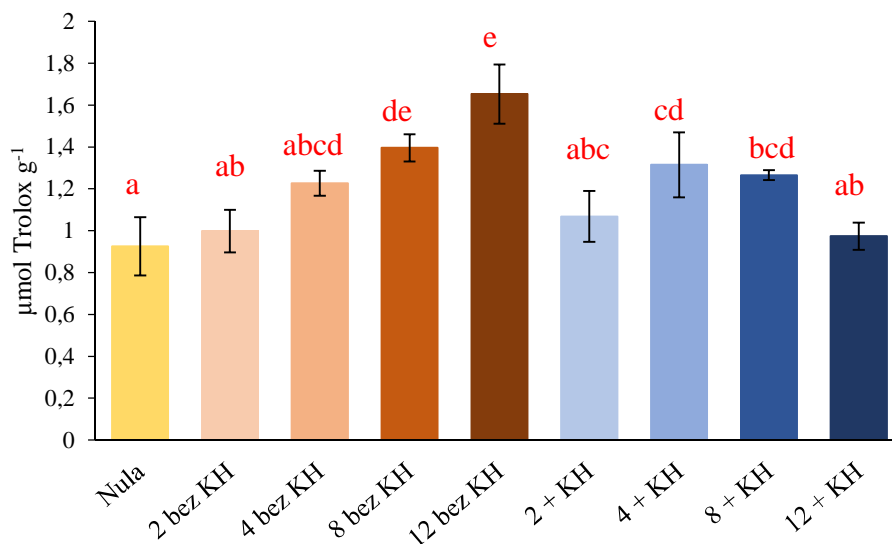
Na sljedećim slikama prikazani su ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost posija prosa izmjerena FRAP, ABTS i DPPH metodom. U ovom dijelu diplomskog rada analizirani su samo slobodni spojevi, budući da se htio ispitati potencijal mehaničkog oslobađanja bioaktivnih spojeva iz posija prosa intenzivnim usitnjavanjem na kugličnom mlinu. Smeđim tonovima su označeni uzorci mljeveni bez kriogenog hlađenja, a plavim tonovima oni kriogeno mljeveni, dok se intenzitet boje pojačava s vremenom mljevenja.



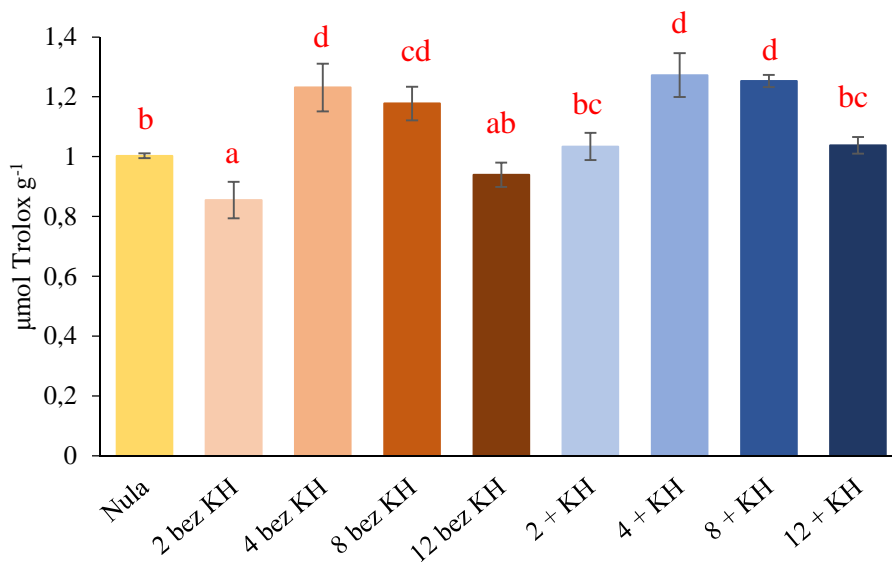
Slika 10. Sadržaj ukupnih slobodnih fenolnih spojeva u posijama prosa mljevenima bez i uz primjenu kriogenog hlađenja (KH). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$).

Na slici 10, rezultati dobiveni za sadržaj ukupnih fenola prosa pokazuju kako se najbolji učinak oslobađanja ukupnih polifenola postiže mljevenjem uz kriogeno hlađenje u trajanju od 2 minute, pri čemu koncentracija TPC iznosi $0,550 \text{ mg GAE g}^{-1}$ uzorka (s. tv.), iako ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na native netretirane posije (Nula). S druge strane, najslabiji učinak postiže se istim tretmanom, ali u trajanju od 4 minute ($0,448 \text{ mg GAE g}^{-1}$ uzorka (s. tv.)). Također, vidljivo je da ne postoji statistički značajna razlika između količine TPC-a u prosu tretiranom mljevenjem bez kriogenog hlađenja i uz kriogeno hlađenje. Dobiveni visoki udjeli ukupnih polifenola u tretiranim posijama se slažu sa pregledanom literaturom, budući da su Hag i suradnici (2002), Awika i suradnici (2005) te Chandrasekara i Shadidi (2011) u svojim istraživanjima zaključili kako ljuštenje zrna prosa dovodi do smanjenja sadržaja ukupnih fenola zrna jer se oni većinskim udjelom nalaze u vanjskim slojevima samoga zrna, odnosno odvajaju se u posije.

