

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Ivona Kuraica

1093/PI

**UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA  
SASTAV FENOLA, STEROLA I  
ANTIOKSIDACIJSKU  
AKTIVNOST POGAČE LANA**

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

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA SASTAV FENOLA, STEROLA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST POGAČE LANA

*Ivona Kuraica, 1093/PI*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj vremena i načina mljevenja (s i bez primjene kriohlađenja) na sastav i udio sterola, fenolnih spojeva te antioksidacijsku aktivnost lanene pogače. Preliminarnim istraživanjima odabrani su uvjeti mljevenja pogače s i bez hlađenja tekućim dušikom, u trajanju od 8 i 16 minuta. U samljevenim pogačama steroli i fenolni spojevi određeni su kromatografskim metodama, a antioksidacijska aktivnost određena je spektrofotometrijskim metodama. Rezultati su pokazali kako način i vrijeme mljevenja imaju statistički značajan utjecaj ( $p \leq 0,05$ ) na udio  $\beta$ -sitosterola,  $\beta$ -sitostanola, cikloartenola i  $\Delta^7$ -avenasterola, dok se udio ostalih sterola nije značajno promijenio u odnosu na kontrolni uzorak pogače. Način i vrijeme mljevenja značajno su utjecali na povećanje koncentracije fenolnih spojeva. Predtretman kriomljevenja u trajanju od 16 minuta utjecao je na povećanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva za 81,93 % u odnosu na kontrolni uzorak. Udio sekoizolarikirezinol-diglukozida (SDG) pokazao je statistički značajnu korelaciju s antioksidacijskom aktivnošću.

**Ključne riječi:** *lanena pogača, kriomljevenje, steroli, fenoli, antioksidacijska aktivnost*

**Rad sadrži:** 70 stranica, 12 slika, 10 tablica, 68 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc.dr.sc. *Marko Obranović*

**Pomoć pri izradi:** doc.dr.sc. *Klara Kraljić*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Duška Ćurić*
2. Doc.dr.sc. *Marko Obranović*
3. Izv.prof.dr.sc. *Sandra Balbino*
3. Prof.dr.sc. *Dubravka Škevin* (zamjena)

**Datum obrane:** 16. srpnja 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### IMPACT OF CRYOGENIC GRINDING ON PHENOLIC COMPOUNDS, STEROLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAXSEED CAKE

*Ivona Kuraica, 1093/PI*

**Abstract:** The aim of this study was to determine impact of time and milling type (with or without cryocooling) on composition and content of flaxseed cake sterols, phenols and antioxidant activity of flaxseed cake. Preliminary studies were undertaken to optimise grinding parameters of cake, with and without using liquid nitrogen cooling for 8 and 16 minutes. In milled cake samples sterols and phenolic compounds were determined using chromatographic methods. Antioxidant activity of produced cakes was investigated using spectrophotometric methods. The results showed significant impact ( $p \leq 0,05$ ) of time and milling type on  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostanol, cycloartenol and  $\Delta^7$ -avenasterol content while the impact on other sterols content was not determined. Time and milling type had significant impact on the increase in phenolic concentration. Phenolic concentration was increased by 81,93 % in the sample treated for 16 minutes using cryocooling compared to the control sample. Content of secoisolariciresinol-diglucoside (SDG) showed statistically significant correlation with antioxidant activity.

**Keywords:** *flaxseed cake, cryogenic grinding, sterols, phenolic compounds, antioxidant activity*

**Thesis contains:** 70 pages, 12 figures, 10 tables, 68 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 *Marko Obranović*, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** PhD *Klara Kraljić*, Assistant Professor

**Reviewers:**

1. PhD. *Duška Ćurić*, Full professor
2. PhD. *Marko Obranović*, Assistant professor
3. PhD. *Sandra Albino*, Associate professor
4. PhD. *Dubravka Škevin*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 16<sup>th</sup> July 2019

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. LAN .....	2
2.2. LANENO ULJE .....	4
2.3. LANENA POGAČA .....	5
2.4. STEROLI .....	8
2.5. FENOLNI SPOJEVI .....	9
2.5.1. Fenolne kiseline i flavonoidi .....	9
2.5.2. Lignani .....	10
2.5.3. Antioksidacijska aktivnost .....	12
2.6. KRIOGENO MLJEVENJE .....	13
2.6.1. Kriomlin .....	14
2.6.2. Prednosti kriogenog mljevenja .....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
3.1. MATERIJALI .....	17
3.2. METODE RADA .....	17
3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u lanenom sjemenu i pogači .....	17
3.2.2. Određivanje udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači .....	18
3.2.3. Određivanje udjela mineralnih tvari u pogači .....	20
3.2.4. Mljevenje pogače kriomlinom .....	21
3.2.5. Određivanje veličine čestica .....	22
3.2.6. Ekstrakcija nepolarnih komponenti .....	24
3.2.7. Određivanje udjela i sastava sterola .....	25
3.2.8. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom reaktoru .....	30
3.2.9. Određivanje sastava fenolnih spojeva lanene pogače .....	31
3.2.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva .....	32
3.2.11. Statistička obrada .....	37
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	38
4.1. KVALITETA SJEMENA I POGAČE LANA .....	39
4.2. VELIČINA ČESTICA .....	40
4.3. UDIO I SASTAV STEROLA .....	45
4.4. KONCENTRACIJA I SASTAV FENOLNIH SPOJEVA .....	50
4.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA POLIFENOLNIH SPOJEVA .....	57
5. ZAKLJUČCI .....	63
6. LITERATURA .....	64

## 1. UVOD

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka koja se svrstava u porodicu *Linaceae*, a danas je poznato više od 200 vrsta. Kultivacija lana u prošlosti se provodila primarno za proizvodnju lanenog vlakna koje se koristi u tekstilnoj industriji, a danas se sve češće kultivira u svrhu proizvodnje lanenog ulja i sjemena koji se koriste u prehrani ljudi.

Prilikom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja kao nusproizvod zaostaje lanena pogača koja predstavlja problem u industriji jer se često smatra otpadom. Iako se najčešće koristi kao stočna hrana, zbog prisutnosti određene količine antinutrijenata njena je primjena ograničena te se sve više traže načini kojima bi se moglo manipulirati koncentracijom određenih nutritivnih sastojaka. Ono što je karakteristično za lanenu pogaču je činjenica da u njoj zaostaje velika količina bioaktivnih spojeva zbog primjene nižih temperatura prilikom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja. Lanena pogača je vrlo vrijedan izvor spojeva koji imaju antioksidacijsku aktivnost, posebice lignana, fenolnih kiselina i flavonoida, a povezuju se s pozitivnim učinkom na zdravlje.

Istraživanja su pokazala kako se lanena pogača može koristiti za izolaciju fenolnih spojeva koji djeluju kao antioksidansi te se potom mogu koristiti kao dodaci prehrani ili kao prirodni aditivi u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Također se može koristiti kao jeftina sirovina za nutritivno obogaćivanje prehrambenih proizvoda poput kruha, pekarskih proizvoda, žitarica za doručak i sl., pri čemu bi se mogla proizvesti nova funkcionalna hrana.

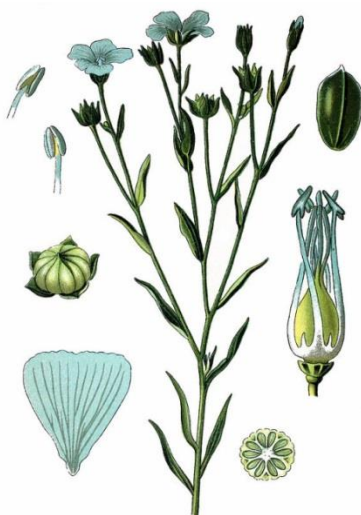
Na temelju preliminarnih pretraživanja znanstvene literature došlo se do spoznaje kako je kriogeno mljevenje učinkovita metoda za povećanje dostupnosti nutrijenata te sprječavanje gubitka termolabilnih komponenti, a u tu se svrhu još uvijek nisu provela istraživanja na lanenoj pogači. Kako bi se pokušala povećati nutritivna vrijednost lanene pogače, u ovom radu ispitan je utjecaj predtretmana kriogenog mljevenja lanene pogače na veličinu čestica. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj vremena i načina mljevenja na sastav i koncentraciju sterola, fenolnih spojeva te antioksidacijsku aktivnost lanene pogače.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LAN

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka koja se svrstava u porodicu *Linaceae*, rod *Linum*, a razlikujemo više od 200 vrsta (Slika 1). Naziv biljke potječe od keltske riječi *lin* („nit“) i latinske riječi *usitatissimum* („najkorisniji“). Gotovo svi dijelovi biljke mogu se koristiti u različite svrhe na što ukazuje i sam njezin naziv. Lan je jedna od najstarijih uzgajanih kultura te se smatra kako se kultivira od početka postojanja civilizacija (Goyal i sur., 2014). Pretpostavka je kako biljka potječe s područja zapadne Azije i Mediterana gdje se kultivirala u svrhu proizvodnje vlakana te u medicinske svrhe.

Kultivacija lana danas je prisutna u više od 50 zemalja diljem svijeta (Kajla i sur., 2015). Iako je proizvodnja lanenog sjemena dugi niz godina bila najveća u Kanadi, prema FAO statistikama za 2017. godinu kao najveći proizvođač istaknuo se Kazahstan (683 338 tona). Ukupna proizvodnja lanenih sjemenki 2017. godine iznosila je 2,79 milijuna tona, a pored Kazahstana najveći proizvođači su Rusija, Kanada, Kina, Indija, SAD i Etiopija. Ukupna svjetska proizvodnja lanenog ulja u 2014. godini iznosila je 686 498 tona, a najveća proizvodnja zabilježena je u Kini (FAOSTAT, 2019).



Slika 1. Biljka lan (*Linum usitatissimum* L.) (Anonymous 1, 2019)

Lan se u prošlosti kultivirao primarno za proizvodnju lanenog vlakna koje se koristi u tekstilnoj industriji (engl. *linseed*), a danas se kultivira u svrhu proizvodnje lanenog ulja i sjemena koji se koriste u prehrani ljudi (engl. *flaxseed*) (Morris, 2007). Laneno ulje proizvodi se iz uljanog lana, dok se laneno vlakna dobiva od predivog lana. Laneno ulje tradicionalno se



koristilo u proizvodnji boja i lakova, a danas se zbog dokazanog djelotvornog učinka na zdravlje sve više naglašava njegova važnost u prehrani ljudi. Biljka lan u prosjeku može narasti od 0,3 do 1.2 metara u visinu, a stabljika je vrlo tanka (Gutiérrez i sur., 2010). Osim toga, stabljika lana sadrži visoko kvalitetna vlakna koja joj daju čvrstoću i izdržljivost (Singh i sur., 2012). Listovi su dugački 20-40 mm i debljine 3 mm, tamno zelene boje. Cvjetići koji izrastaju na stabljici najčešće su plave boje, ali mogu biti i bijele, ružičaste ili ljubičaste boje.

Lanene sjemenke su ovalnog oblika sa šiljatim vrhom, a površina je sjajna i glatka (Slika 2). Boja sjemenki varira od tamno smeđe do žute (Ganorkar i Jain, 2013). Kemijski sastav smeđeg i žutog sjemenka lana vrlo je sličan, a iznimka je genetski modificirana sorta Solin koja ima potpuno drugačiji masno-kiselinski sastav. U prosjeku sadrži oko 2,2 %  $\alpha$ -linolenske masne kiseline i 74,6 % linolne masne kiseline (Dribnenki i sur., 2007). Sjeme Solin je žute boje, a glavni cilj genetske modifikacije bio je proizvesti sortu koja bi imala bolju oksidacijsku stabilnost, čime bi se omogućilo dulje vrijeme skladištenja.



Slika 2. Lanene sjemenke (Anonymous 2, 2019)

Kemijski sastav sjemenki znatno ovisi o uvjetima uzgoja te vrsti kultivara. Lanene sjemenke u prosjeku sadrže 35-45 % ulja, od čega približno 73 % višestruko nezasićenih masnih kiselina (Goyal i sur., 2014). Također sadrže 20-25 % proteina visoke kvalitete, 20-25 % prehrambenih vlakana te 3-4 % pepela (Gutiérrez i sur., 2010). U današnje vrijeme popularnost lanenih sjemenki sve je veća zbog biološki aktivnih komponenti koje sadrže. Lanene sjemenke su jedan od najboljih biljnih izvora esencijalne  $\alpha$ -linolenske masne kiseline i lignana koji imaju fitoestrogeno djelovanje (Singh i sur., 2012). Također sadrže značajan udio topljivih i netopljivih vlakana i antioksidansa koji imaju pozitivan utjecaj na zdravlje (Goyal i sur., 2014). Osim što se iz sjemenki može proizvesti laneno ulje, također se mogu inkorporirati u brojne prehrambene proizvode u svrhu nutritivnog obogaćivanja proizvoda.

## 2.2. LANENO ULJE

Laneno ulje namijenjeno za prehranu proizvodi se isključivo postupkom hladnog prešanja te u njemu nisu dozvoljeni nikakvi dodaci. Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima, hladno prešana ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, mehaničkim postupcima, primjerice prešanjem, bez primjene topline. Može se provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem (Pravilnik, 2019). Zbog primjene nižih temperatura, proizvodnja ulja hladnim prešanjem ima nisko iskorištenje pri čemu u pogači zaostaje visok udio ulja, ali i veći udio bioaktivnih komponenti. Zbog toga su hladno prešana ulja slabije održiva u odnosu na rafinirana ulja dobivena od iste sirovine. Laneno ulje može se proizvesti i mehaničkim postupcima, uz primjenu topline, čime se svrstava u kategoriju djevičanskih ulja ili se može provesti proces ekstrakcije organskim otapalima, čime se proizvede rafinirano ulje (Pravilnik, 2019). Rafinirano ulje najčešće se koristi u industrijske svrhe pri proizvodnji boja, lakova i linoleuma.

Kako bi se iz sjemena moglo proizvesti kvalitetno hladno prešano ulje, vrlo je bitno provesti adekvatnu pripremu sjemena za skladištenje i proizvodnju. Sjeme se prije skladištenja mora očistiti od svih nečistoća kako bi mu se očuvala kvaliteta, što posljedično utječe i na kvalitetu proizvedenog ulja i pogače. Tijekom skladištenja potrebno je održavati udio vode u sjemenu ispod kritične vlažnosti kako bi se onemogućila enzimsko i mikrobna degradacija sjemena.

Priprema sjemena za izdvajanje ulja uključuje faze podešavanja udjela vode i mljevenja. Sjeme se može i ljuštiti prije procesa prešanja što se u tradicionalnoj proizvodnji nije primjenjivalo. Ako se sjeme ne ljušti prije izdvajanja ulja, proizvedena pogača sadržavat će manji udio proteina, a veći udio vlakana. Ako se sjeme oljušti, iskorištenje procesa bit će manje jer ljuska olakšava izdvajanje ulja iz sjemena, a pogača će biti bogatija proteinima. Dodatak optimalnog udjela vode sjemenu pospješuje izdvajanje ulja, ali potrebno je pripaziti da se ne doda prevelika količina jer bi to negativno utjecalo na iskorištenje procesa prešanja (Obranović, 2015). Mljevenje je bitna faza u pripremi sjemena jer se time razara stanična struktura zbog čega je omogućeno lakše izdvajanje ulja. Prešanje lanenog sjemena najčešće se vrši na pužnim prešama, a zbog velikog udjela ulja (35-45 %) te slabog iskorištenja procesa, često je potrebno provesti prešanje u dva stupnja. Nakon prešanja, ulje se filtrira te puni u tamne boce u struji dušika ili nekog drugog inertnog plina kako bi se spriječio proces oksidacije kojem je laneno ulje podložno.

Glavna komponenta hladno prešanog lanenog ulja su trigliceridi (94-98 %) koji spadaju u gliceridnu frakciju. Ulje sadrži oko 73 % višestruko nezasićenih masnih kiselina, od čega 39,90-60,42 %  $\alpha$ -linolenske masne kiseline ( $\omega$ -3-masna kiselina) i 12,25-17,44 % linolne masne kiseline ( $\omega$ -6-masna kiselina) (Goyal i sur., 2014). Iz tog razloga laneno ulje je vrlo podložno oksidaciji unatoč tome što sadrži značaj udio antioksidansa. Također sadrži jednostruko nezasićenu oleinsku masnu kiselinu (13,44-19,39 %) te oko 9 % zasićenih masnih kiselina, od kojih prevladavaju palmitinska i stearinska masna kiselina (Goyal i sur., 2014). Negliceridnu frakciju ulja čine fosfolipidi (2,55 %), steroli, pigmenti (karotenoidi, klorofili), tokokromanoli, fenolni spojevi i ciklinopeptidi. Od fosfolipida u ulju lana prevladavaju fosfatidil inozitol, fosfatidil etanolamin, fosfatidil kolin i fosfatidil glicerol. Laneno ulje nije bogat izvor sterola, a po sastavu dominiraju  $\beta$ -sitosterol, kampesterol i cikloartenol. Glavni predstavnik karotenoida u lanenom ulju je  $\beta$ -karoten koji djeluje kao antioksidans, a udio klorofila u ulju lana je pokazatelj nezrelosti sjemena. Tokokromanoli su amfipatske molekule topive u mastima, a u tu grupu spojeva spadaju tokoferoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) i tokotrienoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) (Obranović, 2015). Najzastupljeniji tokokromanol je  $\gamma$ -tokoferol koji u sustavima hrane ima najjače antioksidacijsko djelovanje. Oksidacijskoj stabilnosti ulja doprinose i fenolni spojevi iako samo manji dio prelazi u ulje zbog njihove hidrofilnosti. U lanenom ulju prisutni su i bioaktivni peptidi, ciklinopeptidi, koji zbog svoje hidrofobnosti lako prelaze u ulje. Ciklinopeptidi imaju snažnu antioksidacijsku i imunosupresivnu aktivnost, a smatra se kako su upravo oni odgovorni za blago gorki okus lanenog ulja (Brühl i sur., 2008).

### 2.3. LANENA POGAČA

Nusproizvod prilikom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja je lanena pogača koja se često smatra otpadom, te se najčešće koristi kao stočna hrana. Lanena pogača nastaje prilikom procesa izdvajanja ulja iz sjemena, pri čemu u pogači zaostaje manji udio ulja te drugi hranjivi sastojci koji se zbog svoje hidrofilnosti ne otapaju u ulju već zaostaju u pogači. U lanenoj pogači zaostaju velike količine vlakana, proteina i fenolnih spojeva što je čini nutritivno vrijednim proizvodom (Herchi i sur., 2014).

Kada se koristi kao stočna hrana u krmnim smjesama, lanena pogača djeluje regulativno na probavni sustav ako se dodaje u manjoj količini. Unatoč tome korištenje lanene pogače kao stočne hrane ima nekoliko nedostataka. U pogači zaostaju tripsin inhibitor linatin koji djeluje kao antipiridoksin faktor, fitinska kiselina koja smanjuje biodostupnost mikronutrijenata, cijanogeni glikozidi koji negativno utječe na respiratorni sustav te je probavljivost pogače

mala (Touré i Xueming, 2010). Cijanogeni glikozidi su termolabilni te se lako uklanjaju termičkom obradom ili se mogu tretirati enzimima, međutim to zahtjeva dodatan tretman pogače što u praksi nije poželjno. Zbog svega navedenog, pogača lana sve se češće koristi u druge svrhe, primjerice za izolaciju fenolnih spojeva koji djeluju kao antioksidansi, a mogu se koristiti kao dodaci prehrani ili kao prirodni aditivi u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Kasote, 2013). Osim toga, pogača lana može se koristiti kao obnovljivi izvor tekstilnih vlakana te za izolaciju polisaharida i proteina.

Lanena pogača sadrži mješavinu neškrobnih polisaharida koji se sastoje od ksiloze, galaktoze, arabinoze, ramnoze, fukoze i galakturonske kiseline (Kajla i sur., 2015). Raznovrsnost polisaharida omogućuje primjenu pogače u farmaceutskoj industriji kao izvor topljivih vlakana te u prehrambenoj industriji gdje se polisaharidi mogu koristiti kao prirodni aditivi. Pokazalo se kako polisaharidi izolirani iz lanene pogače imaju slična svojstva guar gumi (E412) zbog dobrog kapaciteta vezanja vode te se mogu koristiti kao ugušćivači i stabilizatori pjena, emulzija i suspenzija (Kajla i sur., 2015).

U današnje vrijeme lanena pogača svoju primjenu nalazi i u izolaciji proteina zbog njihovih funkcionalnih svojstava i djelotvornog učinka na zdravlje. Pokazalo se kako proteini lana igraju bitnu ulogu u prevenciji i liječenju bolesti srca i bubrega zbog čega imaju potencijal za korištenje u terapijske svrhe. Jedan od načina iskorištenja lanene pogače u prehrambene svrhe je i pretvorba u proteinske koncentrate. Na taj način mogu se dobiti proizvodi s visokim udjelom proteina, poželjnim funkcionalnim svojstvima te produljenom trajnosti. Naime, istraživanja su pokazala kako proteini lana imaju bolja emulgirajuća svojstva i kapacitet vezanja vode u odnosu na komercijalno korištene biljne proteine soje (Goyal i sur., 2014). Razlog tome je što su vezani na polisaharide pogače koji doprinose poželjnim funkcionalnim svojstvima. Proteinski koncentri lana djelotvorni su kao stabilizatori pjena i emulzija pri čemu ispoljavaju slična svojstva kao proteinski izolati sirutke. Zbog toga primjenu nalaze u proizvodnji tjestenine, sladoleda, umaka i sl., a kako u svom sastavu ne sadrže gluten, poželjna su sirovina za proizvodnju bezglutenskih proizvoda (Kajla i sur., 2015).