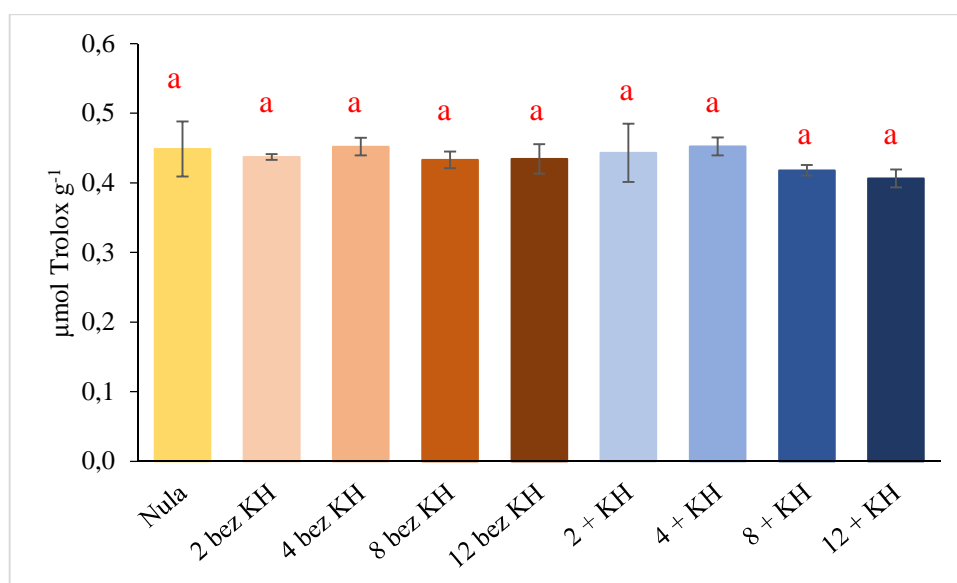
Na slikama 11, 12 i 13 prikazani su rezultati za antioksidacijski kapacitet ekstrakta prosa određen FRAP, ABTS i DPPH metodama.



Slika 11. Antioksidacijski kapacitet posija prosa mljevenih bez i uz primjenu kriogenog hlađenja (KH) određen FRAP metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$)



Slika 12. Antioksidacijski kapacitet posija prosa mljevenih bez i uz smrzavanje tekućim dušikom određen ABTS metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$)



Slika 13. Antioksidacijski kapacitet prosa mljevenog bez i uz primjenu kriogenog hlađenja određen DPPH metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$)

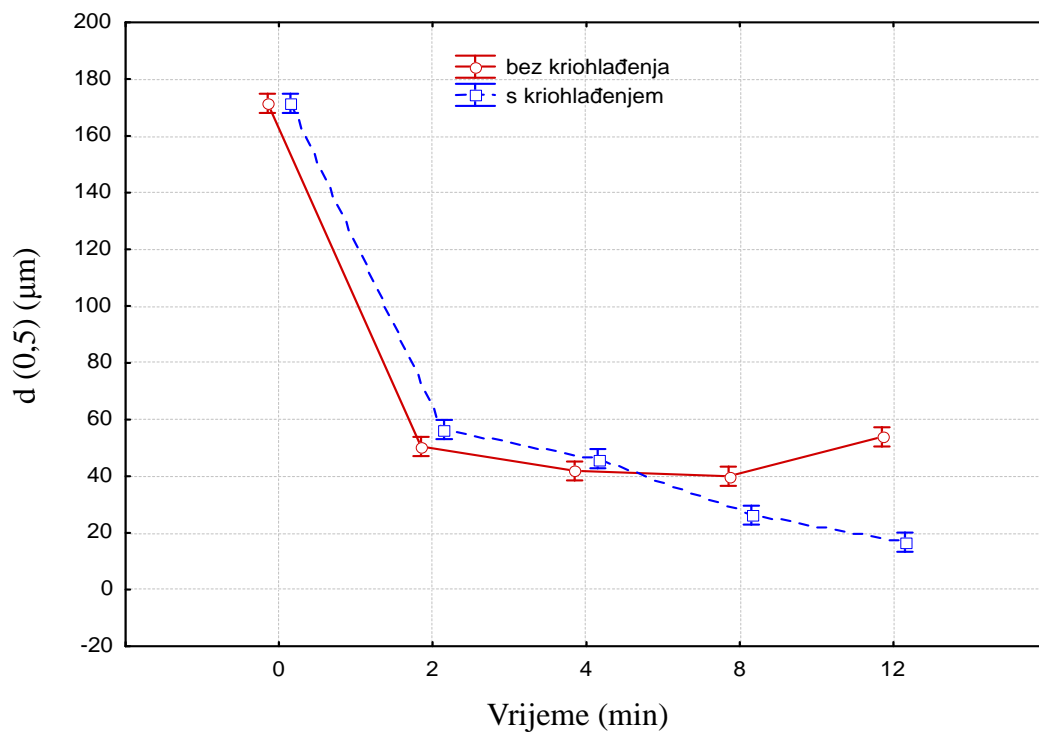
Iz rezultata dobivenih FRAP metodom može se primjetiti kako je najveća antioksidacijska aktivnost postignuta kod tretmana prosa mljevenjem bez primjene kriogenog hlađenja u trajanju od 12 minuta, pri čemu vrijednost iznosi $1,652 \mu\text{mol Troloksa g}^{-1}$. Najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena ABTS metodom dobivena je pri tretmanu prosa mljevenjem uz primjenu kriogenog hlađenja u trajanju od 4 minute ($1,272 \mu\text{mol Troloksa g}^{-1}$), kao i rezultati dobiveni Folin-Ciocalteu reagensom. Iz rezultata dobivenih DPPH metodom vidi se kako mljevenje ima negativan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost jer se ona s dužim vremenom tretiranja statistički beznačajno, ali blago smanjivala, neovisno da li je mljevenje provođeno bez ili uz primjenu kriogenog hlađenja. Dodatno, može se zaključiti kako primjena mljevenja uz kriogeno hlađenje ne utječe značajno pozitivno na ekstrakciju polifenolnih spojeva i antioksidansa jer se slične vrijednosti postižu i mljevenjem bez kriogenog hlađenja.