Zbog svojeg kemijskog sastava lanene sjemenke, pa tako i pogača lana često se smatraju funkcionalnom hranom. Funkcionalna hrana je hrana koja dokazano ima povoljan utjecaj na zdravlje ljudi, odnosno hrana koja povoljno djeluje na jednu ili više funkcija organizma, a znanstveno je potvrđeno da sadrži biološki aktivne tvari. Pogača lana pogodna je za uporabu u prehrambenoj industriji jer predstavlja jeftinu sirovinu kojom bi se mogli nutritivno obogatiti

prehrambeni proizvodi poput pekarskih proizvoda, keksi, žitarica za doručak i sl. (Kajla i sur., 2015).

U lanenoj pogači zaostaju prehrambena vlakna koja povoljno utječu na zdravlje probavnog sustava. Prisutna su i topljiva i netopljiva prehrambena vlakna čiji omjer varira u omjeru 20:80 i 40:60 (Goyal i sur., 2014). Od netopljivih vlakna u lanenim sjemenkama prevladavaju celuloza i lignin, a od topljivih gume i sluzi. Netopljiva vlakna ubrzavaju probavne procese, potiču crijevnu peristaltiku, povećavaju fekalnu masu čime olakšavaju prolaz stolice, a topljiva vlakna utječu na smanjenje krvnog tlaka, te usporavaju prolaz hrane probavnim sustavom. Sjemenke u prosjeku sadrže 20-25 % proteina, od čega prevladavaju globulini i albumini (Gutiérrez i sur., 2010; Kajla i sur., 2015). Proteini lana sadrže značajan udio glutaminske i asparaginske kiseline, arginina, a limitirajuća aminokiselina je lizin (Singh i sur., 2012). Smatra se kako lan sadrži sličan aminokiselinski profil kao sojini proteini te ne sadrži gluten (Goyal i sur., 2014). Od mineralnih tvari prevladavaju kalij (560-920 mg 100 g<sup>-1</sup>), fosfor (650 mg 100 g<sup>-1</sup>), magnezij (350-431 mg 100 g<sup>-1</sup>) i kalcij (236-250 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Kajla i sur., 2015). Lanena pogača je jeftina sirovina iz koje se mogu izolirati lignani koji su jako bitna komponenta jer imaju antioksidacijsku aktivnost te fitoestrogeno djelovanje zbog strukturalne sličnosti sa 17- $\beta$ -estradiolom. Lignani djeluju protektivno na DNA i liposome, osobito u području epitelnog tkiva debelog crijeva gdje dolazi do biotransformacije lignana pod djelovanjem crijevnih bakterija (Gutiérrez i sur., 2010).

Gutiérrez i sur. (2010) su nakon odmašćivanja lanene pogače odredili njezin kemijski sastav. Sadržavala je 27,8 % proteina, 7,0 % vlakana te 3,4 % pepela. Ogunronbi i sur. (2011) proučavali su kemijski sastav lanene pogače te mogućnost korištenja pogače u svrhu nutritivnog obogaćivanja kruha. Lanena pogača sadržavala je 38-47,3 % proteina, 53,1-56,3 % vlakna, 12,8-26,1 % ulja te 3,7-5,1 % pepela. Osim toga, dodatkom pogače u udjelu od 10-15 % u kruh, moguće je njegovo nutritivno obogaćivanje bez narušavanja organoleptičkih svojstava. Stabilnost proizvoda tijekom skladištenja je ključna faza koju je potrebno proučiti zbog prisutnosti  $\alpha$ -linolenske masne kiseline koja je vrlo podložna oksidaciji, što u konačnici može dovesti do užeglosti. To bi narušilo organoleptička svojstva proizvoda, ali i njegovu zdravstvenu ispravnost. Ogunronbi i sur. (2011) su u istraživanju došli do zaključka kako je lanena pogača stabilna tijekom 6 mjeseci skladištenja, a najveći učinak na produljenje održivosti imalo je vakuumiranje te skladištenje pri nižim temperaturama. Osim toga, lanena pogača pokazala se stabilnom i kad se skladištila pri sobnoj temperaturi, a mogući razlog je znatan udio antioksidanasa, posebice lignana. Dosadašnja istraživanja ukazuju na postojanje

velikog interesa za iskorištenjem vrijednih spojeva iz lanene pogače u prehrambene i farmaceutske svrhe, posebice proteina, prehrambenih vlakana i polifenolnih spojeva.

## 2.4. STEROLI

Steroli su visokomolekularni ciklički alkoholi, derivati ciklopentanofenantrena. Sastoje se od fenantrenske skupine (tri prstena cikloheksana i jedan prsten ciklopentana). Glavni sterol u životinjskim tkivima je kolesterol, a u biljkama su prisutni fitosteroli i stanoli. Fitosteroli imaju dvostruku vezu na položaju 5 sterolne jezgre, a stanoli imaju zasićenu sterolnu jezgru. Najvažniji fitosterol je  $\beta$ -sitosterol, a među stanolima su bitni sitostanol i kampestanol. Važnost fitosterola u ljudskoj prehrani je u tome što reduciraju ukupan kolesterol i LDL kolesterol inhibicijom apsorpcije kolesterola u tankom crijevu. Također imaju protuupalno, antibakterijsko i antitumorsko djelovanje (Azadmard-Damirchi i sur., 2010).

Steroli su prisutni u lanenom ulju, ali u manjoj količini nego u ostalim biljnim uljima. U ranim fazama razvoja sjemena udio sterola je visok, dok se kasnije udio smanjuje (Herchi i sur., 2009). Kako su steroli gradivne komponente staničnih membrana, veća je potreba za njima u ranijim fazama razvoja sjemena. Glavni predstavnici sterola u lanenom ulju su  $\beta$ -sitosterol (35,6 %), kampesterol (14,3 %) i cikloartenol (24,4 %) (Tablica 1). Cikloartenol je triterpen koji je prekursor za sintezu gotovo svih fitosterola (Schaller, 2003). Prisutan je i u ostalim vrstama ulja, ali karakterističan je za laneno ulje u kojem je prisutan u visokom udjelu (Obranović, 2015). Kako određena količina ulja zaostaje u pogači nakon procesa prešanja, posljedično zaostaje i manji udio sterola.

Tablica 1. Sastav sterola u lanenom ulju (Ciftci i sur., 2012)

<b>Steroli</b>	<b>mg kg ulja<sup>-1</sup></b>	<b>Udio od ukupnih (%)</b>
<b>Kampesterol</b>	584	14,3
<b>Stigmasterol</b>	238	5,8
<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>	1450	35,6
<b><math>\Delta^5</math>-Avenasterol</b>	243	6,0
<b><math>\Delta^7</math>-Stigmasterol</b>	184	4,5
<b><math>\Delta^7</math>-Avenasterol</b>	38	0,9
<b>Cikloartenol</b>	993	24,4
<b>24 -Metilen-cikloartanol</b>	342	8,4
<b>Ukupno</b>	4072	100

## 2.5. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka, imaju antioksidacijsku ulogu te djeluju kao zaštita od štetnika. Osim toga, bitni su za boju i organoleptička svojstva biljke (Morris, 2007). Fenolni spojevi se sastoje od aromatskih ugljikovodika na koje su direktno vezani jedna ili više hidroksilnih skupina, a mogu biti prisutni u slobodnom obliku, konjugirani ili polimerizirani (Shahidi, 2000). U laneno ulje ekstrahira se samo manji dio fenolnih spojeva zbog njihove hidrofilnosti, a ostatak zaostaje u pogači. Lanene sjemenke su vrlo vrijedan izvor fenolnih spojeva, a glavni naglasak stavlja se na lignane. Istraživanja su pokazala kako se konzumacijom namirnica bogatih lignanom smanjuje vjerojatnost pojave kardiovaskularnih bolesti (Touré i Xueming, 2010). Osim toga lanene sjemenke sadrže različite fenolne kiseline i flavonoide koji djeluju kao antioksidansi.

Sastav i udio fenola u lanenim sjemenkama znatno varira ovisno o vrsti, uvjetima uzgoja, stupnju zrelosti, uvjetima prerade i skladištenja, a rezultati istraživanja mogu se razlikovati zbog različitih postupaka ekstrakcije. U dostupnoj literaturi se navodi kako udio fenolnih spojeva u lanenoj pogači iznosi 355-442 mg 100 g<sup>-1</sup> (Alu'datt i sur., 2017). Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lanenih sjemenki ovisi o njihovoj molekularnoj strukturi. Manje polarne molekule ekstrahiraju se pomoću organskih otapala, najčešće heksanom, a polarne komponente ekstrahiraju se pomoću polarnih otapala, poput etanola ili metanola. U istraživanju koje su proveli Gutiérrez i sur. (2010), polifenoli dobiveni procesom ekstrakcije etanolom bili su prisutni u količini od 0,73 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) g<sup>-1</sup> ekstrakta. Novije metode ekstrakcije fenolnih spojeva uključuju ekstrakciju ultrazvukom, mikrovalovima, visokim tlakom te superkritičnim fluidima.

### 2.5.1. Fenolne kiseline i flavonoidi

Fenolne kiseline dijele se na dvije skupine: derivati hidroksibenzojeve i derivati hidroksicimetne kiseline (Kasote, 2013). Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina raste s porastom broja hidroksilnih skupina, zbog čega hidroksicimetne kiseline imaju veću aktivnost od hidroksibenzojevih kiselina. Hidroksicimetne kiseline rijetko su prisutne u slobodnom obliku, a glavni predstavnici su ferulinska, kava-, sinapinska i *p*-kumarinska kiselina. Klorogenska kiselina, ester kava- i kumarinske kiseline, najčešći je ester hidroksicimetnih kiselina. Predstavnici derivata hidroksibenzojevih kiselina su galna, *p*-hidroksibenzojeva, siriginska i vanilinska kiselina. Veći udio fenolnih kiselina u sjemenu lana prisutan je u vezanoj formi u obliku estera. Količina fenolnih kiselina u sjemenkama lana varira između

800 i 1000 mg na 100 g sjemena, od čega količina estera fenolnih kiselina iznosi 300-500 mg 100 g<sup>-1</sup> sjemena (Herchi i sur., 2014). Herchi i sur. (2014) navode ferulinsku kiselinu kao glavnu fenolnu kiselinu lanenih sjemenki, dok su u manjem udjelu prisutne vanilinska, kava-, *p*-kumarinska, klorogenska, sinapinska, galna, protokatehinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina. Kajla i sur. (2015) kao glavne fenolne kiseline sjemenki lana navode ferulinsku (10,9 mg g<sup>-1</sup>), klorogensku (7,5 mg g<sup>-1</sup>) i galnu kiselina (2,8 mg g<sup>-1</sup>). U sjemenu lana zabilježen je značajan udio glukoziida hidroksicimetnih kiselina, osobito ferulinske i *p*-kumarinske kiseline, koji posjeduju znatnu antioksidacijsku aktivnost (Beejmohun i sur., 2007).

Flavonoidi su polifenoli čiju osnovnu strukturu čini difenilpropan (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>), a mogu se podijeliti u nekoliko podskupina: antocijani, flavan-3-oli, flavoni, flavanoni, flavonoli i izoflavoni (Kasote, 2013). Udio flavonoida u sjemenu lana varira u ovisnosti o području uzgoja, a najčešće su prisutni u količini od 35 mg do 71 mg na 100 g sjemena (Johnsson i sur., 2002). U lanenom sjemenu najzastupljeniji su flavon C- i O-glikozidi poput herbacetin 3, 7-O-diglukopinanozida, herbacetin 3, 7-O-dimetiletera i kampferol 3, 7-O-diglukopiranozida. Herbacetin diglukozid (HDG) je ester vezan na 3-hidroksi-3-metilglutarnu kiselinu lignan makromolekule (Struijs i sur., 2007).

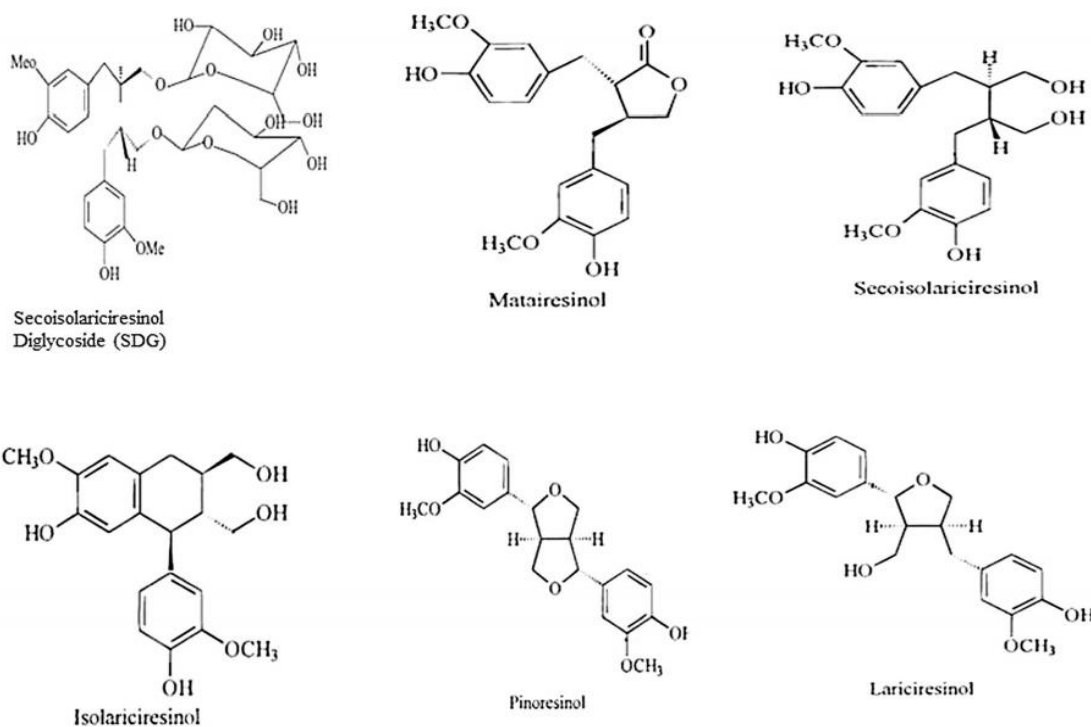
### 2.5.2. Lignani

Laneno sjeme je najbogatiji prirodni izvor lignana u prehrani te sadrži 75-800 puta više lignana u odnosu na razne žitarice, leguminoze, voće i povrće (Kajla i sur., 2015). Lignani su bioaktivne tvari koje imaju slabo estrogeno djelovanje zbog čega se svrstavaju u skupinu fitoestrogena. Fitoestrogeni su tvari koje sintetiziraju biljke, a smatra se kako imaju djelovanje vrlo slično djelovanju estrogena u ljudskom organizmu zbog slične kemijske strukture. Ovisno o koncentraciji u kojoj su prisutni, fitoestrogeni mogu djelovati kao slabi estrogeni zbog vezanja na estrogen receptore staničnih membrana, ili mogu djelovati kao antagonisti estrogena sprječavajući vezanje estrogena na receptore (Benassayag i sur., 2002). Zbog činjenice da su fitoestrogeni biološki aktivne tvari, sve se više istražuje njihov utjecaj na očuvanje zdravlja i prevenciju pojave kroničnih nezaraznih bolesti.

Najzastupljeniji lignan je sekoizolarikirezinol (SECO) koji se u sjemenu nalazi u obliku sekoizolarikirezinol-diglukoziida (SDG). SDG-β-D-glukoziidaza hidrolizira glukopiranozidnu vezu SDG-a pri čemu se oslobađa SECO. U sjemenu lana SDG se najčešće nalazi u formi oligomera, tzv. lignan makromolekule ili lignan kompleksa (Herchi i sur., 2014). U lignan makromolekuli SDG je vezan na 3-hidroksi-3-metilglutarnu kiselinu (HMGA), herbacetin



diglukozid, *p*-kumarinsku kiselinu ili glukozide ferulinske kiseline (Yuan i sur., 2008). Zbog toga je vrlo teško odrediti točan udio SDG-a u lanenim sjemenkama zbog nepotpune ekstrakcije, što je razlog znatnoj varijaciji u rezultatima različitih istraživanja. Često se udio SDG-a procjenjuje na temelju koncentracije SECO-a kao završnog metabolita, što bi u teoriji bilo točno jedino ako je ta pretvorba potpuna. Na temelju toga je Muir (2006) u svom istraživanju odredio udio SDG-a u cijelim i mljevenim lanenim sjemenkama. Cijele sjemenke u prosjeku su sadržavale 82-2600 mg SDG 100 g<sup>-1</sup> sjemena, a žličica mljevenih sjemenki 8-208 mg SDG.



Slika 3. Kemijska struktura lignana prisutnih u lanenim sjemenkama (Kajla i sur., 2015)

Osim SDG-a u lanenim sjemenkama prisutne su i manje količine matarezinola (0,55 mg 100 g<sup>-1</sup>), larikirezinola (3,04 mg 100 g<sup>-1</sup>), izolarikirezinola, pinorezinola (3,32 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Goyal i sur., 2014; Sicilia i sur., 2003). Udio lignana u lanenim sjemenkama varira u ovisnosti o vrsti, mjestu uzgoja i klimatskim uvjetima. Biodostupnost lignana iz lanenih sjemenki može se povećati drobljenjem i mljevenjem sjemenki za prosječno 15 % (Kuijsten i sur., 2005).

SDG, SECO, matarezinol, larikirezinol i pinorezinol (Slika 3) se pod djelovanjem bakterija u debelom crijevu prevode u enterodiol (END) i enterolakton (ENL), dok izolarikirezinol nije podložan toj konverziji (Morris, 2007). END i ENL nazivaju se i enterolignani, tj. lignani

prisutni u sisavaca zato što nastaju u crijevu sisavaca te nisu prisutni u biljkama. Smatra se kako imaju protuupalno i antimikrobno djelovanje te smanjuju rizik pojave kardiovaskularnih i hormonski ovisnih kancerogenih oboljenja (Kajla i sur., 2015).

Enterolignani imaju jače antioksidacijsko djelovanje od lignana zbog čega se smatra kako je konverzija u debelom crijevu ključna za ispoljavanje pozitivnog učinka na zdravlje. Međutim, istraživanja su pokazala kako biološka aktivnost lignana znatno ovisi o prisutnosti određenih vrsta crijevnih bakterija (Clavel i sur., 2006). Kod nekih ljudi nije prisutan dovoljan broj ili određena vrsta crijevnih bakterija koja je potrebna za pretvorbu SDG-a i ostalih lignana u enterolignane (Morris, 2007). Osim toga, metabolizam lignana je vrlo kompleksan i još uvijek nedovoljno istražen, a pokazalo se kako u ljudskom organizmu ne dolazi do potpune pretvorbe u enterolignane. Moguće je kako postoji još metabolita zbog čega je teško odrediti koja vrsta lignana i u kojoj biološki aktivnoj formi ima najpovoljniji utjecaj na zdravlje (Morris, 2007).

### 2.5.3. Antioksidacijska aktivnost

Posljednjih nekoliko godina sve veći naglasak stavlja se na važnost fenolnih spojeva, kao jakih antioksidansa u ljudskoj prehrani, koji sprječavaju stanična oštećenja. Antioksidansi su tvari koje usporavaju ili sprječavaju nepoželjne reakcije oksidacije drugih tvari uzrokovane djelovanjem slobodnih radikala u našem organizmu. Slobodni radikali stvaraju se u tijelu u normalnim fiziološkim procesima dobivanja energije u stanicama, a posljedica su loših životnih navika i rezultat su vanjskih čimbenika (npr. stres, UV-zračenje, zagađeni zrak). Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale, a da pritom sami ostaju stabilni, sprječavaju pojavu lančane reakcije slobodnih radikala i popravljaju oštećenja u stanici nastala njihovim djelovanjem. Antioksidansi se prema podrijetlu mogu podijeliti na prirodne i sintetske, a prema načinu djelovanja na primarne i sekundarne. Primarni antioksidansi doniraju vodikov atom slobodnom radikalumu čime ga stabiliziraju i zaustavljaju lančanu reakciju. Sekundarni antioksidansi djeluju na više načina, od kojih se ističe vezanje iona metala koji kataliziraju reakcije oksidacije (kelacija) (Touré i Xueming, 2010).

Namirnice koje sadrže visok udio nezasićenih masnih kiselina vrlo su podložne procesu oksidacije. Reakcije oksidacije u sustavima hrane rezultiraju promjenom boje, okusa i mirisa proizvoda, te posljedično do gubitka nutritivne vrijednosti. Osim toga, kao produkti oksidacije mogu nastati toksični produkti, zbog čega postoji potreba dodatka antioksidansa kako bi se očuvala kvaliteta proizvoda. U tu svrhu često se koriste sintetski antioksidansi poput butil

hidroksitoluena (BHT) i butil hidroksianizola (BHA), dok se od prirodnih antioksidansa koriste askorbinska kiselina i  $\alpha$ -tokoferol (Kasote, 2013). Kako brojna istraživanja ukazuju na potencijalnu toksičnost sintetskih antioksidansa, sve je veća potražnja za novim i sigurnim antioksidansima prirodnog porijekla. Lanena pogača je vrlo vrijedan izvor spojeva koji imaju antioksidacijsku aktivnost, posebice lignana, fenolnih kiselina i flavonoida. Zbog toga bi se fenolni spojevi mogli izolirati iz lanene pogače te koristiti u prehrambenoj industriji kao prirodni antioksidansi uz istovremeno nutritivno obogaćivanje proizvoda.