4.4. Faktorska analiza varijance

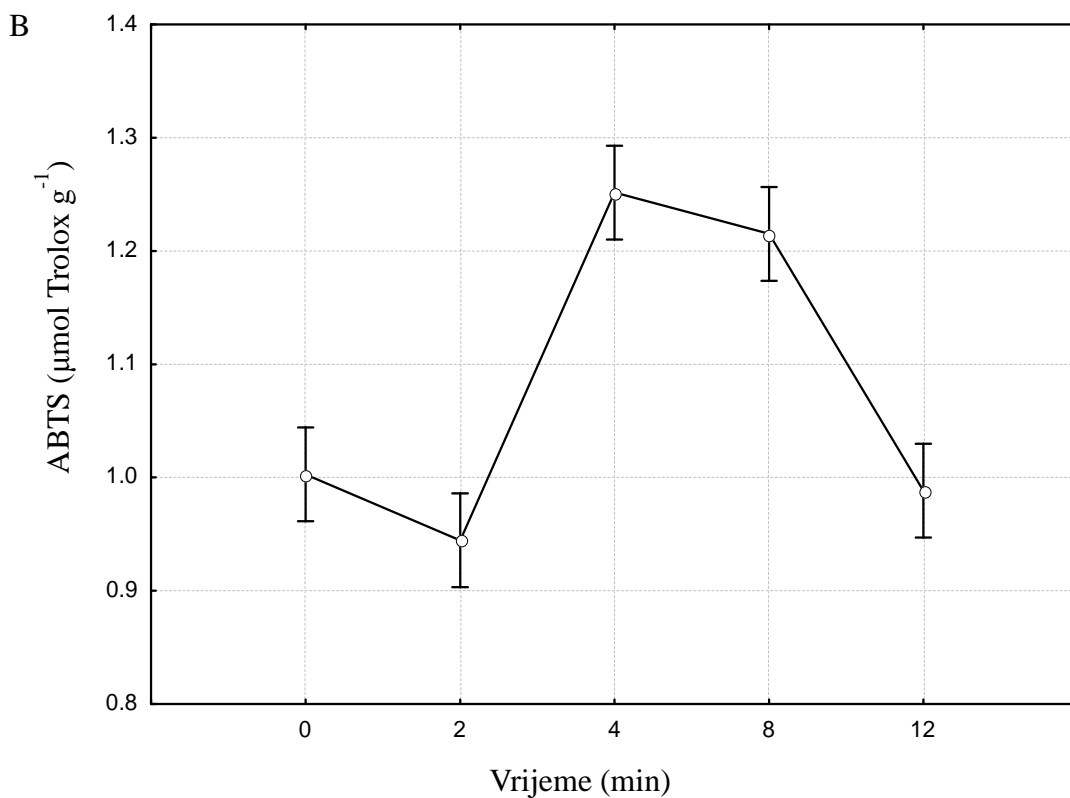
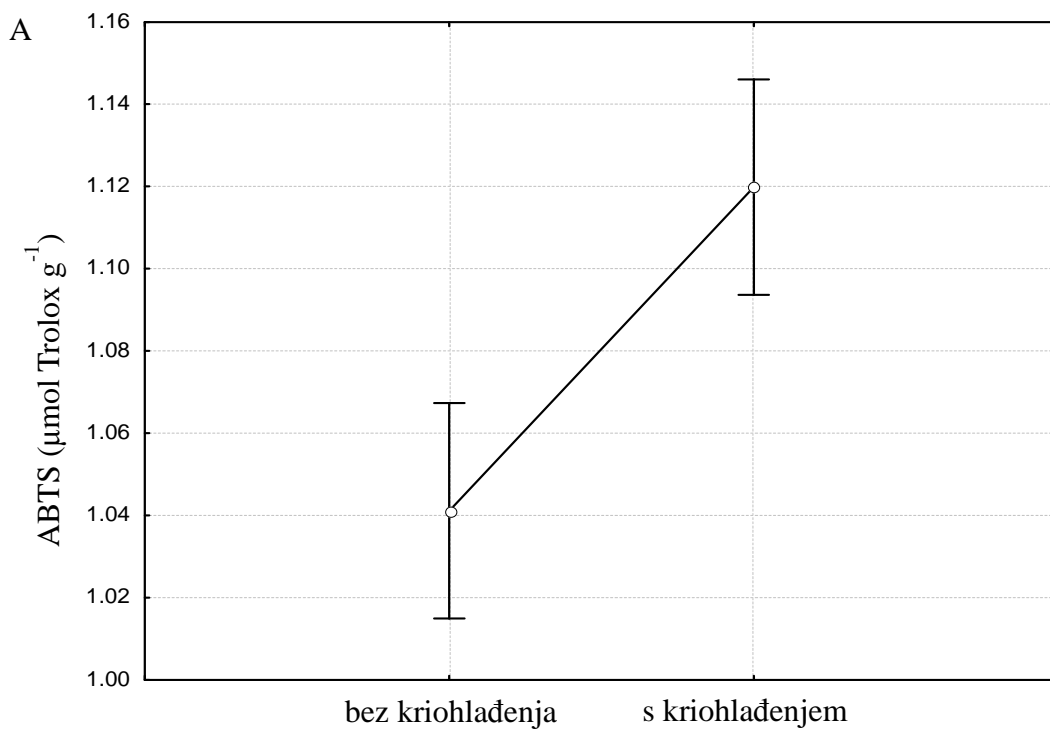
Faktorska analiza varijance provedena je na dobivenim rezultatima te su značajni utjecaji ($p \leq 0,05$) prikazani na slikama 14, 15 i 16. Na slici 14 prikazan je utjecaj načina i vremena mljevenja na veličinu čestica, odnosno parametar raspodjele veličine čestica $d(0,5)$, pri čemu je isti trend uočen i za druge parametre ($d(0,1)$, $d(0,9)$, span, $D[3,2]$). Vidljivo je

kako vrijednost ovog parametar bez primjene kriogenog hlađenja pada do osme minuta, nakon čega pokazuje blagi porast. Primjena kriogenog hlađenja uzrokuje pad vrijednosti za $d(0,5)$, i to sa 171,45 μm netretiranih posija prosa na 16,75 μm posija tretiranih 12 minuta. Odnosno, 50 % čestica netretiranih posija prosa ima promjer manji od 171,45 μm , dok taj promjer nakon 12 minuta uz primjenu kriogenog hlađenja iznosi 16,75 μm .

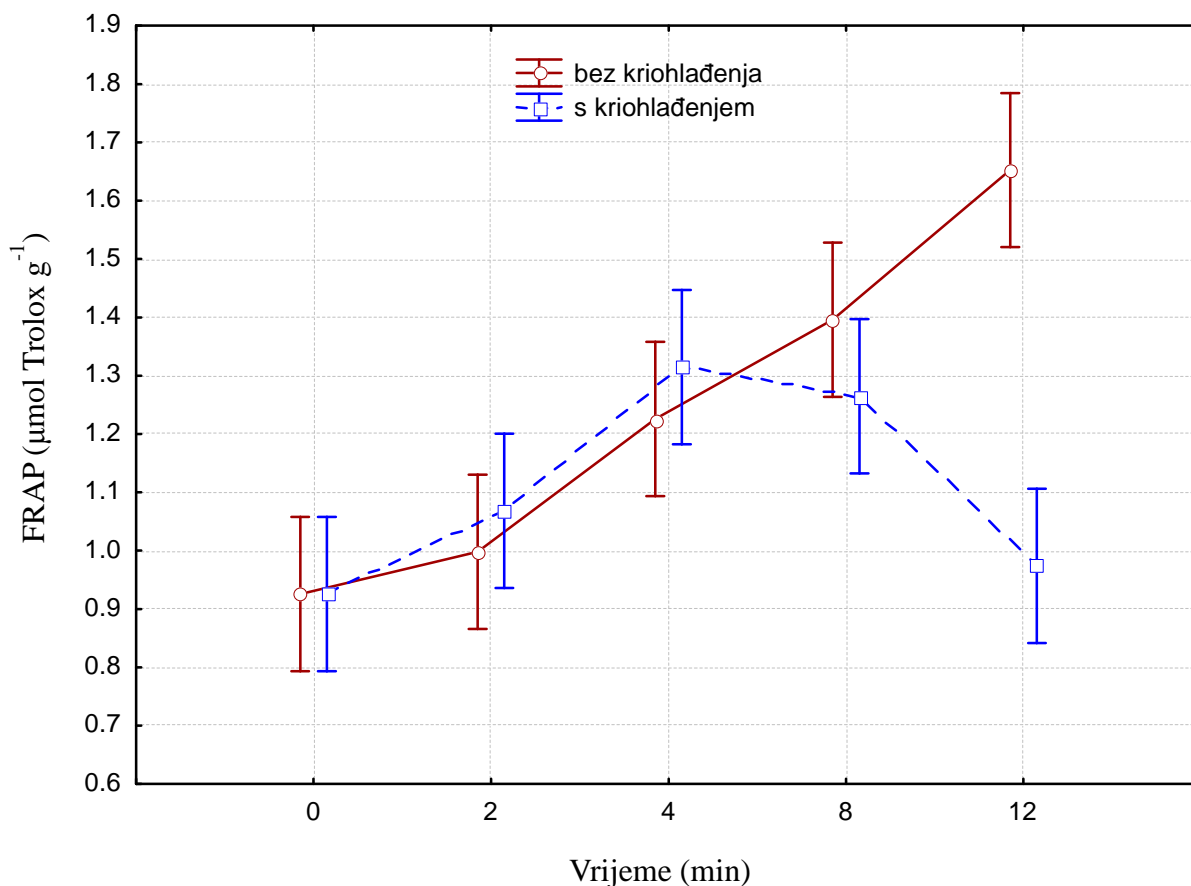
Na slikama 15 i 16 prikazan je utjecaj uvjeta (bez i uz primjenu kriogenog hlađenja) i vremena mljevenja na antioksidacijsku aktivnost tretiranih posija prosa određenu ABTS (Slika 15 A i B) i FRAP (Slika 16) metodom.



Slika 14. Utjecaj uvjeta mljevenja (sa i bez primjene kriogenog hlađenja) i vremena mljevenja na parametar raspodjele veličine čestica $d(0,5)$



Slika 15. Utjecaj uvjeta mljevenja (A) i vremena mljevenja (B) na antioksidacijsku aktivnost posija prosa izmjerenu ABTS metodom



Slika 16. Utjecaj uvjeta mljevenja (sa i bez primjene kriogenog hlađenja) i vremena mljevenja na antioksidacijsku aktivnost posija prosa izmjerenu FRAP metodom

Iz dobivenih rezultata faktorske analize varijance može se zaključiti kako je kod FRAP metode značajan utjecaj interakcije uvjeta i vremena mljevenja, a kod ABTS-a samo pojedinih faktora. Kod TPC-a i DPPH nije utvrđen značajan utjecaj niti jednog faktora.

Iako se i ABTS i FRAP i DPPH metodama određuje antioksidacijska aktivnost, ti testovi baziraju se na različitim kemijskim načelima pa je potrebno provesti više testova kako bi se obuhvatio širi raspon antioksidansa prisutnih u hrani (Apak i sur., 2013). Bitno je znati kolika je korelacija između pojedinih testova za određivanje antioksidacijske aktivnosti, obzirom na to da bi se oni trebali međusobno nadopunjavati. Između primjenjenih testova za određivanje antioksidacijske aktivnosti nije utvrđena korelacija, kao niti između njih i testa za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih spojeva u prosu. Nepostojanje značajne korelacije između ABTS, FRAP i DPPH metode sa izmjerenim ukupnim fenolnim spojevima može se pripisati mogućnosti da neki spojevi koji se ne detektiraju primjenom Folin-Ciocalteu metode sudjeluju

u antioksidacijskim reakcijama. Jedina značajna korelacija ($r = 0,86$, $p \leq 0,05$) uočena je kod rezultata za ABTS i FRAP metode u slučaju primjene mljevenja uz kriogeno hlađenje.