Antioksidacijska aktivnost lignana temelji se na zaustavljanju reakcija oksidacije reaktivnih kisikovih vrsta uslijed vezanja hidroksilnih radikala. Istraživanja su pokazala kako SECO, END i ENL imaju 3.82, 3.95 i 3.43 puta veću antioksidacijsku aktivnost od SDG-a (Touré i Xueming, 2010). Nadalje, SDG, SECO, END i ENL imaju veću antioksidacijsku aktivnost od BHT-a te  $\alpha$ -tokoferola (Kasote, 2013). Zbog toga se smatra kako mogu učinkovito zamijeniti sintetske antioksidanse koji se koriste u hrani i kozmetici.

## **2.6. KRIOGENO MLJEVENJE**

Pojam „kriogeno“ potječe od grčkih riječi *krýos* (jako hladno) i *genics* (proizvodnja) što zapravo podrazumijeva proizvodnju pomoću određenog izvora hlađenja. Smatra se kako kriogena proizvodnja započinje pri temperaturi od  $-150^{\circ}\text{C}$  i niže, a u tu svrhu koriste se kriogene tekućine (Junghare i sur., 2017). Kriogene tekućine nastaju kriogenom frakcionacijom pri čemu se plinovi odvajaju tako što ih se hladi dok ne prijeđu u tekuće stanje. Kao kriogena tekućina najčešće se koristi tekući dušik ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) zbog svojih karakterističnih kemijskih i fizikalnih svojstava koja uključuju inertnost, nizak viskozitet i površinsku napetost te dostupnost na tržištu. Osim tekućeg dušika mogu se koristiti tekući helij, tekući neon, tekući zrak, tekući argon ili tekući kisik.

Kriogeno mljevenje je postupak mehaničkog usitnjavanja različitih materijala na vrlo sitne čestice pri niskim temperaturama odnosno pri temperaturi kriogene tekućine (Ye i Schoenung, 2004). Tehnologija kriogenog mljevenja je osmišljena kako bi se izbjegli nedostaci suhog i mokrog mljevenja, posebice znatan porast temperature materijala te njegovo sljepljivanje. Zbog toga je omogućeno finije mljevenje materijala u usporedbi s konvencionalnim metodama mljevenja. Postupkom kriogenog mljevenja ispitivani materijal hladi se na vrlo niske temperature pri čemu dolazi do slabljenja stanične strukture te posljedično lakšeg i preciznijeg mljevenja takvog materijala. S obzirom na to da većina materijala hlađenjem postaje krhka i lomljiva, kriogeno mljevenje primjenjivo je u raznim znanstvenim područjima.

Kriogeno mljevenje može se koristiti za usitnjavanje i homogenizaciju tvrdih, mekih, krhkih, elastičnih ili vlaknastih materijala.

Ako bi se proces kriogenog mljevenja koristio u industrijskoj proizvodnji, potrebno je uzeti u obzir i ograničenja primjene. Glavno ograničenje su veći troškovi proizvodnje, prvenstveno zbog korištenja tekućeg dušika (oko 43 % od ukupnih troškova), nakon čega slijede troškovi opreme (34 %), radne snage (18 %) te energenata (5 %) (Ghodki i sur., 2018). Također, potrebno je regulirati procesne parametre za različite materijale koji se usitnjavaju što predstavlja izazov zbog cijene samog procesa.

### 2.6.1. Kriomlin

Kriomlin je laboratorijski uređaj koji se koristi za provedbu usitnjavanja materijala kriogenim postupkom te spada u skupinu kugličnih mlinova (Slika 4). Kuglični mlin je uređaj za usitnjavanja tvrdih materijala pomoću čeličnih kuglica, pri čemu bubanj s uzorkom rotira. Uređaj je povezan pomoću cijevi s izvorom tekućeg dušika koji je pohranjen u spremniku čime se osigurava integrirani sustav hlađenja. Na taj se način tekući dušik uvodi kontinuirano u sustav u točno određenim količinama kako bi se radna temperatura održala na  $-196^{\circ}\text{C}$  (Retsch, 2017a). Automatski sustav hlađenja osigurava kontinuirano hlađenje posudice s uzorkom prije i tijekom cijelog procesa mljevenja, pri čemu proces započinje tek kada je uzorak ohlađen na radnu temperaturu. Time se postiže efikasnije usitnjavanje, ali i očuvanje kvalitete uzorka.



Slika 4. Kriomlin (Retsch, 2017a)

Princip rada uređaja temelji se na horizontalnim oscilacijama posudice za mljevenje pri čemu zbog sile inercije, čelične kuglice velikom energijom udaraju u uzorak. Zbog kombinacije udara i trenja uzorak postaje vrlo lomljiv i krhak te se naposljetku usitnjava na vrlo male čestice. Gustoća i težina materijala od kojeg su izrađene kuglice za mljevenje direktno će utjecati na energiju usitnjavanja (Retsch, 2017b). Uređaj kriomlin opremljen je s jedinicom za mljevenje u koju se stavlja posudica za mljevenje koja može biti volumena od 10, 25, 35 ili 50 mL. Prilikom popunjavanja posudice za mljevenje 1/3 posudice mora biti popunjena kuglicama za mljevenje, 1/3 uzorkom, a 1/3 je potrebno ostaviti praznom kako bi kuglice imale dovoljno prostora za kretanje (Retsch, 2017a). Time se omogućava efikasnije i ravnomjernije usitnjavanje uzorka. Veličina uzorka koji se podvrgava kriogenom mljevenju trebala bi biti manja ili jednaka 8 mm, a volumen uzorka do 20 mL (Retsch, 2017c).

Kriomlin omogućuje korištenje 3 različita načina mljevenja: kriogeno, suho i mokro mljevenje pri sobnoj temperaturi. Radne frekvencije kreću se do 30 Hz, a automatsko doziranje tekućeg dušika omogućava sigurnost pri rukovanju s uređajem. Posudice za mljevenje izvedene su tako da je onemogućeno curenje uzorka, a postoji mogućnost postavljanja ciklusa mljevenja i hlađenja (Retsch, 2017c). Prednosti kriogenog mljevenja su višestruke, zbog čega se sve više istraživanja usmjerava prema primjeni procesa u raznim industrijama.

#### 2.6.2. Prednosti kriogenog mljevenja

Neke od prednosti kriogenog mljevenja, u odnosu na mljevenje pri sobnoj temperaturi, uključuju povećanje produktivnosti, finije i ujednačenije mljevenje, manju potrošnju energije, sprječavanje sljepljivanja uzorka i njegovog prianjanja na opremu te automatiziranost procesa (Junghare i sur., 2017). Mikronizacija je proces koji se sve više koristi u istraživanjima prehrambene i farmaceutske industrije u svrhu povećanja dostupnosti nutrijenata, a time i njihovu bolju apsorpciju u organizmu (Niwa i sur., 2010). Proces usitnjavanja mnogo je učinkovitiji u usporedbi s mljevenjem pri sobnoj temperaturi. Pritom se dobiju veličine čestica od oko 50  $\mu\text{m}$  što bi se pri sobnoj temperaturi postiglo tek nakon 3 uzastopna mljevenja (Hemery i sur., 2011).

Osim toga, mikronizacijom se omogućava oštećenje stanične strukture bez uporabe kemikalija, pri čemu dolazi do oslobađanja bioaktivnih komponenti iz stijenke stanica. U istraživanju koje su proveli Voučko i sur. (2018) kriogenim mljevenjem pogače bučinih sjemenki dobivene su čestice koje su tri puta manje u odnosu na mljevenje bez korištenja

tekućeg dušika. Osim toga, dolazi do povećanja ukupnog udjela fenolnih spojeva zbog povećanja aktivne površine. Mljevenje pri niskim temperaturama direktno utječe na ograničeno stvaranje topline tijekom procesa, čime se omogućava očuvanje aktivnosti bioaktivnih komponenti (Hemery i sur., 2011). Isto tako, omogućeno je očuvanje arome i eteričnih ulja prilikom mljevenja začinskog bilja zbog primjene nižih temperatura (Meghwal i Goswami, 2010). Saxena i sur. (2015) proučavali su utjecaj kriogenog mljevenja na udio fenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost različitih vrsta korijandera. U uzorcima koji su bili kriogeno mljeveni došlo je do povećanja udjela fenolnih kiselina i flavonoida, dok je antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom bila značajno veća u odnosu na konvencionalno mljevenje.

Smanjenje veličine čestica namirnica koje su bogate vlaknima utječe na strukturu, povećanje aktivne površine te funkcionalna svojstva dobivenih čestica (Hemery i sur., 2011). Mikronizacijom također može doći do povećanja udjela topljivih vlakana u odnosu na netopljiva (Zhu i sur., 2010). Nyström i sur. (2007) proučavali su učinke termičkog i enzimskog tretmana, konvencionalnog mljevenja te kriogenog mljevenja na biodostupnost ukupnih sterola rižinih i pšeničnih mekinja. Najbolji rezultati dobiveni su procesom kriogenog mljevenja pri čemu je izoliran najveći udio sterola. Kriogeno mljevenje može biti korisno za brzo smanjenje veličine čestica, za smanjenje potrošnje energije tijekom mljevenja i za očuvanje temperaturno osjetljivih spojeva (Hemery i sur., 2011).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

Kao materijal u ovom radu korišteno je sjeme lana uzgojeno 2018 g. na području Sisačko-moslavačke županije, od strane OPG Janković. Iz sjemena je u laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu proizvedeno hladno prešano laneno ulje postupkom dvostrukog prešanja na pužnoj preši (Komet, model CA/53, Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka). Pogača, tj. nusproizvod u procesu proizvodnje ulja, samljevena je na mlinu s diskovima nakon drugog prešanja, a do daljnjih analiza skladištena je u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. METODE RADA

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

##### *Princip određivanja:*

U ovom radu je za određivanje vode u sjemenu i pogači lana korištena standardna metoda (HRN EN ISO 665:2004). Princip metode temelji se na sušenju do konstantne mase u sušioniku pri temperaturi od  $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Analiza sjemena lana provela se bez prethodnog mljevenja.

##### *Aparatura i pribor:*

- Metalne posudice
- Sušionik (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
- Laboratorijska žlica
- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)

##### *Postupak određivanja:*

U osušenu i izvaganu posudicu izvaže se na analitičkoj vagi 5 g sjemena odnosno pogače. Posudica se s podignutim poklopcem stavi u sušionik koji je prethodno potrebno zagrijati na  $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Nakon 2 sata posudica se zatvori poklopcem u sušioniku i stavi hladiti u eksikator. Kada se ohladi do sobne temperature, posudica se izvaže. Potom se ponovi

postupak sušenja uz smanjeno vrijeme od jednog sata. Sušenje se provodi sve dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne iznosi više od 0,005 g. Za svaki uzorak potrebno je napraviti dva paralelna određivanja, među kojima razlika ne prelazi 0,5 %. Rezultat se prikazuje kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja.

Udio vode i hlapljivih tvari izražava se u postocima prema jednadžbi [1]:

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

gdje je:

$m_0$  – masa prazne posudice (g)

$m_1$  – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

$m_2$  – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

### 3.2.2. Određivanje udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači

#### *Princip određivanja:*

Za određivanje udjela ulja u uzorcima lanenog sjemena i pogače u ovom radu korištena je standardna metoda ekstrakcije po Soxhletu (HRN EN ISO 659:2010). Metoda se temelji na ekstrakciji ulja pomoću organskog otapala pri čemu se otapalo zagrijava i isparava, a potom se kondenzira iznad uzorka. Otapalo kaplje na uzorak pri čemu se iz uzorka izdvaja ulje.

#### *Aparatura i pribor:*

- Električni mlin za mljevenje
- Kupelj za zagrijavanje (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Ekstraktor u kojeg je umetnuta čahura s uzorkom
- Povratno hladilo za kondenzaciju otapala
- Tikvica za sakupljanje otapala s ekstrahiranim komponentama
- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Sušionik (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Rotacijski otparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka)

#### *Reagensi:*

- Petroleter, Kefo (Sisak, Hrvatska)



*Postupak određivanja:*

U čahuru koja je napravljena od filter papira (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm) odvaži se 10 g samljevenog uzorka sjemena odnosno pogače. Potom se čahura zatvori vatom i postavi u aparaturu za ekstrakciju po Soxhletu. Prije analize sjeme lana samljeveno je u električnom mlinu za mljevenje. Kao otapalo prilikom ekstrakcije koristi se petroleter, a masna frakcija se izdvaja s kondenziranim otapalom u izvaganu tikvicu u koju su prethodno stavljene 2-3 kuglice za vrenje. Ekstrakcija se provodi 8 sati nakon čega se otapalo otpari na rotacijskom otparivaču. Ostatak se suši 60 minuta pri  $103 \pm 2^\circ\text{C}$ , ohladi i izvaži. Sušenje se nastavlja po 30 minuta do postizanja konstantne mase. Za svaki uzorak provode se dva paralelna određivanja, među kojima razlika ne prelazi 0,5 %. Rezultat se prikazuje kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja.

Udio ekstrahiranog ulja računa se prema formuli [2]:

$$\text{Udio ulja (\%)} = 100 \times \frac{m_0}{m_1} \quad [2]$$

gdje je:

$m_0$  = masa ulja (g)

$m_1$  = masa sjemena/pogače (g)

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina dvaju paralelnih određivanja. Iz rezultata udjela ulja i vode u sjemenu i pogači moguće je izračunati iskorištenje procesa proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja prema formulama [3] i [4]:

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

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

$m_u$  = masa proizvedenog ulja (g)

$u_s$  = udio ulja u sjemenu (%)

$u_p$  = udio ulja u pogači (%)

$v_s$  = udio vode u sjemenu (%)

$v_p$  = udio vode u pogači (%)

### 3.2.3. Određivanje udjela mineralnih tvari u pogači

#### *Princip određivanja:*

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

#### *Aparatura i pribor:*

- Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Graduirana pipeta (2 mL)
- Električna ploča
- Mufolna peć za spaljivanje (Heraew)
- Laboratorijska kliješta
- Porculanske zdjelice

#### *Reagensi:*

- Etanol 95 % (V V<sup>-1</sup>), Kefo (Sisak, Hrvatska)

#### *Postupak određivanja:*

U prethodno izžarenu i izvaganu posudu za spaljivanje izvaže se 5 g lanene pogače i ravnomjerno rasprostire u sloju jednake debljine. Kako bi izgaranje bilo ujednačeno, u svaki uzorak se stavi po 1-2 mL etanola. Posude s uzorkom najprije se spaljuju na električnoj ploči do prestanka dimljenja. Prilikom spaljivanja potrebno je pripaziti da se pri izgaranju ne pojavi plamen. Uzorci se potom postave u hladnu mufolnu peć, a izgaranje se provodi na  $800^\circ\text{C}$ . Nakon 4 sata, posudice se hlade u eksikatoru do sobne temperature i važu. Za svaki uzorak provedena su 3 paralelna određivanja, a količina mineralnih tvari izračunata je prema formuli [5]:

$$\% \text{ mineralnih tvari} = m_1 \times \frac{100}{m_0} \times \frac{100}{100-v} \quad [5]$$

$m_0$  = masa uzorka (g)

$m_1$  = masa ostatka (g)

$v$  = količina vode u ispitanom uzorku (%)

### 3.2.4. Mljevenje pogače kriomlinom

#### *Princip određivanja:*

Lanena pogača samljevena je na vibracijskom kriomlinu (Retsch+Apollo, Haan, Njemačka) koji je povezan pomoću cijevi sa spremnikom tekućeg dušika čija je temperatura -196°C. Uređaj se sastoji od kućišta, cilindra za mljevenje s čepom za zatvaranje, cilindra za protutežu, posude za mljevenje, filter rešetke, ventila za dovod dušika i ventila za regulaciju tlaka.

#### *Aparatura i pribor:*

- Vibracijski kriomlin sa spremnikom za tekući dušik (Retsch+Apollo, Haan, Njemačka)
- Tehnička vaga (KERN KB2000-2N Balingen, Njemačka)
- Metalna žlica

#### *Postupak određivanja:*

8 ± 0,1 g uzorka pogače izvaže se i prebaci u posudu za mljevenje uz dodatak 12 malih metalnih kuglica promjera 10 mm. Posuda se umetne u cilindar, zatvori čepom i dobro stegne odvijačem kako ne bi došlo do curenja uzorka prilikom analize. Vrijeme i načini mljevenja uzorka pogače koji su provedeni prikazani su u tablici 2, a za potrebe daljnjih analiza ovog istraživanja korišteni su uzorci s dva različita vremena mljevenja pogače, 8 i 16 minuta te dva načina mljevenja, s i bez hlađenja. Uz kontrolni uzorak pogače lana, koji nije bio dodatno usitnjen, to je činilo ukupno 5 uzoraka pogače koja je nakon usitnjavanja skladištena u zamrzivaču na -20°C do daljnjih analiza.

Kada se provodi mljevenje bez primjene hlađenja, potrebno je podesiti samo vrijeme mljevenja i frekvenciju (30 Hz). Prije početka mljevenja uz hlađenje, otvori se ventil za dovod dušika i namjestite se željeni parametri: prethlađenje, vrijeme mljevenja, broj kriociklusa (u ovom istraživanju bio je 1) i frekvencija (30 Hz). Tlak dušika na izlazu iz spremnika tijekom cijelog procesa održavan je na 1,3 bara zbog optimizacije. Nakon provedenog mljevenja, uzorak se vadi iz posude, a cilindar je potrebno odmah zatvoriti kako bi se spriječio ulazak vlage.

Tablica 2. Kriogeno mljevenje uzoraka

Oznaka	Kriogeno mljevenje (Da/Ne)	Prethlađenje	Trajanje ciklusa mljevenja (min)
<b>P (kontrolni)</b>	Ne	/	0
<b>2 BH</b>	Ne	/	2
<b>4 BH</b>	Ne	/	4
<b>6 BH</b>	Ne	/	6
<b>8 BH</b>	Ne	/	8
<b>10 BH</b>	Ne	/	10
<b>12 BH</b>	Ne	/	12
<b>16 BH</b>	Ne	/	16
<b>2 H</b>	Da	Da	2
<b>4 H</b>	Da	Da	4
<b>6 H</b>	Da	Da	6
<b>8 H</b>	Da	Da	8
<b>10 H</b>	Da	Da	10
<b>12 H</b>	Da	Da	12
<b>16 H</b>	Da	Da	16

### 3.2.5. Određivanje veličine čestica

#### *Princip određivanja:*

Mjerenje veličine čestica provedeno je metodom laserske difrakcije. Laserska difrakcija mjeri raspodjelu veličine čestica mjerenjem kutne varijacije o intenzitetu svjetlosti rasute kada laserska zraka prođe kroz raspršeni uzorak čestica. Za analizu je korišten laserski analizator veličine čestica Malvern 2000 s opremljenom jedinicom za suhu disperziju Scirocco 2000 (Slika 5), koji su povezani s računalnom jedinicom, Mastersizer 2000 softwareom v. 5.60.

#### *Aparatura i pribor:*

- Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, Velika Britanija)

### *Postupak određivanja:*

Raspodjela veličina čestica uzoraka pogače lana, mljevene pogače lana bez hlađenja i mljevene pogače lana s hlađenjem provedena je u suhoj disperziji pri sobnoj temperaturi. Na Malvern Mastersizer uređaju moguće je provesti mjerenje veličine čestica u rasponu od 0.02 do 2000  $\mu\text{m}$ . Za svaki od uzoraka provedena su tri paralelna mjerenja u trajanju od pet sekundi, a kao disperzno sredstvo korišten je zrak. Nakon odabira odgovarajuće jedinice i prilikom pokretanja procesa, uređaj prvo provodi kalibraciju. Zasićenje laserske zrake potrebno je podesiti na 2-6 %, primijenjena frekvencija iznosila je 100 %, a tlak 1,5 bara.



Slika 5. Malvern Mastersizer 2000 (Vlastita fotografija)

Oko 7 g uzorka je stavljeno u kadnicu za suhu disperziju. U trenutku kada kadica počne vibrirati uzorak se počne spuštati niz kadnicu prema otvoru kroz koji prolazi i upada na žičano sito. U situ se nalaze kuglice koje omogućuju nesmetan protok uzorka i pomažu razbiti potencijalne aglomerate u praškastom uzorku. Prolaskom čestica kroz sito njihovo se strujanje ubrzava pomoću stlačenog zraka i one se raspršuju. Potom prolaze kroz zračnu ćeliju i ulaze u optičku jedinicu u kojoj se provodi mjerenje. Raspodjela veličine čestica izračunata je pomoću programskog paketa koji se isporučuje s uređajem (Mastersizer 2000 software v. 5.60).

Rezultati mjerenja se prikazuju kao percentili raspodjele veličine čestica:

- $d(0,1)$  predstavlja veličinu čestice od koje je manje 10 % čestica cijelog uzorka ( $\mu\text{m}$ )

- $d(0,5)$  predstavlja promjer čestice za koji vrijedi 50 % ukupnog broja čestica ima promjer veći od tog promjera i 50 % ukupnog broja čestica ima promjer manji od tog promjera ( $\mu\text{m}$ )
- $d(0,9)$  predstavlja veličinu čestice od koje je manje 90 % čestica cijelog uzorka ( $\mu\text{m}$ )
- $D[3,2]$  predstavlja površinski ekvivalentni promjer, tj. Sauterov promjer ( $\mu\text{m}$ )
- Raspon predstavlja širinu raspodjele čestica i računa se prema formuli [6]:

$$\text{Raspon} = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad [6]$$

- Specifična površina predstavlja ukupnu površinu čestica podijeljenu s ukupnom masom čestica ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ).

### 3.2.6. Ekstrakcija nepolarnih komponenti

#### *Princip određivanja:*

Ekstrakcija nepolarnih komponenti provedena je prema modificiranoj metodi objavljenoj u radu Kraljić i sur. (2013). Ekstrakcija komponenti provodi se na osnovi njihove različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju.

#### *Aparatura i pribor:*

- Plastične kivete (50 mL)
- Menzura (50 mL)
- Metalna žlica
- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Tresilica (IKA MS 3 basic, IKA-Works, Staufen im Breisgau, Njemačka)
- Centrifuga (Rotina 35, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Njemačka)
- Filter papir (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm)
- Büchnerov lijevak
- Tikvica s okruglim dnom (50 mL)
- Rotacijski otparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka)

#### *Reagensi:*

- Heksan, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

#### *Postupak određivanja:*

U plastične kivete od 50 mL odvaži se 2 g lanene pogače nakon čega se doda 20 mL heksana. Kivete s uzorcima se horizontalno postave na tresilicu te se ekstrakcija provodi 30 min. Slijedi centrifugiranje 10 min na  $5000 \text{ okr min}^{-1}$  kako bi se odvojila kruta od tekuće faze. Dobiveni supernatant se profiltrira preko filter papira na Büchnerovom lijevku i sakuplja u tikvicu. Postupak ekstrakcije nepolarnih komponenti ponavlja se još 2 puta s istim uzorkom pogače, a sveukupno bilo je 5 uzoraka pogače mljevene pri različitim uvjetima. Nakon ekstrakcije otapalo se otpari na rotacijskom otparivaču pri  $60^\circ\text{C}$ . Dobivene masne frakcije koristile su se za određivanje sterola, a do same analize skladištene su u zamrzivaču na  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 3.2.7. Određivanje udjela i sastava sterola

##### *Princip određivanja:*

Za određivanje koncentracije i sastava sterola u uzorcima nepolarne frakcije ekstrahirane iz uzoraka lanene pogače korištena je metoda HRN EN ISO 12228-1:2014. Metoda se temelji na tome da se uzorak kojemu je dodan  $\alpha$ -kolestanol kao unutarnji standard, podvrgava saponifikaciji s etanolnom otopinom KOH. Neosapunjiva frakcija ekstrahira se dietil eterom na koloni ispunjenoj aluminijskim oksidom. Aluminijski oksid zadržava anione masnih kiselina, a propušta negliceridne komponente. Iz neosapunjive frakcije se, pomoću tankoslojne kromatografije na bazičnom silikagelu, izdvaja sterolna frakcija. Sterolna frakcija prevodi se u trimetilsililestere te analizira plinskim kromatografom s masenim detektorom.

##### *Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Tikvice s ravnim dnom (25 mL)
- Tikvice s okruglim dnom (25 mL i 50 ml)
- Povratno hladilo
- Plinski plamenik
- Graduirane pipete (5 mL)
- Kolona za kromatografiju sa sinterom na dnu
- Stakleni štapić
- Laboratorijske čaše (50 mL)
- Menzure (50 mL)
- Rotacijski otparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka)

- Mikropipeta
- Kapilarne cjevčice
- Razvijajuće kadice za TLC
- Metalna špatula
- Filter papir (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm)
- Stakleni lijevak
- Sušionik (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
- Spremnik s dušikom
- Vijalice s insertom
- Uređaj za plinsku kromatografiju, Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD)
  - Maseni detektor tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector
  - Kapilarna kolona Agilent DB-17MS (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ )
  - Računalo

*Reagensi:*

- Kalijev hidroksid KOH (0,5 mol L<sup>-1</sup>)- otopiti 3 g KOH u 5 mL vode i razrijediti u 100 mL 95 %-tnog etanola (V V<sup>-1</sup>)
- Interni standard,  $\alpha$ -kolestanol (1,0 mg mL<sup>-1</sup> u 95 %-tnom etanolu (V V<sup>-1</sup>))
- Etanol 95 % (V V<sup>-1</sup>), Kefo (Sisak, Hrvatska)
- Aluminijev oksid (0,063 mm – 0,200 mm; udio vode 0 %)
- Dietil eter, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Silikagel ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC) (Silikagel F<sub>254</sub>, Macherey-Nagel, GmbH, Co. KG)
- Razvijajući reagens (TLC) – heksan/dietil eter (1:1, V V<sup>-1</sup>)
- Heksan, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Otopina standarda za TLC (1,0 mg mL<sup>-1</sup> kolestanola u acetonu i 1,0 mg mL<sup>-1</sup> kolesterola u acetonu)
- Aceton, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Kefo (Sisak, Hrvatska)
- Sililirajući reagens (sastoji se od piridina, heksametilidisilazana i trimetilklorsilana u omjeru 5:2:1 (V V<sup>-1</sup> V<sup>-1</sup>))



### *Postupak određivanja:*

#### Priprema kolone za kromatografiju u stupcu:

Kolona za kromatografiju dugačka je 25 cm, ima unutarnji promjer 1,5 cm te sinter na dnu kolone. Na dno kolone stavi se vata i doda se malo etanola, kako bi vata što bolje prionula uz sinter. Pomoću staklenog štapića istisne se zrak, kako ne bi zaostao u vati. Kolona se pričvrsti za metalni stalak. Odvaži se 10 g aluminijevog oksida koji se uz 20 mL etanola kvantitativno prenese u kolonu za kromatografiju. Punjenje kolone potrebno je provesti pažljivo kako bi se izbjegle moguće pukotine u stupcu aluminijevog oksida. Višak etanola se ispusti iz kolone tako da nivo etanola bude za pola centimetra iznad nivoa vrha stupca aluminijevog oksida.

#### Priprema neosapunjive frakcije:

Za pripremu neosapunjive frakcije odvaži se točno  $0,25 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  uzorka masne frakcije u tikvicu sa ravnim dnom od 25 mL. Potom se izvaganom uzorku doda 1,0 mL prethodno pripremljenog internog standarda (etanolna otopina  $\alpha$ -kolestanola), 5,0 mL otopine KOH ( $c = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) te 2-3 kuglice za vrenje. Tikvica se spoji na povratno zračno hladilo i zagrijava na plameniku preko azbestne mrežice do vrenja. Kada sadržaj tikvice provri, plamen se smanji na najmanji mogući i ostavi da vrije točno 15 minuta, nakon čega se plamen ugasi i tikvica se odvoji od zračnog hladila. Pomoću pipete u tikvicu se doda 5,0 mL etanola, te se tikvica ostavi da se ohladi.

#### Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom na stupcu:

Pomoću pipete od 5 mL, ohlađeni uzorak prebaci se u pripremljenu kolonu s aluminijevim oksidom. Neosapunjiva frakcija skuplja se u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL. Eluiranje traje dok otopina ne dosegne vrh sloja aluminijevog oksida, nakon čega se pipetom doda 5 mL etanola i nastavi se proces eluiranja. Protok otapala tijekom procesa eluiranja treba održavati na oko  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . U kolonu se u obrocima iz menzure doda 30 mL dietil etera kako bi se isprale stijenke čime se završava proces eluiranja. Dobiveni eluat otparuje se do suhog na rotacijskom otparivaču pri  $40^\circ\text{C}$  oko 10 min kako bi se uklonila otapala.

Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom:

Sterolna frakcija se od neosapunjivog dijela odvaja pomoću tankoslojne kromatografije (TLC). Uzorak neosapunjive frakcije se otopi u 0,5 mL dietiletera, te se nanosi mikropipetom na TLC ploču sa silikagelom (veličine 20 x 20 cm, debljine 0,25 mm) u ravnoj liniji, 2 cm od donjeg ruba ploče. Potom se sa još 0,5 mL dietil etera isperu stijenke tikvice te se uzorak ponovno nanosi. Na istoj se visini ispred ove linije nanesu 2-3  $\mu\text{L}$  referentne otopine  $\alpha$ -kolesterola te  $\alpha$ -kolestanola s ciljem identifikacije sterola nakon što se razvije kromatogram. TLC ploča se postavi u kadu koja sadrži 100 ml otopine za razvijanje, u ovom slučaju heksan/dietil eter te se zatvori poklopcem. Kromatogram se razvija pri sobnoj temperaturi, do trenutka kada linija otapala dosegne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče (oko sat i po).

Nakon toga ploča se suši u digestoru. Osušena ploča ravnomjerno se poprskava metanolom dok se ne pojave zone sterola. Zone se označe (2 mm iznad i 4 mm ispod vidljivog traga), ostružu metalnom špatulicom i kvantitativno prenesu u laboratorijsku čašu. Radi kvantitativnog prenošenja silikagela dodaje se 0,5 mL 95 % otopine etanola i prenese u lijevak s filter papirom, a sterolna frakcija se izdvoji ispiranjem u tri navrata s po 5 mL dietil etera. Sterolna frakcija skuplja se u tikvicu od 50 mL s okruglim dnom. Ekstrakt se otparava na rotacijskom otparivaču do volumena od 1 mL na temperaturi od 40°C. Koncentrat se mikropipetom prenese u epruvetu, a stijenke tikvice isperu se sa još 1 ml dietil etera. Epruveta se propuhuje strujom dušika do suhog ostatka koji predstavlja sterolnu frakciju.

Priprema trimetilsililetera:

U epruvetu koja sadrži sterolnu frakciju doda se 100  $\mu\text{L}$  reagensa za sililiranje, epruveta se dobro začepi i stavi u sušionik na temperaturu od  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  na 15 min. Nakon sušenja, epruveta se ohladi u eksikatoru te se prebaci u vijalice od 2 mL s insertom od 100  $\mu\text{L}$ . Bistra otopina injektira se u plinski kromatogram.

Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom:

Pripremljen uzorak analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD). Kromatograf je opremljen sa sustavom za injektiranje uzoraka i masenim detektorom tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector koji je preko kanala spojen na računalo. U kompjuterskom sustavu zadani su uvjeti analize: temperatura kolone, temperatura detektora, temperatura injektora, protok

plina i količina uzorka. Prilikom analize koristila se kapilarna kolona Agilent DB-17MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm), a količina injektiranog uzorka bila je 1 μL. Temperatura injektora iznosila je 290°C, a temperatura kolone je programirana tako da raste 6°C min<sup>-1</sup> od 180 do 270°C pri čemu se maksimalna temperatura zadržava 30 min. Temperatura detektora iznosi 280°C. Kao plin nosioc koristio se helij, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize njegov je protok bio konstantan te je iznosio 1,5 mL min<sup>-1</sup>, uz Split 13,3:1. Analiza je provedena u minimalno 4 paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

Identifikacija sterola provedena je usporedbom retencijskih vremena pripremljenih uzoraka s vremenima zadržavanja trimetilsililetera komercijalno dostupnih standardnih smjesa sterola poznatog sastava analiziranih pod jednakim uvjetima. Kvantitativni sastav sterola određuje se metodom normizacije površine ispod pikova. Iz dobivenih vrijednosti računa se pojedinačni udio sterola koji se izražava kao % od ukupnih sterola.

Udio ukupnih sterola izražen je u mg kg<sup>-1</sup> i izračunat je prema formuli [7]:

$$\text{Ukupni steroli (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\sum A_s \times 1000}{A_\alpha \cdot m} \quad [7]$$

gdje je:

$A_s$  - površina svakog pojedinačnog pika fitosterola

$A_\alpha$  - površina ispod pika  $\alpha$ -kolestanola

$m$  - masa uzorka lanenog ulja (g)

Udio pojedinačnih sterola izražen je kao % od ukupnih sterola i izračunat je prema formuli [8]:

$$\% \text{ od ukupnih sterola} = \frac{A \times 100 \%}{\sum A_i} \quad [8]$$

gdje je:

$A$  - površina ispod pika određenog fitosterola

$A_i$  - površina ispod pika svakog pojedinačnog sterola

### 3.2.8. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom reaktoru

#### *Princip određivanja:*

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je na uređaju za ultrazvučno-mikrovalnu ekstrakciju primjenom isključivo ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Microwave-assisted extraction, MAE) pri čemu je korištena metoda razvijena u diplomskom radu Šrajbek (2017). Mikrovalna ekstrakcija je metoda koja koristi energiju mikrovalova za zagrijavanje otapala s čvrstom tvari u cilju izdvajanja komponenti uzorka u otapalo. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te tako potiče otapanje fenolnih spojeva.

#### *Aparatura i pribor:*

- Erlenmeyerova tikvica
- Epruvete
- Plastične kivete (10 mL)
- Odmjerne tikvice od 10 mL
- Vijalice
- Šprice i PVDF filter (Kromafil, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Ultrazvučno-mikrovalni reaktor (Lab kits, MW-ER-01, Hong Kong, Kina, 2015)
- Tresilica (Vortex 4 basic, IKA)
- Centrifuga (Rotina 35, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen)

#### *Reagensi:*

- Natrijev hidroksid NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>)- otopiti 0,40 g NaOH u 100 mL vode
- 100 % - tni metanol, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Otapalo za ekstrakciju- smjesa 70 % metanola i 30 % 0,1 M NaOH

#### *Postupak određivanja:*

U epruvete se odvaži 0,5 ± 0,01 g različitih uzoraka lanene pogače i 10 mL otapala za ekstrakciju te se kratko izmiješa na vorteksu. Epruveta s uzorkom i otapalom postavljena je u uređaj za ultrazvučno-mikrovalnu ekstrakciju, u posebnu Erlenmeyer-ovu tikvicu s metalnim produžetkom za prijenos mikrovalnih valova koja je spojena s povratnim hladilom. Ekstrakcija je provedena primjenom snage od 300 W u trajanju od 6 minuta. Nakon provedene

ekstrakcije uzorak se stavi centrifugirati 15 minuta na 5000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ , kako bi se fenolni ekstrakt odvojio od lanene pogače. Supernatant se prebaci u odmjerne tikvice od 10 mL te se nadopuni otapalom do oznake. Alikvot iz odmjerne tikvice se pomoću šprice profiltrira u vijalicu kroz PVDF filter veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$ . Pripremljeni ekstrakti služe za određivanje fenolnih spojeva na HPLC sustavu te se do analize čuvaju u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.9. Određivanje sastava fenolnih spojeva lanene pogače

Sastav i koncentracija fenolnih spojeva u različito mljevenim uzorcima lanene pogače određeni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, tzv. HPLC sustav pomoću Agilent Technologies HPLC serije 1200 s binarnom pumpom, autosamplerom i DAD detektorom (Santa Clara, SAD). Razdvajanje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz lanene pogače provedeno je pri  $30^{\circ}\text{C}$  na Phenomenex C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm  $\times$  4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å) pri čemu je korištena metoda razvijena i validirana u diplomskom radu Cvitanić (2016). U sklopu tog rada optimirani su parametri metode: brzina protoka otapala, temperatura kolone, količina injektiranog uzorka te gradijent protoka otapala u ovisnosti o vremenu. Količina injektiranog uzorka iznosila je 5  $\mu\text{L}$ , a kao mobilne faze korištene su 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B). Protok mobilnih faza iznosio je 0,9 mL  $\text{min}^{-1}$  kroz cijelo vrijeme trajanja analize, a primjenjeni gradijent prikazan je u tablici 3. Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su DAD detektorom na 280 i 330 nm. Kroz cijelo vrijeme trajanja analize snimani su spektri u ultraljubičastom području, od 200 do 400 nm.

Tablica 3. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu (Cvitanić, 2016)

<b>Vrijeme (min)</b>	<b>Volumni udio otopine A (%)</b>	<b>Volumni udio otopine B (%)</b>
<b>0</b>	90	10
<b>3</b>	90	10
<b>15</b>	50	50
<b>20</b>	40	60
<b>25</b>	0	100
<b>26</b>	0	100
<b>26.1</b>	90	10
<b>28</b>	90	10

Fenolni spojevi lanene pogače identificirani su usporedbom spektra i retencijskih vremena detektiranih spojeva i standarda. Kvantifikacija fenolnih spojeva u ekstraktu provedena je pomoću internog standarda (formula [9]), tj. 3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeve kiseline. Iz koncentracije (x) izračunata je koncentracija fenolnih spojeva u odvaanim uzorcima pogače prema formuli [10]:

$$x = \frac{A \times c_{i.s.}}{A_{i.s.}} \quad [9]$$

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg mL<sup>-1</sup>)

c<sub>i.s.</sub> - koncentracija razrijeđenog internog standarda (mg mL<sup>-1</sup>)

A - površina ispod pika spoja

A<sub>i.s.</sub> - površina ispod pika internog standarda

$$c \text{ (spoja)} = \frac{x \times V}{m} \times 100 \quad [10]$$

c - koncentracija spoja u odvaanom uzorku (mg 100 g<sup>-1</sup>)

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg mL<sup>-1</sup>)

V - volumen ekstrakta (mL)

m - masa uzorka korištena za ekstrakciju (g)

### 3.2.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva

Antioksidacijska aktivnost je određivana primjenom DPPH i FRAP metoda. Kvantifikacija se u oba slučaja vrši na temelju jednadžbe baždarnog dijagrama napravljenog na računalu (program Microsoft Office Excel) uz vrijednosti dobivene mjerenjem apsorbancije razrijeđenih otopina u vodi topljivog analoga vitamina E, Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) kojima su poznate koncentracije.

#### 3.2.10.1. DPPH metoda

*Princip određivanja:*

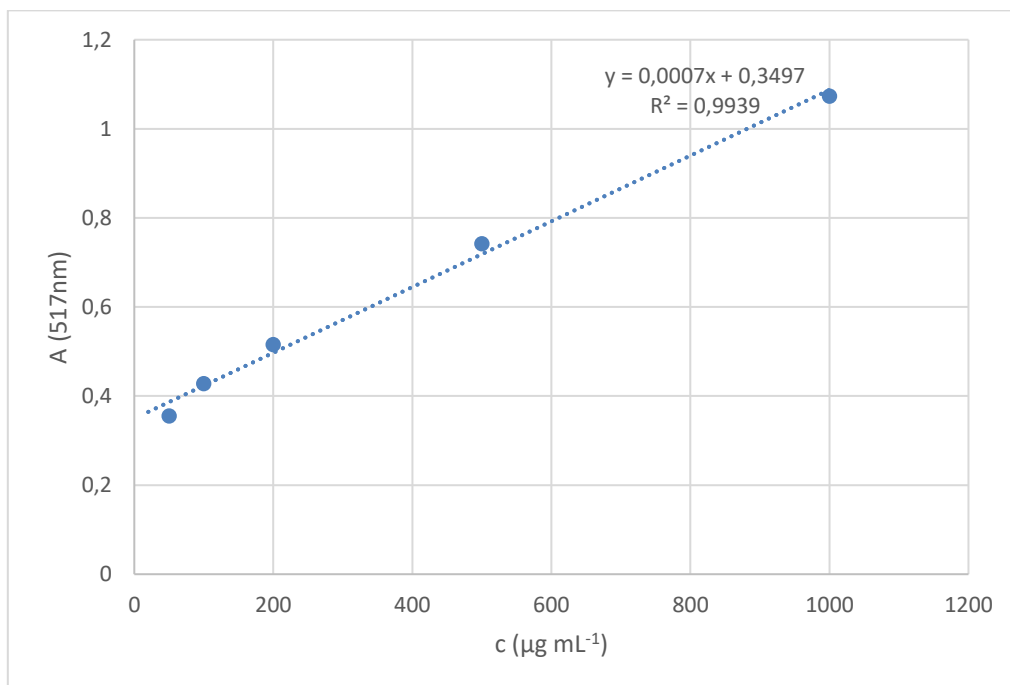
Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištena je metoda bazirana na redukciji DPPH reagensa (slobodni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) pomoću ekstrakta određenog antioksidacijskog kapaciteta (Yu i sur., 2002; Zhou i sur., 2004). Zbog prisutnosti nesparenog



*Postupak određivanja:*

60  $\mu\text{L}$  fenolnog ekstrakta otpipetira se u kivetu, doda se 2850  $\mu\text{L}$  0,06 mM svježe pripremljene DPPH otopine u metanolu i sve zajedno promiješa. Reakcija traje 30 minuta u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm na UV/VIS spektrofotometru. Provedena su 2 paralelna određivanja po jednom uzorku, s pripadajućom slijepom probom za svaki uzorak koja je sastavljena od 60  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 2850  $\mu\text{L}$  metanola.

Koncentracija ukupnih polifenola računa se prema jednadžbi iz baždarnog dijagrama (Slika 7) pripremljenog od svježe Trolox otopine u metanolu određenog raspona koncentracija, korištenjem formula [11] i [12]. Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol}$  Trolox ekvivalenta (TE)  $\text{g}^{-1}$  uzorka.