DPPH metoda temelji se na mehanizmu prijenosa elektrona, ali i vodikovog atoma pa predstavlja bolju metodu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na FRAP metodu (Pérez-Jiménez i sur., 2008). Povećanjem koncentracije ili stupnja hidroksilacije fenolnih spojeva, aktivnost uklanjanja DPPH radikala također se povećava (Zhou i Yu 2004). Kod DPPH metode koristi se radikal otopljen u organskom mediju pa je ova metoda primjenjiva na hidrofobnim spojevima (Kim i sur., 2002). S druge strane, FRAP test obično se koristi za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta hidrofilnih spojeva (Pérez-Jiménez i sur., 2008). ABTS metoda se pak temelji na stvaranju plavo - zelenog $ABTS^+$ radikala i prikladna je za određivanje antioksidacijske aktivnosti i hidrofilnih i hidrofobnih spojeva (Kim i sur., 2002). Upravo iz ovih razlika proizlaze različiti rezultati za antioksidacijski kapacitet ekstrakta tretiranih posija prosa.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata koji su dobiveni u okviru ovog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Korištena frakcija posija običnog prosa sorte Sonček sadrži oko 34 % netopljivih i 0,5% topljivih vlakana te sadrži visok udio ukupnih fenolnih spojeva (0,49 mg GAE g⁻¹) i ima visoku antioksidacijsku aktivnost.
2. Mljevenje posija običnog prosa bez i uz primjenu kriogenog hlađenja dovodi do smanjenja veličine čestica, pri čemu je manja veličina čestica dobivena korištenjem kriogenog hlađenja.
3. Vrijeme mljevenja utječe na veličinu čestica koja se smanjuje s duljim trajanjem, osim u slučaju mljevenja bez kriogenog hlađenja kada nakon 12 minuta dolazi do porasta veličina čestica uslijed stvaranja aglomerata.
4. U posijama prosa tretiranog mljevenjem bez primjene kriogenog hlađenja i uz primjenu kriogenog hlađenja nema statistički značajne razlike između količine TPC, neovisno o vremenu mljevenja.
5. Izmjerena antioksidacijska aktivnost ovisi i o načinu i o vremenu mljevenja (2, 4, 8 ili 12 minuta), no isto tako ovisi i o korištenoj metodi (DPPH, ABTS ili FRAP).
6. Način mljevenja niti njegovo trajanje nisu utjecali na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom.
7. Najviša antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom dobivena je kod tretmana prosa mljevenjem bez primjene kriogenog hlađenja u trajanju od 12 minuta, pri čemu vrijednost iznosi 1,652 μmol Troloksa g⁻¹.
8. Najviša antioksidacijska aktivnost izmjerena ABTS metodom izmjerena je u uzorcima posija prosa mljevenima uz primjenu kriogenog hlađenja u trajanju od 4 minute (1,272 μmol Troloksa g⁻¹).

9. Između FRAP, ABTS i DPPH metode za utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti nije utvrđena korelacija, kao niti između njih i testa za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih spojeva u prosu.
10. Općenito, u usporedbi s nativnim posijama, mljevenje nema utjecaj ili povišuje antioksidacijsku aktivnost posija prosa. Mljevenje u trajanju 4 ili 8 minuta (uz ili bez primjene kriogenog hlađenja) bi moglo biti optimalno vrijeme mljevenja za dobivanje uzorka s najvišim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti.
11. Obzirom na troškove primjene kriogenog hlađenja možemo zaključiti kako kriogeno mljevenje ne postiže značajno povoljan učinak na ekstrakciju polifenolnih spojeva i antioksidansa jer se slične vrijednosti mogu postići i mljevenjem bez kriogenog hlađenja.

6. LITERATURA

AACC International Method 32 - 05 .01, Total Dietary Fiber.

AACC International Method 32 - 21. 01, Insoluble and Soluble Dietary Fiber in Oat Products.

AACC Method 46 - 12, 9th Ed., Vol. 2. Crude Protein - Kjeldahl Metoda, Boric Acid Modification.

Ačko, D. K., Šantavec, I., Cvetkov, M. (2012) Production of common millet (*Panicum miliaceum* L.) in Slovenia and effect of sowing time and sowing density on grain yield of the 'Sonček' cultivar. *J. Food Agric. Environ.* **10** (1), 417 - 422.

Aljadi, A. M., Kamaruddin, M. Y. (2004) Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* **85**, 513 - 518.

Ammar, R. B., Bhourri, W., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhleb, I., Kilani, S., Mariotte, A. M., Chekir – Ghedira, L., Dijoux – Franca, M. G., Ghedira, K. (2009) Antioxidant and free radical – scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure – activity relationship study. *Food Chem.* **116**, 258 - 264.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., Güçlü, K. (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **85** (5), 957 - 998.

Arendt, E. K., Zannini, E. (2013) Cereal grains for the food and beverage industries, Woodhead Publishing Limited, str. 312 - 349.

Awika, J. M., Rooney, L. W., Ralph, D., Waniska, R. D. (2004) Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chem.* **90**, 293 - 301.

Awika, J. M., McDonough, C. M., Rooney, L. W. (2005) Decorticating sorghum to concentrate healthy phytochemicals. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 6230 - 6234.