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A) o koncentraciji (c) Trolox otopine raspona 10-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$

$$x = \frac{y-b}{a} \quad [11]$$

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

y - apsorbancija uzorka

a - nagib pravca iz baždarnog dijagrama



$$c(\text{spoja}) = \left(\frac{x \times V}{m}\right) \times 100 \quad [12]$$

c - koncentracija spoja u odvaganoj uzorku (mg 100 g<sup>-1</sup>)

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg mL<sup>-1</sup>)

V - volumen ekstrakta (mL)

m – masa uzorka korištenog za ekstrakciju (g)

### 3.2.10.2. FRAP metoda

#### *Princip određivanja:*

Antioksidacijska je aktivnost u ispitivanim uzorcima određena pomoću metode prema Benzie i Strain (1996), uz modifikacije. Mehanizam se zasniva na redukciji kompleksa željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom (Fe (III) (TPTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>) u Fe (II) pomoću antioksidanasa iz ekstrakta, pri čemu dolazi do promjene boje iz žute u plavu. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm, a rezultati se izražavaju kao μmol Trolox ekvivalenta (TE) g<sup>-1</sup> uzorka.

#### *Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga Mettler (točnosti ±0,01 g)
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Mikropipete, volumena 100 μL i 1000μL
- Staklene čaše, volumena 50 mL
- Vodena kupelj
- Termometar
- Mikrokivete
- Spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)

#### *Reagensi:*

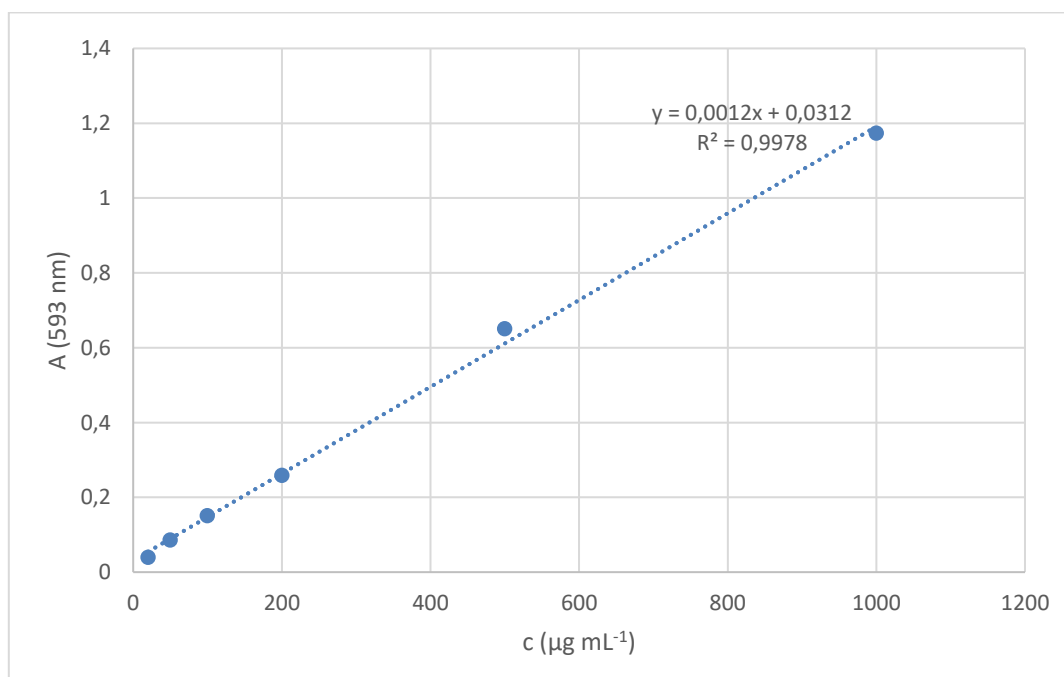
- 20 mM željezovog klorida heksahidrata (FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O) - 0,054 g FeCl<sub>3</sub> x 7 H<sub>2</sub>O otopi se u 10 mL destilirane vode.
- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline HCl - 343 μL 12 M HCl (konc. HCl = 37 %), razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.
- 10 mM otopina TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazin) u 40 mM HCl-u - 0,0312 g TPTZ-a se otopi u odmjernoj tikvici od 10 mL s 40 mM HCl-om, te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake.

- 300 mM acetatni pufer, pH 3,6-3,1 g natrijevog acetata trihidrata otopi se u 16 mL ledene octene kiseline u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) u čistom metanolu, Sigma Aldrich Co., St. Louis, SAD
- 100 % - tni metanol, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska

*Postupak određivanja:*

FRAP reagens priprema se miješanjem 2,5 mL 20 mM željezovog klorida heksahidrata ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 2,5 mL 10 mM TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-S-triazina) u 40 mM HCl i 25 mL 300 mM acetatnog pufera. Otopina se neposredno prije upotrebe mora zagrijati i održavati na 37°C.

Za svaki uzorak provedena su 2 paralelna određivanja. 10  $\mu\text{L}$  uzorka i 1 mL FRAP reagens otpipetira se u mikrokivete dok slijepu probu čini samo FRAP reagens. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm nakon 4 minute reakcije. Za određivanje udjela fenola u ekstraktu izrađen je baždarni dijagram od svježe otopine Trolox-a u metanolu određenog raspona koncentracija (Slika 8). Za izračun koncentracija fenolnih spojeva u ekstraktu i odvaganoj uzorku korištene su formule [11] i [12], a rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol}$  Trolox ekvivalenta (TE)  $\text{g}^{-1}$  uzorka.



Slika 8. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A) o koncentraciji (c) Trolox otopine raspona 10-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$

### 3.2.11. Statistička obrada

Za statističku obradu dobivenih rezultata analize korišteni su programi Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) i Microsoft Excel 2013, pri čemu su rezultati mjerenja izraženi kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Provedena je dvofaktorska analiza varijance (ANOVA), kako bi se odredio utjecaj dvije nezavisne varijable (načina i vremena mljevenja) na udio sterola, koncentraciju polifenolnih spojeva i njihovu antioksidacijsku aktivnost. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p \leq 0,05$ . Osim toga, određena je korelacija udjela sterola i koncentracije polifenolnih spojeva s veličinom čestica, koristeći Microsoft Excel 2013. Također je određena i korelacija koncentracije polifenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnosti ekstrakata pri čemu je kao granica statističke značajnosti postavljena vrijednost  $r > 0,66$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U današnje vrijeme velike količine nusproizvoda prehrambene industrije predstavljaju sve veći problem. Iz tog razloga traže se alternativni načini obrade nusproizvoda pri čemu oni više ne bi predstavljali otpad već bi se mogli koristiti u druge svrhe. Jedan od takvih primjera je lanena pogača, nusproizvod prilikom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja, koja se koristila kao materijal u ovom istraživanju. Zbog hidrofilnosti mnogih hranjivih sastojaka prilikom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja, oni zaostaju u lanenoj pogači. Primjer takvih spojeva koji su bili analizirani u ovom istraživanju su fenolni spojevi koji doprinose antioksidacijskoj aktivnosti. Osim toga, zbog slabijeg iskorištenja procesa proizvodnje ulja uslijed primjene hladnog prešanja, u pogači zaostaje određena količina ulja, posljedično i sterola.

Iako se najčešće koristi kao stočna hrana, lanena pogača nutritivno je vrlo vrijedan proizvod koji se može koristiti u prehrambenoj industriji. Predstavlja jeftinu sirovinu kojom bi se prehrambeni proizvodi mogli nutritivno obogatiti pri čemu bi se proizvela funkcionalna hrana čija je potražnja na tržištu sve veća. Lanena pogača sadrži različite fenolne kiseline i flavonoide zbog čega je sve veći broj istraživanja usmjeren na traženje alternativnih postupaka izolacije fenolnih spojeva iz lanene pogače koji se mogu koristiti kao dodaci prehrani ili kao prirodni aditivi u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Osim toga, laneno sjeme je najbogatiji prirodni izvor lignana u prehrani od kojih je najzastupljeniji sekoizolarikirezinol (SECO) koji se u sjemenu nalazi u obliku sekoizolarikirezinol-diglukozida (SDG). Lignani imaju značajnu antioksidacijsku aktivnost te fitoestrogeno djelovanje zbog čega svoju primjenu pronalaze u farmaceutskoj industriji.

Kako bi se povećala nutritivna vrijednost lanene pogače, sve se više traže odgovarajuće metode kojima bi se regulirala koncentracija poželjnih i nepoželjnih komponenti. Pregledom baza podataka znanstvenih radova primijećeno je kako se u tu svrhu primjena kriogenog mljevenja pomoću tekućeg dušika na lanenoj pogači još uvijek nije istraživala. Kao materijal u ovom radu korišteno je sjeme lana uzgojeno na području Sisačko-moslavačke županije od strane OPG Janković iz kojeg se proizvelo hladno prešano laneno ulje na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu. Nakon toga određeni su parametri kvalitete sjemena i pogače lana (udio vode i hlapljivih tvari, udio ulja i udio mineralnih tvari). Potom je kao glavni cilj rada ispitan utjecaj naknadne obrade (stupnja usitnjenosti) pogače na sastav i udio sterola, polifenolnih spojeva te na antioksidacijsku aktivnost lanene pogače. Kako bi se spriječio

gubitak termolabilnih komponenti prilikom naknadne obrade u istraživanju je korišteno kriogeno mljevenje pomoću tekućeg dušika.

#### 4.1. KVALITETA SJEMENA I POGAČE LANA

Sjemenu lana uzgojenom 2018 g. od strane OPG Janković određeni su udio vode i hlapljivih tvari te udio ulja, a rezultati su prikazani u tablici 4. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari provedeno je u dva paralelna određivanja pri čemu se kao rezultat uzela srednja vrijednost. U literaturi se navodi kako na udio vode u sjemenu lana utječu brojni faktori od kojih su najznačajniji temperatura i relativna vlažnost tijekom uzgoja, žetve, procesiranja i skladištenja (Kajla i sur., 2014). Shim i sur. (2014) u svojem znanstvenom radu navode rezultate istraživanja na kanadskoj sorti sjemena lana gdje je prosječan udio vode iznosio 7,7 % što se podudara s vrijednosti koju navode Ganorkar i Jain (2013). Coşkuner i Karababa (2007) zaključili su kako udio vode u sjemenu lana varira od 4-8 %. Dobivena vrijednost mjerenja u ovom istraživanju u skladu je s literaturnim navodima, a zbog daljnjih analiza bitno je da je dobiveni udio vode ispod 8 % kako ne bi došlo do nepoželjnih promjena na sjemenu.

Tablica 4. Osnovni parametri kvalitete sjemena i pogače lana

Uzorak	Udio vode (%)	Udio ulja (%)	Udio mineralnih tvari (%)
<b>SJEME</b>	7,7	33,5	-
<b>POGAČA</b>	10,6	9,2	6,1

Udio ulja u sjemenu određen je metodom po Soxhletu u dva paralelna mjerenja te je srednja vrijednost iznosila 33,5 %. Navedena vrijednost nešto je niža od vrijednosti dobivenih u ostalim istraživanjima pri čemu udio ulja u sjemenu lana varira od 35 % do 45 % (Morris, 2007; Shim i sur., 2014; Goyal i sur., 2014). Nasuprot tome, Coşkuner i Karababa (2007) su analizom sjemena lana odredili udio ulja u rasponu od 30 % do 40 %. S obzirom na to da udio ulja u sjemenu značajno varira ovisno o vrsti kultivara, uvjetima uzgoja, žetve i uvjetima analize dobivena vrijednost je u skladu s očekivanom.

Iz sjemena je u laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-biotehnoškom fakultetu proizvedeno hladno prešano laneno ulje postupkom dvostrukog prešanja na pužnoj preši. Dobiveni nusproizvod, tj. pogača, samljevena je na mlinu s diskovima te je korištena kao kontrolni uzorak u daljnjim istraživanjima. Iz tog razloga bitno je odrediti osnovne parametre kvalitete pogače, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4. Udio vode u skladu je s literaturnim navodima, udio ulja je niži dok je udio mineralnih tvari viši.

Gutiérrez i sur. (2010) određivali su parametre kvalitete lanene pogače pri čemu je u prosjeku sadržavala 10,7 % vode, 29,4 % ulja i 3,4 % mineralnih tvari. Dobiveni udio vode u pogači od 10,6 % u skladu je s podacima iz prethodnog istraživanja, dok je udio ulja od 9,2 % značajno manji. Iz toga možemo zaključiti kako je iskorištenje procesa proizvodnje ulja u ovom radu visoko u usporedbi s navedenim istraživanjem, a iznosilo je 79,8 %. Ogunronbi i sur. (2011) proučavali su kemijski sastav lanene pogače, a dobiveni rezultati iznosili su 8,8-10,4 % vode, 12,8-26,1 % ulja te 3,7-5,1 % pepela. Udio vode varirao je ovisno o udjelu vode u sjemenu i temperaturi prilikom procesa prešanja, dok je udio ulja značajno viši zbog slabog iskorištenja prilikom procesa hladnog prešanja.

Možemo zaključiti kako je korišteno sjeme lana zadovoljavajuće kvalitete te je prilikom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja kao nusproizvod dobivena pogača koja odgovara poželjnim parametrima kvalitete. Također, kako je prilikom proizvodnje lanenog ulja provedeno dvostruko prešanje, iskorištenje procesa je bolje nego u literaturnim navodima (Gutiérrez i sur., 2010) te pogača sadrži manji udio ulja, što je poželjno za očuvanje kvalitete tijekom skladištenja.

## 4.2. VELIČINA ČESTICA

Mjerenje veličine čestica u suhoj disperziji provedeno je metodom laserske difrakcije na uređaju Malvern Mastersizer 2000. Rezultati su prikazani kao percentili raspodjele veličine čestica:  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$ ,  $d(0,9)$ ,  $D[3,2]$  te su definirani raspon i specifična površina. Prilikom analize proučavane su razlike u veličini čestica kontrolnog uzorka lanene pogače mljevenog na mlinu s diskovima i:

- a) čestica lanene pogače mljevene na kugličnom mlinu bez primjene kriogenog hlađenja, pri sobnoj temperaturi
- b) čestica lanene pogače mljevene na kugličnom mlinu uz primjenu kriogenog hlađenja pomoću tekućeg dušika, pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$

Tablica 5. Parametri raspodjele veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) te specifična površina ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) uzoraka mljevenih bez (BH) i uz primjenu kriogenog hlađenja (H), 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 16 minuta u odnosu na kontrolni uzorak pogače

Uzorak*	d (0,1) ( $\mu\text{m}$ )	d (0,5) ( $\mu\text{m}$ )	d (0,9) ( $\mu\text{m}$ )	D [3,2] ( $\mu\text{m}$ )	Raspon	Specifična površina ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )
<b>P (kontrolni)</b>	72,00	241,24	434,20	127,02	1,50	0,019
<b>2 BH</b>	51,88	218,71	421,05	106,94	1,69	0,023
<b>4 BH</b>	51,50	194,85	405,19	90,89	1,87	0,027
<b>6 BH</b>	38,86	184,78	397,37	85,88	1,94	0,029
<b>8 BH</b>	35,00	167,07	383,36	78,62	2,09	0,031
<b>10 BH</b>	31,52	155,32	373,80	72,65	2,20	0,034
<b>12 BH</b>	26,79	134,26	355,08	63,69	2,45	0,039
<b>16 BH</b>	25,72	129,66	354,05	61,73	2,53	0,040
<b>2 H</b>	54,65	226,69	425,60	105,46	1,64	0,023
<b>4 H</b>	31,99	173,84	384,24	72,48	2,03	0,034
<b>6 H</b>	25,70	139,36	339,25	61,18	2,25	0,040
<b>8 H</b>	21,48	115,26	287,08	52,79	2,30	0,046
<b>10 H</b>	23,26	122,84	300,25	55,78	2,26	0,044
<b>12 H</b>	13,90	77,88	190,33	36,57	2,27	0,067
<b>16 H</b>	11,14	59,41	151,02	29,10	2,35	0,084

\*Opis uzoraka nalazi se u Tablici 2.

Za svaki od uzoraka provedena su tri paralelna mjerenja te je izračunata srednja vrijednost. Rezultati utjecaja mljevenja na raspodjelu veličine čestica lanene pogače na kriomlinu prikazani su u tablici 5.

Kriogeno mljevenje je inovativni proces koji se sve više koristi u istraživanjima prehrambene i farmaceutske industrije u svrhu povećanja raspoloživosti bioaktivnih komponenti jer se povećava bioaktivna površina za ekstrakciju. Kriogeno mljevenje mnogo je učinkovitije u usporedbi s mljevenjem pri sobnoj temperaturi, pri čemu se dobiju veličine čestica manje od 50  $\mu\text{m}$  (Hemery i sur., 2011). Istraživanja vezana uz smanjenje veličine čestica većinom se temelje na korištenju visokih temperatura i tlaka što može negativno utjecati na bioaktivne spojeve. Kriogenim mljevenjem postiže se hlađenje uzoraka pri čemu oni postaju krhki i lomljivi te se posljedično lakše i preciznije melju, a pritom dolazi do očuvanja bioaktivnih komponenti. Dosadašnja istraživanja ne pružaju informacije o utjecaju kriogenog mljevenja na veličinu čestica lanene pogače.

Prema podacima iz tablice 5. možemo zaključiti kako su se parametri veličine čestica  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$ ,  $d(0,9)$  i  $D[3,2]$  smanjili, dok su se raspon i specifična površina povećali za sve uzorke mljevene na kugličnom mlinu pri različitim uvjetima u odnosu na kontrolni uzorak mljeven na mlinu s diskovima. Kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi vrijednost  $d(0,1)$  najviše se smanjila nakon 16 min mljevenja (za 2,80 puta) što je također slučaj i kod uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  gdje se vrijednost  $d(0,1)$  nakon 16 min smanjila za 6,46 puta. Vrijednosti  $d(0,1)$  ne razlikuju se značajno kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi u trajanju od 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 16 min, a značajnija promjena vrijednosti  $d(0,1)$  u odnosu na kontrolni uzorak postiže se nakon 6 min mljevenja. Kod uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  vrijednost  $d(0,1)$  niža je u odnosu na uzorke mljevene bez primjene kriogenog hlađenja, a značajnije smanjenje veličine čestica postiže se već nakon 4 min mljevenja što je 62 % veće smanjenje u odnosu na uzorak mljeven 4 min pri sobnoj temperaturi. Osim toga, zanimljivo je primijetiti kako se nakon 6 min mljevenja pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  vrijednost  $d(0,1)$  smanji gotovo jednako kao i kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi u trajanju od 12 min.

Kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi vrijednost  $d(0,5)$  najviše se smanjila nakon 16 min mljevenja (za 1,86 puta), a kod uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  također nakon 16 min (za 4,06 puta). Općenito, kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi u trajanju od 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 16 min vrijednosti  $d(0,5)$  međusobno se razlikuju za 4,6-23,86



$\mu\text{m}$ , a kod uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  za 18,47-52,85  $\mu\text{m}$ . Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako su se najmanje smanjile vrijednosti  $d(0,9)$ . Prilikom mljevenja pri sobnoj temperaturi vrijednost  $d(0,9)$  najviše se smanjila nakon 16 min (za 1,23 puta), a kod uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  također nakon 16 min (za 2,88 puta). Kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi vrijednosti  $d(0,9)$  međusobno se razlikuju za 1,03-18,72  $\mu\text{m}$ , a kod uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  za 39,31-109,92  $\mu\text{m}$ . Vrijednost  $D[3,2]$  predstavlja vrijednost reaktivnosti površine mljevenih čestica. Što je ta vrijednost manja to znači da je reaktivnost površine pogače veća. Kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi  $D[3,2]$  vrijednost se očekivano najviše smanjila nakon 16 minuta mljevenja (za 2,06 puta) što je također slučaj i kod uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  gdje se vrijednost  $D[3,2]$  smanjila za 4,36 puta. Zanimljivo je uočiti kako se reaktivnost površine čestica pogače mljevene tijekom 16 min uz korištenje hlađenja povećala 47 % u odnosu na uzorke mljevene 16 min pri sobnoj temperaturi.

Vrijednost „Raspon“ rasla je povećanjem vremena mljevenja za sve uzorke u odnosu na kontrolni uzorak. Kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi vrijednost „Raspon“ najviše je porasla nakon 16 min mljevenja (za 1,69 puta), a kod uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  isto nakon 16 min (za 1,57 puta). Možemo primijetiti kako je vrijednost „Raspon“ bila veća za uzorke koji su mljeveni pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi uz izuzetak uzoraka mljevenih tijekom 12 i 16 min. Iz navedenog proizlazi kako kriogeno mljevenje utječe na manju uniformiranost čestica. Mogući razlog tome je činjenica da su se čestice pogače lana koje su bile uz stijenku dvostrukog plašta jače smrzavale pri čemu su postale lomljivije te su se lakše usitnjavale.

Specifična površina čestica bila je veća za sve uzorke u odnosu na kontrolni uzorak. Iz tablice 5. je vidljivo kako veću specifičnu površinu imaju kriogeno mljeveni uzorci u usporedbi s uzorcima mljevenim pri sobnoj temperaturi. Najveću specifičnu površinu ima kriogeno mljeven uzorak u trajanju od 16 min (4,42 puta veća u odnosu na kontrolni uzorak). U odnosu na uzorak mljeven pri sobnoj temperaturi u jednakom vremenu, kriomljevenje je utjecalo na povećanje specifične površine za 2,1 puta. Iz rezultata je očito kako specifična površina, time i aktivna površina, rastu sa smanjenjem veličine čestica, što je u skladu s očekivanim.

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Rosa i sur. (2013) koji su mljevenjem pšeničnih posija na kriomlinu pri sobnoj temperaturi i temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  na istom uređaju zaključili kako kriogeno mljevenje pogoduje bržem i lakšem lomljenju čestica, ali

istovremeno utječe na povećanje raspona. S druge strane, u istraživanju Hemery i sur. (2011) dobiveni rezultati nisu u skladu s ovim istraživanjem. Naime, kriogeno mljevenje je u tom slučaju doprinijelo manjem rasponu čestica, odnosno uniformiranoj veličini čestica u odnosu na mljevenje pri sobnoj temperaturi. Međutim, bitno je uzeti u obzir kako se u navedenom istraživanju uzorak direktno tretirao s tekućim dušikom što je zasigurno utjecalo na ravnomjernije smrzavanje uzorka.

Iz svega navedenog možemo zaključiti kako su se vrijednosti  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$ ,  $d(0,9)$  i  $D[3,2]$  sve više smanjivale s povećanjem duljine trajanja mljevenja uz izuzetak uzorka koji je bio mljeven pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 10 min čiji su parametri veličine čestica bili svega nekoliko mikrometara veći u odnosu na uzorak mljeven pri istoj temperaturi u trajanju od 8 min. Mogući razlog tome je sljepljivanje čestica na dijelovima uzorka zbog sve većeg stupnja usitnjenosti, a također je moguće da je dio uzorka apsorbirao određenu količinu vlage zbog hlađenja. Sukladno tome, vrijednost „Raspon“ sve je više rasla povećanjem vremena mljevenja uz izuzetak uzoraka mljevenih pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 10 i 12 min, a veća je bila za uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi u trajanju od 16 min u odnosu na uzorke mljevene 16 min pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$ . Specifična površina očekivano je rasla za sve uzorke povećanjem vremena mljevenja te je bila veća za kriogeno mljevenje uzorke u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako mljevenje lanene pogače na kugličnom mlinu pozitivno utječe na smanjenje veličine čestica, pri čemu se veće smanjenje postiže primjenom kriogenog mljevenja pomoću tekućeg dušika pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  u odnosu na mljevenje pri sobnoj temperaturi. Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanim jer smanjenje temperature pogoduje lomljivosti čestica lanene pogače pri čemu se ona lakše i brže usitnjava primjenom mehaničke energije u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi. Na temelju preliminarnih istraživanja za daljnje analize ovog istraživanja odabrani su uzorci mljeveni 8 i 16 min pri sobnoj temperaturi i pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$  jer se pri tim uvjetima postiglo poželjno smanjenje čestica lanene pogače koje bi moglo utjecati na povećanje bioaktivnih komponenti.

### 4.3. UDIO I SASTAV STEROLA

Fitosteroli su spojevi koji zbog svojeg bioaktivnog djelovanja utječu na očuvanje kvalitete ulja, a osim toga imaju povoljan učinak na ljudsko zdravlje. Prilikom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja fitosteroli zbog svoje hidrofobnosti prelaze u ulje. Uslijed korištenja nižih temperatura tijekom procesa proizvodnje te posljedično slabog iskorištenja, određen udio ulja, a pritom i sterola, zaostaje u lanenoj pogači nakon prešanja. Važnost fitosterola u nutritivnom smislu je u tome što reduciraju ukupan kolesterol i LDL kolesterol te također imaju protuupalno, antibakterijsko i antitumorsko djelovanje (Azadmard-Damirchi i sur., 2010).

Iz tog razloga, kao jedan od ciljeva rada uspoređen je udio i sastav sterola u kontrolnom uzorku (nativna lanena pogača mljevena na mlinu s diskovima) i uzorcima mljevenim tijekom 8 i 16 min na kriogenom mlinu pri sobnoj temperaturi i pri temperaturi od  $-196^{\circ}\text{C}$ . Zbog povećanja reaktivne površine pogače lana uslijed mikronizacije pretpostavka je da će se udio sterola blago povećati.

Određivanje udjela i sastava sterola u ovom radu provedeno je saponifikacijom s etanolnom otopinom KOH, nakon čega se za izdvajanje sterolne frakcije koristila tankoslojna kromatografija, a za identifikaciju i kvantifikaciju plinska kromatografija. Analiza na plinskom kromatografu provedena je u 4 paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost. Steroli su identificirani usporedbom retencijskih vremena pripremljenih uzoraka s vremenima zadržavanja komercijalno dostupnih standarda, dok je kvantitativni sastav sterola određen metodom normizacije površine ispod pikova. Rezultati dobiveni plinskom kromatografijom izraženi su u  $\text{mg kg}^{-1}$ , te je iz njih izračunat udio (%) pojedinih sterola. U tablici 6. prikazan je udio pojedinačnih te ukupnih fitosterola u analiziranim uzorcima lanene pogače.

U uzorcima su detektirani sljedeći fitosteroli: brasikasterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostanol,  $\Delta^5$  - avenasterol,  $\Delta^7$  - stigmasterol, cikloartenol i  $\Delta^7$  - avenasterol. Iz tablice 6. vidljivo je kako su u svim uzorcima lanene pogače u najvećem udjelu detektirani  $\beta$ -sitosterol i kampesterol što je u skladu s očekivanim budući da su to glavni predstavnici fitosterola u lanenom ulju (Ciftci i sur., 2012).

Tablica 6. Sastav i udio sterola u uzorcima lanene pogače mljevenim bez (BH) i uz primjenu kriogenog hlađenja (H), 8 i 16 minuta u odnosu na kontrolni uzorak lanene pogače

Uzorak*	Steroli (% od ukupnih)											UKUPNO (mg kg <sup>-1</sup> ) ***
	Brasik asterol	Kampest erol	Kampest anol	Stigma sterol	β- sitosterol <sup>‡</sup>	β- sitostanol <sup>‡</sup>	Δ-5- avenasterol	Δ-7- stigmasterol	Cikloart enol***	Δ-7- avenasterol ***	n.i.	
<b>Pogača</b>	2,16 ± 0,01	24,41 ± 0,00	2,81 ± 0,00	9,09 ± 0,00	44,99 ± 0,01	2,22 ± 0,00	10,29 ± 0,00	0,76 ± 0,01	2,16 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,57 ± 0,01	<b>285,65 ±</b> 3,58
<b>8 min BH</b>	1,98 ± 0,00	24,50 ± 0,01	2,87 ± 0,00	9,21 ± 0,00	44,73 ± 0,00	2,39 ± 0,00	9,98 ± 0,00	1,57 ± 0,00	2,18 ± 0,00	1,09 ± 0,00	1,57 ± 0,01	<b>291,90 ±</b> 7,84
<b>16 min BH</b>	nd**	22,78 ± 0,01	2,62 ± 0,00	8,60 ± 0,00	39,81 ± 0,01	3,04 ± 0,00	9,24 ± 0,00	nd**	9,62 ± 0,01	2,36 ± 0,00	1,94 ± 0,03	<b>347,73 ±</b> 11,18
<b>8 min H</b>	1,67 ± 0,01	25,50 ± 0,00	2,93 ± 0,00	9,70 ± 0,00	46,06 ± 0,02	2,02 ± 0,00	10,08 ± 0,00	nd**	nd**	nd**	2,04 ± 0,01	<b>280,23 ±</b> 6,29
<b>16 min H</b>	2,13 ± 0,01	22,97 ± 0,02	2,74 ± 0,00	8,69 ± 0,01	39,82 ± 0,02	2,69 ± 0,00	8,74 ± 0,00	1,25 ± 0,00	nd**	nd**	10,98 ± 0,07	<b>289,10 ±</b> 16,01

\* Opis uzoraka nalazi se u Tablici 2.

\*\* Nije detektirano

\*\*\* Statistički značajan utjecaj vremena mljevenja na udio spoja ( $p \leq 0,05$ )

‡ Statistički značajan utjecaj vremena mljevenja i interakcije mljevenja i hlađenja na udio spoja ( $p \leq 0,05$ )

Dobiveni rezultati u skladu su sa standardima propisanim u *Codex Alimentariusu* (2019) u kojima se navodi kako su u lanenom ulju u najvećem udjelu prisutni  $\beta$ -sitosterol (45-53 %) i kampesterol (25-31 %). Osim njih, kao steroli prisutni u lanenom ulju navode se  $\Delta^5$ -avenasterol (8-12 %), stigmasterol (7-9 %) i brasikasterol (ND-1 %). Dobiveni rezultati u skladu su s navedenim rasponima udjela sterola kod svih uzoraka te je u odnosu na standard detektirano više vrsta fitosterola što nije začuđujuće s obzirom na to da udio sterola varira u ovisnosti o vrsti kultivara, klimatskim uvjetima i načinu prerade.

Općenito, razlike u udjelu sterola među uzorcima nisu bile velike, ali može se uočiti kako je udio  $\beta$ -sitosterola i kampesterola bio najveći u uzorku pogače lana koji je bio mljeven 8 min uz primjenu kriogenog hlađenja. U istom uzorku detektiran je i najveći udio kampestanola i stigmasterola. Poznato je kako primjena kriogenog hlađenja direktno utječe na pucanje staničnih stijenki te povećanje lomljivosti uzoraka (Hemery i sur., 2011). Iz toga se može zaključiti kako je do blagog povećanja navedenih fitosterola došlo upravo zbog primjene kriogenog hlađenja što je utjecalo na povećanje aktivne površine pogače lana. Iznenadujuće je kako je udio pojedinačnih sterola bio manji kod uzoraka mljevenih tijekom 16 min uz primjenu hlađenja, u odnosu na uzorke mljevene tijekom 8 min također uz primjenu hlađenja, izuzevši udio brasikasterola i  $\beta$ -sitostanola. Iz toga proizlazi kako duljina vremena kriogenog mljevenja nije utjecala na povećanje udjela fitosterola u lanenoj pogači što nije u skladu s očekivanim.

Statistički značajan utjecaj vremena mljevenja i interakcije mljevenja i hlađenja ( $p \leq 0,05$ ) zabilježen je jedino za udio  $\beta$ -sitosterola i  $\beta$ -sitostanola. U uzorcima koji su bili mljeveni pri sobnoj temperaturi udio  $\beta$ -sitosterola bio je manji u odnosu na kontrolni uzorak, dok je primjena kriogenog mljevenja imala značajan utjecaj kod uzorka mljevenog u trajanju od 8 min (1,07 % veći udio). Udio  $\beta$ -sitostanola rastao je s povećanjem vremena mljevenja kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi pri čemu je najveći udio zabilježen kod uzorka mljevenog u trajanju od 16 min (0,82 % veći udio).

Statistički značajan utjecaj vremena mljevenja ( $p \leq 0,05$ ) zabilježen je za udio cikloartenola i  $\Delta^7$ -avenasterola u uzorcima koji su bili mljeveni 8 i 16 min pri sobnoj temperaturi. Udio cikloartenola bio je 7,46 % veći u uzorku pogače mljevene 16 min dok u uzorcima pogače mljevene uz primjenu kriogenog hlađenja nije detektiran.  $\Delta^7$ -avenasterol bio je 0,55 % veći kod uzorka mljevenog 8 min pri sobnoj temperaturi i 1,82 % veći kod uzorka mljevenog 16 min pri sobnoj temperaturi, dok kod kriogeno mljevenih uzoraka nije detektiran.

Najveći udio ukupnih sterola detektiran je u uzorku masne frakcije izolirane iz pogače koja je bila mljevena 16 min bez primjene hlađenja (21,73 % veći udio u odnosu na kontrolni uzorak), a mogući razlog je dulje trajanje mehaničkog djelovanja kugličnog mlina. Iz navedenog je vidljivo kako je u ovom slučaju veći utjecaj na udio sterola imala duljina trajanja mehaničkog djelovanja, a ne primjena kriogenog hlađenja. Udio ukupnih sterola bio je manji kod uzoraka koji su bili mljeveni uz primjenu kriogenog hlađenja u odnosu na uzorke mljevene bez primjene hlađenja. Moguće je kako je prilikom primjene nižih temperatura kod kriogeno mljevenih uzoraka došlo do neravnomjernog hlađenja što je direktno utjecalo na veći raspon veličine čestica. To je moglo utjecati na ekstrakciju manjeg udjela sterola u masnu frakciju u odnosu na uzorke koji su bili mljeveni pri sobnoj temperaturi. Osim toga, moguće je kako je zbog jakog mehaničkog djelovanja kriomlina pri nižim temperaturama došlo do djelomičnog uništavanja stanične strukture sterola.

Tablica 7. Koeficijenti korelacije (r) udjela pojedinačnih i ukupnih sterola s parametrima raspodjele veličine čestica te specifičnom površinom. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti  $r > 0,66$ .

	<b>d (0,1)</b>	<b>d (0,5)</b>	<b>d (0,9)</b>	<b>D [3,2]</b>	<b>Raspon</b>	<b>Specifična površina</b>
<b>Brasikasterol</b>	0,25	0,16	-0,15	0,19	-0,60	0,11
<b>Kampesterol</b>	0,29	0,37	0,32	0,32	-0,41	-0,44
<b>Kampestanol</b>	0,14	0,19	0,10	0,16	-0,37	-0,20
<b>Stigmasterol</b>	0,13	0,22	0,20	0,17	-0,26	-0,32
<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>	0,49	0,57	0,50	0,53	-0,58	-0,60
<b><math>\beta</math>-sitostanol</b>	-0,36	-0,37	-0,21	-0,35	0,56	0,31
<b><math>\Delta</math>-5-avenasterol</b>	<b>0,72</b>	<b>0,80</b>	<b>0,77</b>	<b>0,76</b>	-0,69	-0,84
<b><math>\Delta</math>-7- stigmasterol</b>	0,07	0,05	-0,11	0,06	-0,31	0,16
<b>Cikloartenol</b>	0,05	0,13	0,39	0,11	0,33	-0,32
<b><math>\Delta</math>-7-avenasterol</b>	0,06	0,19	0,47	0,15	0,30	-0,39
<b>n.i.</b>	-0,63	-0,78	-0,92	-0,72	0,40	<b>0,96</b>
<b>Ukupno sterola (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	-0,18	-0,11	0,16	-0,12	0,52	-0,09

Udjeli pojedinačnih i ukupnih sterola nisu pokazali statistički značajnu korelaciju ( $r > 0,66$ ) s parametrima raspodjele veličine čestica te specifičnom površinom (Tablica 7). Jedino je kod  $\Delta^5$  – avenasterol zabilježena srednje jaka korelacija s d (0,1), d (0,5), d (0,9) i D [3,2] dok s vrijednosti „Raspon“ i specifičnom površinom nije zabilježena. Zanimljivo je uočiti kako je jedino udio neidentificiranih sterola pokazao snažnu korelaciju sa specifičnom površinom čestica. Navedena činjenica može se povezati s podatkom o udjelu neidentificiranih sterola (Tablica 6) koji je rastao za sve uzorke s porastom vremena mljevenja te je bio najveći za uzorak mljeven 16 min uz kriogeno hlađenje (18,26 % veći udio u odnosu na kontrolni uzorak). Moguće je kako je zbog mehaničkog djelovanja kugličnog mlina te bolje lomljivosti stanične strukture uslijed primjene nižih temperatura došlo do oslobađanja, odnosno bolje dostupnosti sterola koji nisu detektirani u kontrolnom uzorku pogače.

U svom istraživanju Hemery i sur. (2011) odredili su utjecaj kriogenog mljevenja na udio ukupnih sterola pšeničnih posija. Nakon direktne kiselinske i alkalne hidrolize, udio sterola određen je na plinskom kromatografu. Udio sterola kod uzoraka mljevenih uz korištenje hlađenja porastao je za svega  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  uzorka u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi. Iz toga možemo uočiti kako su rezultati ovog istraživanja u skladu s dobivenim rezultatima, odnosno kako kriogeno mljevenje ne utječe značajno na povećanje udjela fitosterola.

Nyström i sur. (2007) istražili su utjecaj kriogenog mljevenja na bioraspoloživost sterola rižinih i pšeničnih posija u usporedbi s mljevenjem pri sobnoj temperaturi, korištenjem povišenih temperatura i upotrebom enzima. Iznenadujuće je kako je kod rižinih mekinja mljevenih na kriomlinu udio sterola bio veći za  $17,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  uzorka u odnosu na uzorak mljeven pri sobnoj temperaturi te se takav način mljevenja pokazao kao optimalan za povećanje bioraspoloživosti sterola. S druge strane, kriogeno mljevenje pšeničnih posija dalo je lošije rezultate te se u tom slučaju kao najbolji način povećanja bioraspoloživosti sterola pokazalo mljevenje pri sobnoj temperaturi u kombinaciji s korištenjem enzima (ksilanaza i  $\beta$ -glukanaza). Mogući razlog koji autori navode je blaga razlika u rasponu veličine čestica rižinih i pšeničnih posija. Očito je kako bi dodatnim tretmanom lanene pogače potencijalno mogli utjecati na povećanje bioraspoloživosti fitosterola te da kriogeno mljevenje kao zasebna metoda nije zadovoljavajuća u tu svrhu.

Prilikom analize dobivenih rezultata u obzir treba uzeti činjenicu kako postoji razlika u rasponu veličina čestica uzoraka mljevenih u trajanju od 8 i 16 min, bez i s primjenom

kriogenog hlađenja, što je moglo imati utjecaja na rezultate. Iz svega navedenog može se zaključiti kako mljevenje uz primjenu kriogenog hlađenja u ovom slučaju nije značajno utjecalo na udio ukupnih fitosterola te kako je veći utjecaj imala duljina mehaničkog tretmana uzorka.

#### **4.4. KONCENTRACIJA I SASTAV FENOLNIH SPOJEVA**

Kao što je prethodno navedeno, lanene sjemenke su vrijedan izvor fenolnih spojeva, koji prilikom proizvodnje hladno prešanog ulja zbog svoje hidrofilnosti gotovo u potpunosti zaostaju u pogači (Kajla i sur., 2015). Njihova važnost u prehrani ljudi veže se uz činjenicu da imaju snažno antioksidacijsko djelovanje, odnosno mogućnost neutralizacije slobodnih radikala, zbog čega štite organizam od staničnih oštećenja. Osim toga, lanena pogača bi se zbog značajnog udjela fenolnih spojeva mogla koristiti za njihovu izolaciju te korištenje u prehrambenoj industriji kao prirodnih antioksidansa. Ono što je karakteristično za lanenu pogaču je veliki udio lignana koji djeluju antimikrobno i protuupalno te općenito imaju povoljan učinak na očuvanje zdravlja (Kajla i sur., 2015). Upravo je to pobudilo interes farmaceutske i prehrambene industrije zbog čega sve veći broj istraživanja pokušava pronaći djelotvorne načine izolacije i manipulacije koncentracijom lignana čime bi se mogli proizvesti novi nutraceutici i funkcionalna hrana.

Iz toga razloga, jedan od ciljeva ovog rada bio je pratiti sastav i koncentraciju polifenolnih spojeva tijekom naknadne obrade, odnosno smanjenja veličine čestica pri različitim uvjetima (mljevenje bez i uz primjenu hlađenja), kako bi se ustanovilo utječe li kriogeno mljevenje na povećanje njihove koncentracije. U ovom radu fenolni spojevi izolirani su pomoću mikrovalne ekstrakcije te su naknadno određeni njihov sastav i koncentracija primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Fenolni spojevi lanene pogače identificirani su usporedbom spektra i retencijskih vremena detektiranih spojeva i standarda. Iz koncentracije spoja u ekstraktu izračunata je koncentracija fenolnih spojeva u odvaganim uzorcima pogače koje su bili analizirani u dva paralelna određivanja, a rezultat predstavlja srednja vrijednost prikazana kao mg 100 g<sup>-1</sup> pogače. U tablici 8. prikazani su sastav i koncentracija polifenolnih spojeva u kontrolnom uzorku lanene pogače te uzorcima naknadno mljevenim u trajanju od 8 i 16 min bez i s primjenom hlađenja. Prilikom razmatranja rezultata bitno je uzeti u obzir kako udio fenolnih spojeva u sjemenu znatno varira ovisno o vrsti kultivara, uvjetima i godini uzgoja te preradi (Touré i Xueming, 2010).



Tablica 8. Sastav i koncentracija (mg 100 g<sup>-1</sup>) polifenolnih spojeva u uzorcima pogače mljevenim bez (BH) i uz primjenu kriogenog hlađenja (H), 8 i 16 minuta u odnosu na kontrolni uzorak lanene pogače određeni HPLC metodom

Polifenolni spoj	Uzorak				
	<b>P</b> (mg 100 g <sup>-1</sup> )	<b>8 BH</b> (mg 100 g <sup>-1</sup> )	<b>16 BH</b> (mg 100 g <sup>-1</sup> )	<b>8 H</b> (mg 100 g <sup>-1</sup> )	<b>16 H</b> (mg 100 g <sup>-1</sup> )
<b>SDG*</b>	143,8 ± 0,07	229,7 ± 0,09	233,5 ± 0,06	251,3 ± 0,07	272,8 ± 0,04
<b>glukozid ferulinske kiseline*</b>	20,3 ± 0,10	28,1 ± 0,09	29,6 ± 0,12	26,4 ± 0,11	27,5 ± 0,06
<b>glukozid <i>p</i>-kumarinske kiseline*</b>	24,1 ± 0,10	32,8 ± 0,11	34,2 ± 0,10	29,4 ± 0,08	29,7 ± 0,06
<b>Neidentificirani spojevi*</b>	122,3 ± 0,10	207,0 ± 0,10	210,5 ± 0,16	217,4 ± 0,13	234,8 ± 0,11
<b>UKUPNO (mg 100 g<sup>-1</sup>) *</b>	<b>310,5 ±</b> 0,02	<b>497,6 ±</b> 0,22	<b>507,7±</b> 0,00	<b>524,5 ±</b> 0,01	<b>564,9 ±</b> 0,03

\* Statistički značajan utjecaj vremena mljevenja i interakcije mljevenja i hlađenja na koncentraciju spoja ( $p \leq 0,05$ )

Iz rezultata je vidljivo kako su u svim uzorcima pogače detektirani SDG te glukozidi ferulinske i *p*-kumarinske kiseline što je u skladu s literaturnim navodima (Beejmohun i sur., 2007). Osim toga, poznato je kako je većina fenolnih kiselina u lanenom sjemenu prisutna u vezanoj formi, odnosno u formi glukozida što je potvrđeno u ovom radu. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je koncentracija detektiranih polifenolnih spojeva veća u svim uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak. Statistički značajan utjecaj vremena mljevenja i interakcije mljevenja i hlađenja na koncentraciju spoja ( $p \leq 0,05$ ) zabilježen je za sve detektirane spojeve te za ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva.