- Bagdi, A., Balázs, G., Schmidt, J., M. Szatmári, M., Schoenlechner, R., E. Berghofer, E., Tömöskö zia., S. (2011) Protein characterization and nutrient composition of Hungarian proso millet varieties and the effect of decortication. *Acta Aliment. Hung.* **40**, 128 - 141.
- Badau, M. H., Nkama, I., Jideani, I. A. (2005) Phytic acid content and hydrochloric acid extractability of minerals in pearl millet as affected by germination time and cultivar. *Food Chem.* **92**, 425 - 435.
- Bell, L. N. (2001) Stability testing of nutraceuticals and functional foods. U: Handbook of nutraceuticals and functional foods, (Wildman, R.E.C., ured.), CRC Press, New York, str. 501-516.
- 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.
- Benković, M. (2013) Fizikalno-kemijska i senzorska svojstva obogaćenih praškastih mješavina na bazi kave, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Benzie, I. F. F., Strain, J.J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem.* **239**, 70 - 76.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei Facino, R. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric / fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* **533**, 185 - 191.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25 - 30.
- Burda, S. i Oleszek, W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 2774 - 2779.
- Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2010) Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J. Agr. Food Chem.* **58**, 6706 - 6714.
- Chandrasekara, A., Shahidi F. (2011) Determination of antioxidant activity in infree and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Funct. Food.* **3**, 144 - 58.

Chandrasekara, A., Naczki, M., Shahidi, F. (2012) Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains. *Food Chem.* **133**, 1 - 9.

Chinma, C. E., Ramakrishnan, Y., Ilowefah, M., Hanis-Syazwani, M., Muhammad, K. (2015) Properties of Cereal Brans: A Review. *Cereal Chem.* **92** (1), 1-7.

Choi, S. W., Lee, S. K., Kim, E. O., Oh, J. H., Yoon, K. S., Parris, N., Hicks, K. B., Moreau, R. A. (2007) Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *J. Agr. Food Chem.* **55**, 3920 - 3925.

Čukelj, N., Ajredini, š., Krpan, M., Novotni, D., Voučko, B., Vrana Špoljarić, I., Hruškar, M., Čurić, D. (2015) Bioactives in organic and conventional milled cereal products from Croatian market. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.*, **10** (1-2), 23 - 30.

Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15** (10), 7313 - 7352.

Dendy, D. A. V. (1995) Sorghum and Millets: Chemistry and Technology. AACC, St. Paul, Minnesota, str. 406.

Devi, P. B., Vijayabharathi, R., Sathyabama, S., Malleshi, N. G., Priyadarisini, V. B. (2011) Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: A review. *J. Food Sci. Technol.* **51** (6), 1021 - 1040.

El Hag, M. E., El Tinay, A. H., Yousif, N. E. (2002) Effect of fermentation and dehulling on starch, total polyphenols, phytic acid content and in vitro protein digestibility of pearl millet. *Food Chem.* **77**, 193 - 196.

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. (2011) Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem.* **124**, 411 - 421.

Escarpa, A., Gonzalez, M. C. (2001) An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Anal. Chem.*, **31**, 57 - 139.

FAO (1995) Sorghum and Millets in Human Nutrition, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, str. 484.

FAO (Food and Agricultural Organization) (2012). Economic and Social Department: The Statistical Division. Statistics Division 2012. Available from FAO. <http://www.fao.org/statistics/en/>

Fardet, A., Rock, E., Rémésy, C. (2008) Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *J. Cereal Sci.* **48** (2), 258 - 276.

Foschia, M., Peressini, D., Sensidoni, A., Brennan, C. S. (2013) The effects of dietary fibre addition on the quality of common cereal products. *J. Cereal Sci.* **25**, 216 - 227.

Fuller, D. Q. (2006) A Millet Atlas: Some Identification Guidance. London: University College London.

Fung, T. (2002) Whole-grain intake and the risk of type 2 diabetes: a prospective study in men. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 535 - 40.

Gani, A., Wani, S. M., Masood, F. A., Gousia, H. (2012) Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: A review. *J. Food Proc. Technol.* **3**(3).

Goswami, T. K., Singh, K. K. (2003) Role of feed rate and temperature in attrition grinding of cumin. *J. Food Eng.* **59**, 289 - 290.

Habiyaremye, C., Matanguihan, J. B., D'Alpoim Guedes, J., Ganjyal, G. M., Whiteman, M. R., Kidwell, K. K., Murphy, K. M. (2017) Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) and Its Potential for Cultivation in the Pacific Northwest, U.S.:A Review. *Plant Sci.* **7**, 1 - 17.

Hadimani, N. A. i Malleshi, N. G. (1993) Studies on milling, physicochemical properties, nutrient composition and dietary fiber content of millets. *J. Food Sci. Technol.* **30**, 17 - 20.

Hag, M. E. E., Tinay, A. H. E., Yousif, N. E. (2002) Effect of fermentation and dehulling on starch, total polyphenols, phytic acid content and in vitro protein digestibility of pearl millet. *Food Chem.* **77**, 193 - 196.

Hemery, Y. M., Anson, N. M., Havenaar, R., Haenen, G. R. M. M., Noort, M. W. J., Rouau, X. (2010) Dry - fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Res. Int.* **43** (5), 1429 - 1438.

HRN ISO 1871:1999 (ISO 1871:1975 (E)) ICC 105/2, Određivanje sadržaja ukupnog dušika i izračunavanje sadržaja bjelančevina u hrani.

Hu, M.L. (2011) Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: More questions than answers. *Chang Gung Med. J.* **34**, 449 - 459.

Jang, S., Xu, Z. (2009) Lipophilic and hydrophilic antioxidants and their antioxidant activities in purple rice bran. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 858 - 862.

Jingjun, L., Zhengxing, C., Huiyuan, Y., Ying, X. (2007) Optimization of stress medium enhance hydroxyl radical inhibition by water-soluble protein from germinated millet. *LWT – Food Sci. Technol.* **40**, 1630 - 1636.

Kalinová, J. (2007) Nutritionally Important Components of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.). *Food.* **1** (1), 91 - 100.

Kalinová, J., Moudrý, J. (2006) Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties. *Plant Food. Hum. Nutr.* **61**, 45 - 49.

Kaneda, I., Kubo, F., Sakurai, H. (2007) Relationship between trace metal concentration and antioxidative activity of ancient rice bran (red and black rice) and a present-day rice bran (Koshihikari). *J. Trace Elem. Med. Biol.* **21**, 43 - 51.

Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K. H., Kariluoto, S., Piironen, V., Poutanen, K. (2007) Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiol.* **24**, 175 - 186.