Najveći porast koncentracije kod svih uzoraka zabilježen je za SDG, a njegov udio bio je značajno veći kod uzoraka koji su bili kriogeno mljeveni u usporedbi s uzorcima koji su bili mljeveni pri sobnoj temperaturi, što je u skladu s očekivanim. Najveća koncentracija SDG-a određena je u uzorku koji je bio mljeven 16 min uz primjenu hlađenja te je bila 89,71 % veća u odnosu na kontrolni uzorak. Usporedbe radi, 16 min mljevenja pri sobnoj temperaturi

utjecalo je na porast SDG-a za 62,38 % što je 27,33 % manje nego uz primjenu kriogenog hlađenja. Kod uzoraka koji su bili mljeveni pri sobnoj temperaturi porastom vremena mljevenja s 8 na 16 min, udio SDG-a porastao je za svega 2,64 % dok je kod kriogeno mljevenih uzoraka u jednakom vremenskom intervalu porastao za 14,95 %.

Kao što je prethodno navedeno, SDG se u sjemenu lana najčešće nalazi u formi oligomera, tzv. lignan makromolekula, u kojoj je vezan na 3-hidroksi-3-metilglutaru kiselinu (HMGA), herbacetin diglukozid, *p*-kumarinsku kiselinu ili glukozide ferulinske kiseline (Herchi i sur., 2014; Yuan i sur., 2008). Konvencionalne metode izolacije SDG-a vrlo su dugotrajne, a uključuju izolaciju organskim otapalima, najčešće pomoću metanola ili etanola (Touré i Xueming, 2010). Međutim, izolacija organskim otapalima nije dovoljna kako bi se razorile polimerne strukture. Zbog toga je potrebno provesti hidrolizu esterske veze između glukozida lignana i HMGA pri čemu bi se oslobodio SDG iz lignan makromolekule. Istraživanja su pokazala kako se alkalnom hidrolizom ekstrahira manje vrsta lignana, dok kombinacija enzimske i kiselinske hidrolize daje bolje rezultate, ali je upitna stabilnost dobivenih produkata (Herchi i sur., 2014; Yuan i sur., 2008).

Mikrovalna ekstrakcija kao novija metoda ekstrakcije pokazala se pogodnom za izolaciju fenolnih spojeva (Nemes i Orsat, 2011). Naime, korištenjem mikrovalova zagrijava se cijeli volumen uzorka te se oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te tako potiče otapanje fenolnih spojeva (Beejmohun i sur., 2007). Na taj način smanjuje se vrijeme analize koje je u ovom slučaju iznosilo 6 min te se koriste manje količine organskih otapala što je ekonomski i energetski isplativije. Beejmohun i sur. (2007) u svom istraživanju koristili su mikrovalnu ekstrakciju kao metodu izolacije SDG-a, glukozida *p*-kumarinske i ferulinske kiseline iz pogače lana. Usporedili su primjenu mikrovalne ekstrakcije u trajanju od 15 min uz korištenje 0,1 M NaOH s ekstrakcijom pomoću metanola praćenom alkalnom hidrolizom u trajanju od 6 sati. Mikrovalna ekstrakcija rezultirala je porastom koncentracije SDG-a za 1,3 puta, koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline porasla je za 1,7 puta, a koncentracija glukozida ferulinske kiseline za 2,1 puta. Zhang i Xu (2007) također su zaključili kako mikrovalna ekstrakcija pogoduje boljem oslobađanju SDG-a iz lanene pogače u usporedbi s ekstrakcijom pomoću vodene otopine etanola pri različitim uvjetima. Rezultati provedenog istraživanja upućuju na to kako mikrovalna ekstrakcija u kombinaciji s predtretmanom kriogenog hlađenja daje još bolje rezultate prilikom izolacije lignana te skraćuje vrijeme analize. Prema literaturnim navodima udio lignana u cijelim sjemenkama lana varira od 82-2600 mg 100 g<sup>-1</sup> sjemena, dok

u mljevenima od 600-2900 mg 100 g<sup>-1</sup> (Muir, 2006; Kasote, 2013). S obzirom na to da je poznato kako se biodostupnost lignana iz lanenih sjemenki može povećati drobljenjem i mljevenjem sjemenki dobiveni rezultati su u skladu s očekivanim (Kuijsten i sur., 2005).

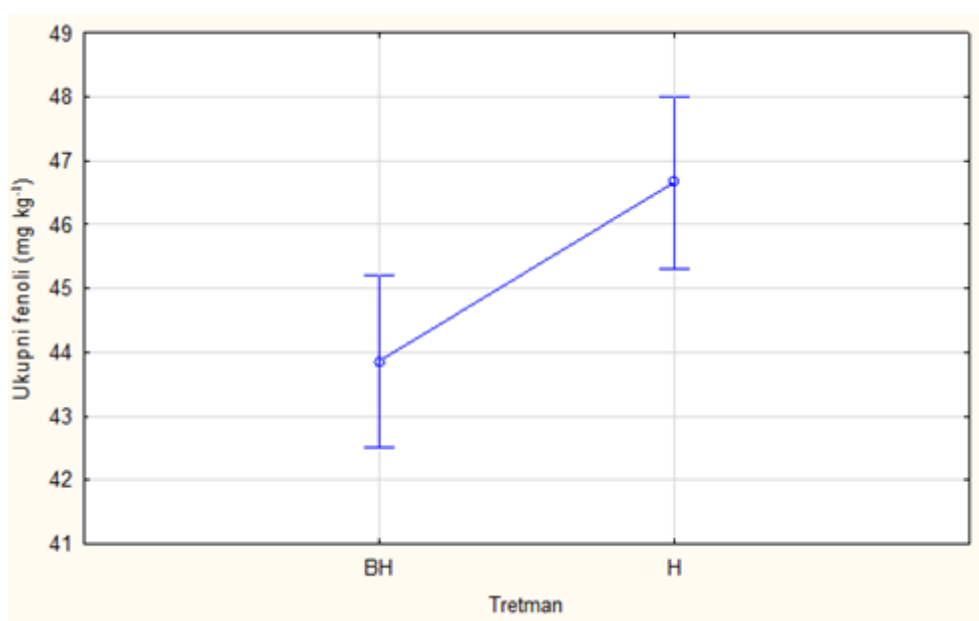
Porast koncentracije glukozida ferulinske i *p*-kumarinske kiseline kod svih uzoraka bio je manji u usporedbi sa SDG-om (Tablica 8). Primijećeno je kako je veća koncentracija glukozida zabilježena u uzorcima koji su bili mljeveni bez primjene hlađenja, međutim te razlike su bile vrlo male. Koncentracija glukozida ferulinske kiseline više je porasla kod svih uzoraka u odnosu na porast koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline. Kod uzoraka koji su bili mljeveni pri sobnoj temperaturi u trajanju od 8 min, koncentracija glukozida ferulinske kiseline porasla je 38,42 %, a kod uzoraka mljevenih u trajanju od 16 min 45,81 %. Kod kriogeno mljevenih uzoraka u trajanju od 8 i 16 min, koncentracija glukozida ferulinske kiseline bila je 8,37 % i 10,34 % niža u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi u istom vremenskom intervalu.

Povećanjem vremena mljevenja s 8 na 16 min pri sobnoj temperaturi, koncentracija *p*-kumarinske kiseline porasla je 5,81 %, a prilikom primjene kriogenog hlađenja 1,24 %, što nije u skladu s očekivanim. Kombinacijom primijenjene snage mikrovalova i postavljene temperature može doći do značajnijeg povišenja temperature uzorka što može negativno utjecati na bioaktivne spojeve. Iz tog razloga moguće je kako je kod kriogeno mljevenih uzoraka došlo do jačeg zagrijavanja u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi, zbog manje veličine čestica te boljeg prodiranja otapala u sam uzorak. To je moglo utjecati na manji udio glukozida ferulinske i *p*-kumarinske kiseline u kriogeno mljevenim uzorcima u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi.

Koncentracija neidentificiranih spojeva rasla je povećanjem duljine mehaničkog djelovanja te je bila veća za kriogeno mljevene uzorke što je u skladu s očekivanim. Zanimljivo je primijetiti kako je kod kriogeno mljevenog uzorka u trajanju od 16 min koncentracija neidentificiranih spojeva porasla 92 % u odnosu na kontrolni uzorak što je 19,88 % veće u usporedbi s uzorkom mljevenim pri sobnoj temperaturi u trajanju od 16 min. S obzirom na to da kriogeno mljevenje utječe na povećanje aktivne površine moguće je kako uslijed toga dolazi do oslobađanja veće koncentracije i više različitih vrsta fenolnih spojeva.

Koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva bila je najveća kod kriogeno mljevenog uzorka u trajanju od 16 min te je porasla 254,4 mg 100 g<sup>-1</sup> u odnosu na kontrolni uzorak. U ovom slučaju na povećanje koncentracije polifenolnih spojeva utjecali su način i vrijeme mljevenja.

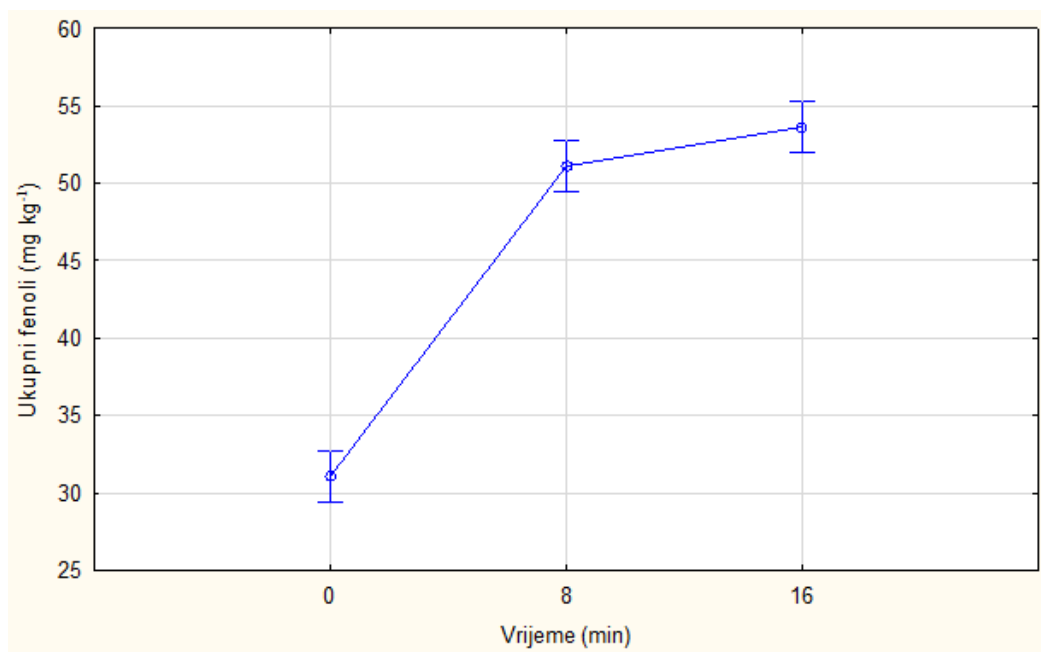
Povećanjem vremena s 8 na 16 min kod uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi koncentracija polifenolnih spojeva porasla je 10,1 mg 100 g<sup>-1</sup>, a kod kriogeno mljevenih uzoraka 40,4 mg 100 g<sup>-1</sup>. U dostupnoj literaturi se navodi kako udio fenolnih spojeva u lanenoj pogači iznosi 355-442 mg 100 g<sup>-1</sup> (Alu'datt i sur., 2017). U ovom radu je utvrđeno kako je udio fenolnih spojeva već nakon 8 min mljevenja pri sobnoj temperaturi veći od navedenog raspona za 12,58-40,17 %, a primjenom kriogenog hlađenja u trajanju od 16 min za 27,81-59,13 %. U skladu s navedenim, faktorska analiza varijance pokazala je statistički značajnu ( $p \leq 0,05$ ) ovisnost koncentracije ukupnih fenola o načinu mljevenja (Slika 9).



Slika 9. Faktorska analiza varijance ovisnosti koncentracije ukupnih fenola o vrsti tretmana – bez (BH) i s primjenom hlađenja (H)

Uzorcima koji su bili kriogeno mljeveni veličina čestica bila je manja zbog povećanja lomljivosti uslijed primjene nižih temperatura, što je utjecalo na povećanje aktivne površine. Na taj način omogućeno je lakše prodiranje otapala u uzorak, što je u kombinaciji s primjenom mikrovalova rezultiralo ekstrakcijom veće koncentracije ukupnih polifenola.

Faktorska analiza varijance također je pokazala statistički značajnu ( $p \leq 0,05$ ) ovisnost koncentracije ukupnih fenola o vremenu mljevenja (Slika 10). Vidljivo je kako koncentracija ukupnih fenola značajno raste s produljenjem mehaničkog djelovanja te najveću vrijednost dostiže nakon 16 minuta mljevenja.



Slika 10. Faktorska analiza varijance ovisnosti koncentracije ukupnih fenola o vremenu mljevenja (8 i 16 min)

Dulji mehanički tretman utječe na pucanje staničnih stijenki što rezultira povećanjem koncentracije spojeva što je u ovom slučaju potvrđeno. Također, primjenom hlađenja tijekom mljevenja, izbjegava se zagrijavanje uzorka što direktno utječe na smanjenje gubitka termolabilnih spojeva, u ovom slučaju fenolnih spojeva. Iz svega navedenog možemo zaključiti kako kriogeno mljevenje ima značajan utjecaj na povećanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u lanenoj pogači te se njihov udio povećava duljim mehaničkim djelovanjem.

Metodom korelacije pokazalo se kako postoji statistički značajna ( $r > 0,66$ ) povezanost između koncentracije pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva s vrijednosti „Raspon“ (Tablica 9). Koncentracija glukozida ferulinske i *p*-kumarinske kiseline bila je veća kod uzoraka koji su imali manju vrijednost „Raspon“, dok to nije bio slučaj kod koncentracije ostalih fenolnih spojeva. Korelacija sa specifičnom površinom zabilježena je jedino za koncentraciju SDG-a, neidentificiranih spojeva i ukupnih fenola. To znači da porastom specifične površine raste i koncentracija ukupnih fenolnih spojeva, SDG-a i neidentificiranih spojeva. Korelacija s ostalim parametrima raspodjele veličine čestica nije zabilježena ni za jedan spoj.

Tablica 9. Koeficijenti korelacije (r) koncentracije pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva s parametrima raspodjele veličine čestica te specifičnom površinom. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti  $r > 0,66$ .

	<b>d (0,1)</b>	<b>d (0,5)</b>	<b>d (0,9)</b>	<b>D [3,2]</b>	<b>Raspon</b>	<b>Specifična površina</b>
<b>SDG</b>	-0,99	-0,96	-0,82	-0,98	<b>0,89</b>	<b>0,81</b>
<b>glukozid-ferulinske kiseline</b>	-0,84	-0,72	-0,43	-0,77	<b>0,93</b>	0,45
<b>glukozid p-kumarinske kiseline</b>	-0,67	-0,50	-0,17	-0,57	<b>0,83</b>	0,21
<b>n.i.</b>	-0,99	-0,93	-0,76	-0,96	<b>0,91</b>	<b>0,75</b>
<b>Ukupni fenoli</b>	-0,99	-0,94	-0,77	-0,97	<b>0,91</b>	<b>0,76</b>

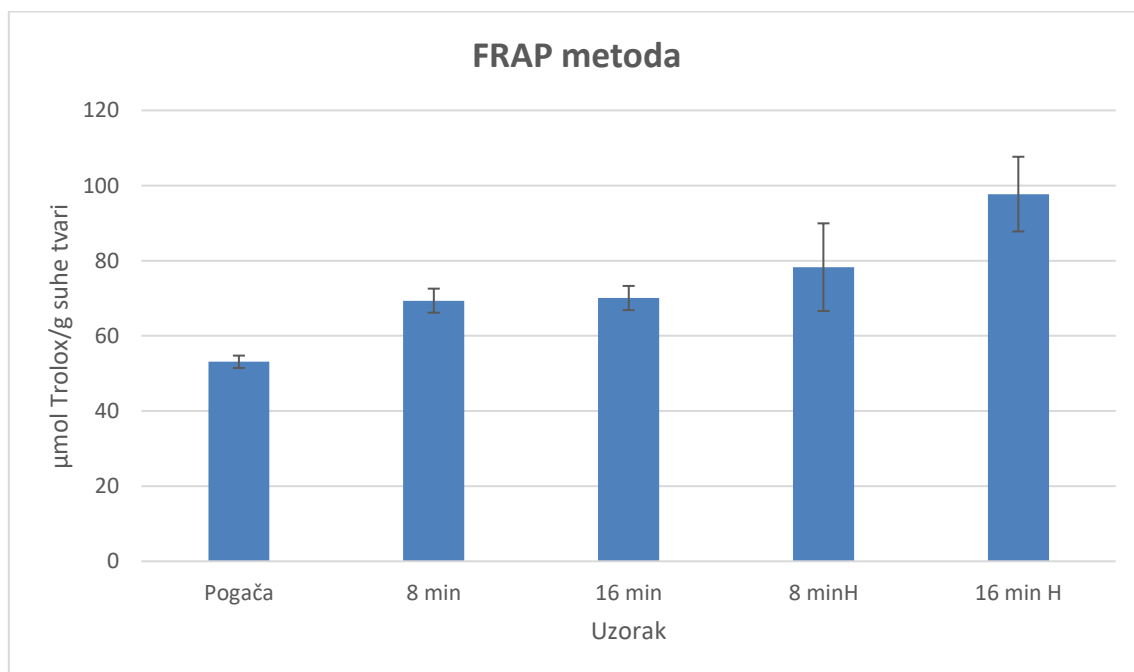
Rosa i sur. (2013) proučavali su učinak kriogenog mljevenja na koncentraciju polifenolnih spojeva pšeničnih posija, pri čemu su zaključili kako je udio ferulinske, *p*-kumarinske i sinapinske kiseline i njihovih konjugata ostao gotovo identičan za sve uzorke, što nije u skladu s ovim radom. S druge strane, Hemery i sur. (2010) proučavali su utjecaj mikronizacije pšeničnog brašna i posija na *in vitro* biodostupnost fenolnih kiselina u različitim vrstama kruha. Pokazalo se kako je biodostupnost *p*-kumarinske, sinapinske i ferulinske kiseline bila veća kod kruhova u koji su bile dodane pšenične posije. Osim toga, što su čestice posija bile sitnije samljevene to je bila veća biodostupnost fenolnih kiselina. To potvrđuje činjenicu kako veličine čestica ima značajan utjecaj na oslobađanje fenolnih kiselina i povećanje aktivne površine. Kaur i Srivastav (2018) zaključili su u svom istraživanju kako kriogeno mljevenje utječe na povećanje udjela ukupnih fenolnih spojeva u kori različitih vrsta manga, a kao mogući razlog navode korištenje nižih temperatura, što direktno utječe na očuvanje termolabilnih spojeva. Također, primjena kriogenog mljevenja na prah kurkume utječe na povećanje od 15-25 % ukupnih polifenola u odnosu na mljevenje pri sobnoj temperaturi (Barnwal i sur., 2014).

Navedena istraživanja u skladu su s ovim radom te se može zaključiti kako kriogeno mljevenje statistički značajno ( $p \leq 0,05$ ) utječe na povećanje koncentracije SDG-a i ukupnih polifenolnih spojeva u pogači lana. Kriogeno mljevenje pokazalo se kao pogodan predtretman za očuvanje termolabilnih spojeva te povećanje aktivne površine što direktno može imati utjecaj na povećanje biodostupnosti fenolnih spojeva. Također, što je dulji mehanički tretman pogače lana, to je veći udio polifenolnih spojeva.

#### 4.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA POLIFENOLNIH SPOJEVA

U ovom radu antioksidacijska aktivnost ekstrakata polifenolnih spojeva određena je pomoću dvije metode: DPPH i FRAP. U oba slučaja provedena su 2 paralelna određivanja po jednom uzorku, a koncentracija ukupnih polifenola određuje se pomoću pripadajućih baždarnih dijagrama pripremljenih od svježe Trolox otopine određenog raspona koncentracija (Slike 7 i 8).