Katina, K., Juvonen, R., Laitila, A., Flander, L., Nordlund, E., Kariluoto, S., Piironen, V., Poutanen, K. (2012) Fermented wheat bran as a functional ingredient in baking. *Cereal Chem.* **89**, 126 - 134.

Khan, A. G., Kuek, T. M., Chaudhury, T. M., Khoo, C.S., Hayes, W. J. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere.* **41**, 197.

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. agr. Food Chem.* **50**, 3713 - 3717.

- Kumari, S., K., Thayumanavan, B. (1998) Characterization of starches of proso, foxtail, barnyard, kodo, and little millets. *Plant Food Hum. Nutr.* **53**, 47 - 56.
- Laminu, H. H., Modu, S., Numan, A. I. (2011) Production, In Vitro Protein Digestibility, Phytate Content and Acceptability of Weaning Foods Prepared from Pearl Millet (*Pennisetum Typhoideum*) and Cowpea (*Vigna Unguiculata*). *Int. J. Nutr. Metabol.* **3(9)**, 109 - 113.
- Lebesi, D. M., Tzia, C. (2012) Use of endoxylanase treated cereal brans for development of dietary fiber enriched cakes. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* **13**, 207 - 214.
- Léder, I. (2004) Sorghum and Millets. U: Cultivated Plants, Primarily as Food Sources, (György Füleky, G., ured.), Eolss Publishers, Oxford, UK, str. 18 - 36.
- Lei, V., Friis, H., Michaelsen K. F. (2006) Spontaneously Fermented Millet Product as a Natural Probiotic Treatment for Diarrhea in Young Children: An Intervention Study in Northern Ghana. *Int. J. Food Microbiol.* **110**, 246 - 253.
- Lestienne, I., Besanon, P., Caporiccio, B., Lull ien-Pell erin, V., Tréche, S. (2005) Iron and zinc in vitro availability in pearl millet flours (*Pennisetum glaucum*) with varying phytate, tannin, and fiber contents. *J. agr. Food Chem.* **53**, 3240 - 3247
- Li, J., Chen, Z., Guan, X., Liu, J., Zhang, M., Xu, B. (2008) Optimization of germination conditions to enhance hydroxyl radical inhibition by water soluble protein from stress millet. *J Cereal Sci.* **48**, 619 - 24.
- Liviu Al, M., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S. (2009) Physico – chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem.* **112**, 863 - 867.
- Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F. (2007) Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chem.* **101**, 1151 - 1157.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Liliana Jiménez (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727 - 747.

Martinez-Tome, M., Murcia, M. A., Freha, N., Ruggieri, S., Jimenez, A. M., Roses, F., Parras, P. 2004. Evaluation of antioxidant capacity of cereal brans. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 4690 - 4699.

Mcsweeney, M. B., Ferenc, A., Smolkova, K., Lazier, A., Tucker, A., Seetharaman, K., Wright, A., Duizer, L. M., Ramdath, D. D. (2017) Glycaemic response of proso millet-based (*Panicum miliaceum*) products. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **68(7)**, 873 - 880.

Megazyme (2017) <<https://secure.megazyme.com/Total-Dietary-Fiber-Assay-Kit>>. Pristupljeno 27. travnja, 2018.

Megazyme, Total Dietary Fiber, Assay Procedure

Mellen, B. P., Walsh, T. F., Herrington, D. M. (2009) Wholegrains intake and cardiovascular disease: a meta-analysis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **18**, 283 - 290.

Mikolaj, E. (2017) Ekstrakcija lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Nagendra Prasad M. N., Sanjay, K. R., Shravya Khatokar, M., Vismaya, M. N., Nanjunda Swamy, S. (2011) Health Benefits of Rice Bran – A Review. *Nutr. and Food Sci.* **1:3**.

Novak, J. (2017) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na masne kiseline i vlakna bučine pogače, prosa i heljde, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Nyström, L., Mäkinen, M., Lampi, A. M., Piironen, V. (2005) Antioxidant activity of sterol ferulate extracts from rye and wheat bran. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 2503 - 2510.

Ou, B., Huang, D., Hampsch - Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 3122 - 3128.

Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley and Sons, New York.

Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Int. J. Pharmacogn. Phyt. Res.* **2**, 270 - 278.

Patel, S. (2012) Cereal bran: the next super food with significant antioxidant and anticancer potential. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* **5** (2), 91 - 104.

Pérez - Jiménez, J. S., Arranz, M., Taberero, M. E., Díaz - Rubio, J., Serrano, I. (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.* **41**, 274 - 285.

Pine, S. H. (1994) *Organska kemija, Školska knjiga*, Zagreb.

Pravilnik o metodama fizikalno - kemijske analize za žita i mlinske proizvode (2011) *Narodne novine* **28**, Zagreb.

Ragae, S., Abdel - Aal, E. M., Noaman, M. (2006) Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Elsevier.* **98** (1), 32 - 38.

Rajasekaran, N. S., Nithya, M., Rose, C., Chandra, T. S. (2004) The Effect of Finger Millet Feeding on the Early Responses During the Process of Wound Healing in Diabetic Rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **1689**, 190 - 201.

Ramachandra, G., Virupaksha, T. K., Shadaksharaswamy, M. (1977) Relationship between tannin levels and in vitro protein digestibility in finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn). *J Agr. Food Chem.* **25**, 1101 - 1104.

Rao, M. V. S. S. T. S., Muralikrishna, G. (2002) Evaluation of the antioxidant properties of free and bound phenolic acids from native and malted finger millet (ragi, *Eleusine coracana* Indaf-15). *J. Agr. Food. Chem.* **50**, 889 - 892.

Ravindran, G. (1992) Seed protein of millets: amino acid composition, proteinase inhibitors and *in-vitro* protein digestibility. *Food Chem.* **44**, 13 - 17.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Sci. Dir.* **26**, 1231 - 1237.

Roginsky, V., Lissi, E. A. (2004) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* **92**(2), 235 - 245.

- Rosell, C. M., Santos, E., Collar, C. (2009) Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach. *Food Res. Int.* **42**, 176 - 184.
- Sakihama, Y., Mano, J., Sano, S., Asada, K., Yamasaki, H. (2000) Reduction of phenoxy radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochem. Bioph. Res. Com.* **279**, 949.
- Saleh, A. S. M., Zhang, Q., Chen, J., Shen Q. (2013) Millet Grains: Nutritional Quality, Processing, and Potential Health Benefits. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **12**, 281 - 295.
- Salunkhe, D. K., Jadhav, S. J., Kadam, S. S., Chavan, J. K. (1985) Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Plant Physiol.* **79**, 480 - 484.
- Sanderson, E., Duizer, L. M., McSweeney M. B. (2017) Descriptive analysis of new proso millet product. *Int. J. Gastr. Food Sci.* **8**, 14 - 18.
- Sarita, E. S. (2016) Potential of Millets: Nutrients Composition and Health Benefits. *J. Sci. In. Res.* **5**, 46 - 50.
- Scalbert, A., Manach, C., Moran, C., Remesy, C. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci.* **45**, 287 - 306.
- Schatzkin, A., Mouw, T., Park, Y., Subar, A. F., Kipnis, V., Hollenbeck, A., Leitzmann, M. F., Thompson, F. E. (2007) Dietary fibre and wholegrain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH AARP diet and health study. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1353 - 1360.
- Serna - Saldivar, S., Rooney, L. W. (1995) Structure and chemistry of sorghum and millets. U: *Sorghum and Millets: Chemistry and Technology*. (Dendy, D. A. V., ured.), St Paul, MN: AACC International, Inc.
- Shadidi, F., Chandrasekar, A. (2013) Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: A review. *J. Func. Food.* **5**, 570 - 581.
- Sharif, M. K., Butt, M. S., Anjum, F. M., Khan, S. H. (2013) Rice Bran: A Novel Functional Ingredient. *Food Sci. Nutr.* **54**, 8 - 47.
- Sharma, R., Singh, R.B. (2010) Bioactive foods and nutraceutical supplementation criteria in cardiovascular protection. *Sci. Dir.* **3**,141-153.

- Sharma, S., Kaur, S., Dar, B. N., Singh, B. (2014) Storage stability and quality assessment of processed cereal brans. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 583 - 588.
- Shobana, S., Malleshi, N. G. (2007) Preparation and functional properties of decorticated finger millet (*Eleusine coracana*). *J. Food Eng.* **79**, 529 - 538.
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., Malleshi, N. G. (2009) Composition and Enzyme Inhibitory Properties of Finger Millet (*Eleusine Coracana* L.) Seed Coat Phenolics: Mode of Inhibition of A-Glucosidase and Pancreatic Amylase. *Food Chem.* **115**, 1268 - 1273.
- Singh, K. K., Goswami, T. K. (1999) Design of a cryogenic grinding system for spices. *J. Food Eng.* **39** (4), 359 - 368.
- Singh, K. P., Mishra, A., Mishra, H. N. (2012) Fuzzy analysis of sensory attributes of bread prepared from millet-based composite flours. *LWT – Food Sci. Tech.* **48**(2), 276 - 282.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* **299**, 1179.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R. M. (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Method Enzymol.* **299**, 152.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Sci. Dir.* **16**, 144 - 158.
- Sun, Z., Su, R., Qiao, J., Zhao, Z., Wang, X. (2014) Flavonoids Extraction from *Taraxacum officinale* (Dandelion): Optimisation Using Response Surface Methodology and Antioxidant Activity. *J. Chem.* **2014**, 1 - 7.
- Taylor, J. R. N., Schober, T. J., Beanb, S.R. (2007) Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *J. Cereal Sci.* **44**, 252 - 271.
- Thilagavathi, T., Kanchana, S., Banumathi, P., Hemalatha, G., Vannlarajan, C. Sundar, M., Ilamaran, M. (2015) Physico-chemical and Functional Characteristics of Selected Millets and Pulses. *Indian J. Sci. Technol.* **8**, 147 - 155.

- Tran, T. T. B., Shelat, K. J., Tang, D., Li, E., Gilbert, R. G., Hasjim, J. (2011) Milling of Rice Grains. The Degradation on Three Structural Levels of Starch in Rice Flour Can Be Independently Controlled during Grinding. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 3964 - 3973.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* **2**, 1231 - 1246.
- Verstraeten, S. V., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2003) Flavan - 3 - ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biol. Med.* **34**, 84 - 92.
- Viuda - Martos, M., López - Marcos, M. C., Fernández - López, J., Sendra, E., López - Vargas, J. H., Pérez - Álvarez, J. A. (2010) Role of fiber in cardiovascular diseases: Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* **9**, 240 - 258.
- Wen, Y., Liu, J., Meng, X., Zhang, D., Zhao, G. (2014) Characterization of millet starches from different geographical origins of China. *Food Sci. Biotechnol.* **23**, 1371 - 377.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002) Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 1619 - 1624.
- Verma, B., Hucl, P., Chibbar, R. N. (2009) Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chem.* **116**, 947 - 954.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Wang, C. (2010) Wheat bran feruloyl oligosaccharides enhance the antioxidant activity of rat plasma. *Food Chem.* **123**, 472 - 476.
- Zhang, M. W., Zhang, R. F., Zhang, F. X., Liu, R. H. (2010) Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. *J. Agr. Food Chem.* **58**, 7580 - 7587.
- Zhou, K., Yu, L. (2004) Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT Food Sci. Technol.* **37**, 717 - 721.
- Zhu, K. X., Huang, S., Peng, W., Qian, H. F., Zhou, H. M. (2010) Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber. *Food Res. Int.* **43**, 943 - 948.

Zitterman, A. (2003) Bran. U: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M., ured.), Academic Press, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands str. 1844 - 1850.