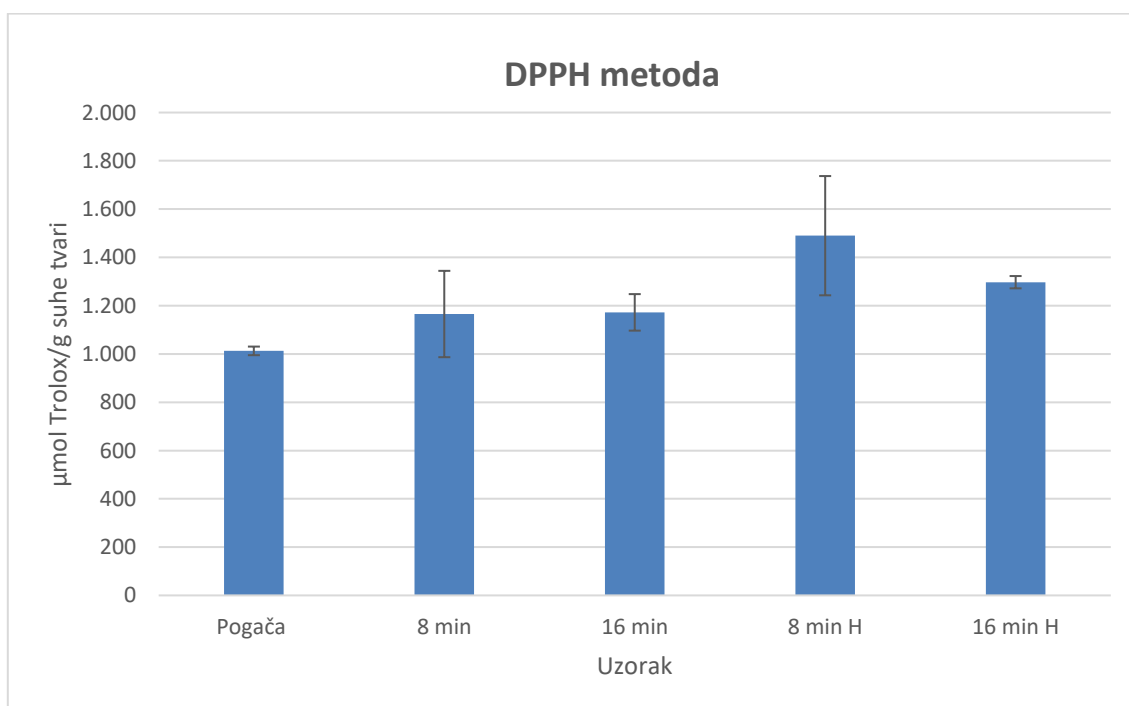
Rezultati FRAP metode prikazani su na slici 11. te je antioksidacijska aktivnost izražena kao  $\mu\text{mol}$  Trolox ekvivalenta (TE)  $\text{g}^{-1}$  uzorka. Antioksidacijska aktivnost je porasla 1,31 puta kod uzorka koji je bio mljeven 8 min pri sobnoj temperaturi, a 1,32 puta za uzorak mljeven 16 min u odnosu na kontrolni uzorak. Kod kriogeno mljevenih uzoraka antioksidacijska aktivnost je porasla 1,47 puta (uzorak mljeven 8 min) i 1,84 puta (uzorak mljeven 16 min). Iz rezultata je vidljivo kako antioksidacijska aktivnost lanene pogače raste porastom vremena mljevenja te je veća za uzorke koji su bili kriogeno mljeveni u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi.



Slika 11. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata polifenolnih spojeva određena FRAP metodom (srednja vrijednost mjerenja  $\pm$  standardna devijacija)

Rezultati DPPH metode prikazani su na slici 12. te je antioksidacijska aktivnost izražena kao  $\mu\text{mol}$  Trolox ekvivalenta (TE)  $\text{g}^{-1}$  uzorka, jednako kao i kod FRAP metode. Rezultati nisu u skladu s očekivanjima te se ne podudaraju s rezultatima FRAP metode. Naime, antioksidacijska aktivnost je u slučaju korištenja DPPH metode bila najveća za uzorak koji je bio mljeven 8 min uz primjenu kriogenog hlađenja dok je kod uzorka koji je bio mljeven u trajanju od 16 min antioksidacijska aktivnost pala. DPPH metodom antioksidacijska aktivnost uzoraka mljevenih pri sobnoj temperaturi porasla je 1,15 puta (uzorak mljeven 8 min) i 1,16 puta (uzorak mljeven 16 min) u odnosu na kontrolni uzorak. Uzorak koji je bio kriogeno mljeven u trajanju od 8 min antioksidacijska aktivnost porasla je 1,47 puta, jednako kao i kod FRAP metode, dok je kod uzorka mljevenog 16 min porasla tek 1,28 puta.

Očito je kako nema povezanosti između rezultata dobivenih FRAP i DPPH metodom. Moguće je kako je prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom došlo do pogrešaka u mjerenju. Naime, tijekom analize može doći do interferencije određenih komponenti ako se njihova valna duljina preklapa s valnom duljinom DPPH pri 515 nm.



Slika 12. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata polifenolnih spojeva određena DPPH metodom (srednja vrijednost mjerenja  $\pm$  standardna devijacija)



Zanimljivo je uočiti kako je porast antioksidacijske aktivnosti određen FRAP metodom u značajnoj korelaciji s porastom koncentracije fenolnih spojeva u svim uzorcima (Tablica 10). Uzorak koji ima najveću antioksidacijsku aktivnost (16 H) ima i najveći udio ukupnih fenolnih spojeva te najveći udio SDG-a. Koeficijent korelacije FRAP metode i udjela SDG-a, neidentificiranih spojeva te ukupnih fenola ukazuje kako postoji statistički snažna korelacija između antioksidacijske aktivnosti i koncentracije fenolnih spojeva lanene pogače.

Tablica 10. Koeficijenti korelacije ( $r$ ) antioksidacijskih metoda s koncentracijom pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti  $r > 0,66$ .

Metoda	SDG	glukozid ferulinske kiseline	glukozid <i>p</i> - kumarinske kiseline	Neidentificirani spojevi	Ukupni fenoli
<b>FRAP</b>	<b>0,91</b>	0,57	0,34	<b>0,86</b>	<b>0,87</b>
<b>DPPH</b>	<b>0,77</b>	0,44	0,25	<b>0,73</b>	<b>0,73</b>

Iz tablice 10. vidljivo je kako je DPPH metoda u manjoj korelaciji s ispitivanim spojevima u odnosu na FRAP metodu. Ipak, srednje jaka korelacija postoji između primjene DPPH metode i koncentracije SDG-a, neidentificiranih spojeva te ukupnog udjela fenolnih spojeva. Korelacija FRAP i DPPH metode s udjelom glukozida ferulinske i *p*-kumarinske kiseline nije zabilježena.

Rezultati dobiveni FRAP metodom su u skladu s literaturnim navodima koji ukazuju na postojanje statistički značajne korelacije između porasta koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu pogače lana i porasta antioksidacijske aktivnosti (Zanwar i sur., 2010; Kasote, 2013; Pag i sur., 2014). Istraživanjima je ustanovljeno kako SDG u organizmu djeluje kao jak antioksidans te štiti DNA od staničnih oštećenja (Herchi i sur., 2014). Razlog tome je činjenica da djeluje kao inhibitor lipidne peroksidacije te ima mogućnost vezanja reaktivnih kisikovih vrsta. Osim toga, fenolne kiseline, posebice *p*-kumarinska i ferulinska kiselina te flavonoidi također doprinose antioksidacijskoj aktivnosti, iako manje nego SDG (Yuan i sur, 2008). Barthet i sur. (2014) ustanovili su kako fenolni spojevi nisu jedini zaslužni za antioksidacijsku aktivnost lanene pogače, već manjim dijelom njoj doprinose i proteini.

Utjecaj kriogenog mljevenja na povećanje antioksidacijske aktivnosti ispitan je u istraživanju Rosa i sur. (2013). Antioksidacijski kapacitet pšeničnih posija koje su bile kriogeno mljevene porastao je s 30 na 45 mmol TEAC kg<sup>-1</sup> uslijed povećanja aktivne površine sa 0,09 na 0,30 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> u odnosu na kontrolni uzorak. Ustanovljeno je kako povećanjem aktivne površine proporcionalno raste i antioksidacijski kapacitet pšeničnih posija. Kako je kod analiziranih uzoraka udio fenolnih kiselina ostao gotovo identičan, zaključeno je kako povećanje antioksidacijskog kapaciteta u ovom slučaju nije povezano s boljim oslobađanjem fenolnih kiselina iz konjugiranih formi, niti s oslobađanjem intracelularnih spojeva iz aleuronskog sloja. Najveći utjecaj imalo je povećanje aktivne površine fenolnih kiselina uzrokovano pucanjem aleuronskog sloja uslijed kriogenog mljevenja, a ne povećanje njihove koncentracije. Navedeno istraživanje može se povezati s rezultatima ovoga rada s obzirom na to da su uzorci koji su bili kriogeno mljeveni imali najveću antioksidacijsku aktivnost pri čemu je udio glukozida *p*-kumarinske i ferulinske kiseline bio niži nego kod uzoraka koji su bili mljeveni pri sobnoj temperaturi. Međutim, uslijed finijeg usitnjavanja, a posljedično i veće aktivne površine te činjenice da je udio lignana bio veći u kriogeno mljevenim uzorcima, došlo je do statistički značajnog povećanja antioksidacijske aktivnosti.

Pretraživanjem literature došlo se do spoznaje kako kriomljevenje kao predtretman može imati pozitivan utjecaj na povećanje bioaktivnih spojeva u raznim biljnim materijalima. Stoga je ovo istraživanje bilo potaknuto činjenicom kako trenutno nema dostupne literature o utjecaju kriomljevenja na povećanje nutritivne vrijednosti lanene pogače. Lanena pogača, kao otpad tijekom proizvodnje hladno prešanog ulja, pokazala se kao pogodan materijal za ovo istraživanje jer sadrži značajne količine bioaktivnih spojeva. Iz tog razloga, pretpostavka je bila kako bi kriomljevenje trebalo utjecati na smanjenje veličine čestica pogače, odnosno povećanje ukupne aktivne površine, što bi za posljedicu imalo povećanje koncentracije sterola, fenolnih spojeva te antioksidacijske aktivnosti.

Rezultati ovoga rada potvrdili su pretpostavku kako kriomljevenje pomoću tekućeg dušika djelotvornije utječe na smanjenje veličine čestica lanene pogače u odnosu na mljevenje pri sobnoj temperaturi. Korištenje nižih temperatura, u ovom slučaju -196°C, omogućava brže i lakše usitnjavanje materijala pri čemu dolazi do oštećenje stanične strukture bez uporabe kemikalija. Problem koji je uočen prilikom provođenja ovog istraživanja je povećanje raspona veličine čestica s porastom vremena kriomljevenja uzoraka, što znači da su kriogeno mljeveni uzorci bili manje ujednačene veličine u odnosu na uzorke koji su bili mljeveni pri sobnoj temperaturi. Pregledom literature pronađen je sličan problem u istraživanju Rosa i sur. (2013),

dok je kod Hemery i sur. (2011) kriomljevenje utjecalo na smanjenje raspona veličine čestica. Iz navedenog možemo zaključiti kako veliki utjecaj na raspon veličine čestica ima način kriomljevenja što je svakako potrebno uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata. Utjecaj kriomljevenja na povećanje udjela pojedinačnih sterola u lanenoj pogači nije bio statistički značajan, izuzev utjecaja na udio  $\beta$ -sitosterola,  $\beta$ -sitostanola, cikloartenola i  $\Delta^7$ -avenasterola. Općenito, rezultati udjela sterola nisu bili logički povezani te nemaju pretjeran značaj za provedbu daljnjih istraživanja.

Prilikom određivanja utjecaja načina mljevenja na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva, pretpostavka je bila kako mljevenje pri temperaturi kriogene tekućine ima značajan utjecaj na očuvanje termolabilnih komponenti (Hemery i sur., 2011). Osim toga, poznato je kako finije usitnjavanje ima značajan utjecaj na bolje oslobađanje bioaktivnih komponenti iz stijenke stanica (Saxena i sur, 2015). Rezultati ovog istraživanja potvrdili su postavljenu hipotezu te se dokazalo kako način i vrijeme mljevenja imaju statistički značajan utjecaj na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih polifenolnih spojeva određenih HPLC metodom.

Od osobite važnosti istaknulo se povećanje koncentracije SDG-a, kao glavnog predstavnika lignana, kod svih uzoraka u odnosu na kontrolni uzorak. Pritom je utvrđeno kako zbog kompleksne strukture lignana, na njihov udio ne utječe samo metoda ekstrakcije, već i prikladan način predtretmana pogače (Herchi i sur., 2014). Metoda mikrovalne ekstrakcije u kombinaciji s alkalnom hidrolizom pokazala se kao brza i djelotvorna metoda za izolaciju fenolnih spojeva, osobito lignana, što je prethodno objavljeno u istraživanju Beejmohun i sur. (2007). U kombinaciji s kriomljevenjem kao predtretmanom omogućeno je još bolje prodiranje otapala u uzorak, samim time i djelotvornija ekstrakcija. Lignani su vrlo snažni antioksidansi koji posjeduju fitoestrogeno djelovanje zbog čega se sve više istražuju načini povećanja njihove koncentracije u uzorcima te nove metode ekstrakcije. Vrijeme i način mljevenja u ovom istraživanju pokazali su statistički značajan utjecaj na njihov udio. Buduća istraživanja na lanenoj pogači trebala bi se nastaviti u tom smjeru te bi bilo poželjno ispitati utjecaj kombinacije kriomljevenja i novih metoda ekstrakcije fenolnih spojeva, poput ekstrakcije ultrazvukom, visokim tlakom te superkritičnim fluidima.

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u korelaciji su s rezultatima koncentracije fenolnih spojeva dok DPPH metoda nije dala zadovoljavajuće rezultate. Bitno je uzeti u obzir nepouzdanost antioksidacijskih metoda te bi svakako bilo poželjno provesti daljnja određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodom, uz korelaciju s

HPLC metodom. Na temelju ovog rada, u daljnjim istraživanjima moglo bi se preporučiti korištenje FRAP metode u kombinaciji s HPLC-om za određivanje utjecaja kriomljevenja na koncentraciju fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost.

Ovim istraživanjem pokazalo se kako kriomljevenje pokazuje značajan utjecaj na povećanje nutritivne vrijednosti lanene pogače. Time se otvara mogućnost istraživanja primjene kriomljevene lanene pogače u svrhu nutritivnog obogaćivanja prehrambenih proizvoda, poput pekarskih proizvoda. Također, moguće je manipulirati koncentracijom fenolnih spojeva kako bi se omogućila njihova djelotvorna izolacija iz lanene pogače. Kao takvi, potencijalno se mogu koristiti kao prirodni antioksidansi u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, ili kao dodaci prehrani.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

1. Mljevenje uz hlađenje pomoću tekućeg dušika je dovelo do većeg i bržeg smanjenja promjera čestica lanene pogače u usporedbi s mljevenjem na sobnoj temperaturi u istom vremenu.
2. Udio sterola u lanenoj pogači je u skladu sa standardima *Codex Alimentarius-a*.
3. Utvrđen je statistički značajan utjecaj načina i vremena mljevenja lanene pogače ( $p \leq 0,05$ ) na udio  $\beta$ -sitosterola,  $\beta$ -sitostanola, cikloartenola i  $\Delta^7$ -avenasterola. Značajna korelacija ( $r > 0,66$ ) udjela sterola s parametrima raspodjele veličine čestica zabilježena je jedino za  $\Delta^5$ -avenasterol.
4. Vrijeme i način mljevenja statistički značajno ( $p \leq 0,05$ ) utječu na koncentraciju polifenolnih spojeva. Utvrđena je značajna korelacija ( $r > 0,66$ ) između koncentracije SDG-a, neidentificiranih polifenolnih spojeva i ukupnih polifenolnih spojeva sa specifičnom površinom čestica.
5. Kriomljevenje lanene pogače u trajanju od 16 minuta utječe na povećanje udjela SDG-a za 89,71 % i na povećanje ukupnog udjela fenola za 81,93 %.
6. Udio SDG-a pokazuje snažnu korelaciju s antioksidacijskom aktivnosti.
7. Kriomljevenje lanene pogače se pokazalo kao dobar predtretman prilikom ekstrakcije polifenolnih spojeva.

## 6. LITERATURA

Alu'datt, M.H., Rababah, T., Alhamad, M.N., Al-Mahasneh, M.A., Almajwal, A., Gammoh, S., Alli, I. (2017) A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chem.* **218**, 99-106.

Anonymous 1 (2019) Biljka lan (*Linum usitatissimum* L.), <<https://fineartamerica.com/featured/common-flax-or-linseed-linum-usitatissimum-bildagentur-online.html>>. Pristupljeno 15. ožujka 2019.

Anonymous 2 (2019) Lanene sjemenke, <<https://therenegadepharmacist.com/6-healthy-benefits-of-flaxseed/>>. Pristupljeno 18. ožujka 2019.

Azadmard-Damirchi, S., Habibi-Nodeh, F., Hesari, J., Nemati, M., Achachlouei, B.F. (2010) Effect of pretreatment with microwaves on oxidative stability and nutraceuticals content of oil from rapeseed. *Food Chem.* **121**, 1211-1215.

Barnwal, P., Singh, K.K., Sharma, A., Choudhary, A.K., Zachariah, T.J., Saxena, S.N. (2014) Biochemical, antioxidant and thermal properties of cryogenic and ambient ground turmeric powder. *Int. Agr. Eng. J.* **23**, 39-46.

Barthet, V.J., Klensporf-Pawlik, D., Przybylski, R. (2014) Antioxidant activity of flaxseed meal components. *Can. J. Plant Sci.* **94**, 593-602.

Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, É., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M.A., Mesnard, F. (2007) Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochem. Analysis* **18**, 275-282.

Benassayag, C., Perrot-Applanat, M., Ferre, F. (2002) Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *J. Chromatogr. B* **777**, 233-248.

Benzie, I., Strain, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

Brühl, L., Matthäus, B., Scheipers, A., Hofmann, T. (2008) Bitter off-taste in stored cold-pressed linseed oil obtained from different varieties. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**, 625-631.

Ciftci, O.N., Przybylski, R., Rudzińska, M. (2012) Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114**, 794-800.

Clavel, T., Borrmann, D., Braune, A., Doré, J., Blaut, M. (2006) Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. *Anaerobe* **12**, 140-147.

Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission (2019) Report of the 26<sup>th</sup> Session of the Codex Committee on Fats and Oils. *Codex Alimentarius*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rim.

Coşkuner, Y., Karababa, E. (2007) Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Eng.* **78**, 1067–1073.

Cvitanić, M. (2016) Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-Biotehnološki fakultet.

Dribnenki, J.C.P., McEachern, S.F., Chen, Y., Green, A.G., Rashid, K.Y. (2007) 2149 solin (low linolenic flax). *Can. J. Plant. Sci.* **87**, 297-299.

FAOSTAT (2019) Food and Agriculture Organization of United Nations, <<http://faostat.fao.org>>. Pristupljeno 7. ožujka 2019.

Ganorkar, P.M., Jain, R.K. (2013) Flaxseed - a nutritional punch. *Int. Food Res. J.* **20**, 519-525.

Ghodki, B.M., Kumar, K.C., Goswami, T.K. (2018) Modeling breakage and motion of black pepper seeds in cryogenic mill. *Adv. Powder Technol.* **29**, 1055-1071.

Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., Sihag, M. (2014) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 1633-1653.

Gutiérrez, C., Rubilar, M., Jara, C., Verdugo, M., Sineiro, J., Shene, C. (2010) Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J. Soil. Sci. Plant Nut.* **10**, 454-463.

Hemery, Y.M., Anson, N.M., Havenaar, R., Haenen, G.R., Noort, M.W., 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**, 1429-1438.

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

Herchi, W., Harrabi, S., Sebei, K., Rochut, S., Boukhchina, S., Pepe, C., Kallel, H. (2009) Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. *Plant Physiol. Bioch.* **47**, 880-885.

Herchi, W., Arráez-Román, D., Trabelsi, H., Bouali, I., Boukhchina, S., Kallel, H., Segura-Cerretero, A., Fernández-Gutierrez, A. (2014) Phenolic compounds in flaxseed: a review of their properties and analytical methods. An overview of the last decade. *J. Oleo Sci.* **63**, 7-14.

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

HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (osnovna referentna metoda).

HRN EN ISO 2171:2010, Žitarice - Određivanje ukupnog pepela spaljivanjem (osnovna referentna metoda).

HRN EN ISO 12228-1:2014, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola - Metoda plinske kromatografije (osnovna referentna metoda).

Johnsson, P., Peerlkamp, N., Kamal-Eldin, A., Andersson, R.E., Andersson, R., Lundgren, L. N., Åman, P. (2002) Polymeric fractions containing phenol glucosides in flaxseed. *Food Chem.* **76**, 207-212.

Junghare, H., Hamjade, M., Patil, C.K., Lele, S.G.M.M. (2017) A Review on Cryogenic Grinding. *Int. J. Curr. Eng. Technol.* **7**, 420-423.

Kajla, P., Sharma, A., Sood, D.R. (2015) Flaxseed - a potential functional food source. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 1857-1871.

Kasote, D.M. (2013) Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *Int. Food Res. J.* **20**, 27-34.

Kaur, B. i Srivastav, P.P. (2018) Effect of cryogenic grinding on chemical and morphological characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) peel powder. *J. Food Process. Pres.* **42**, e13583.



- Kraljić, K., Škevin, D., Pospišil, M., Obranović, M., Neđeral, S., Bosolt, T. (2013) Quality of rapeseed oil produced by conditioning seeds at modest temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 589-599.
- Kuijsten, A., Arts, I.C., Van't Veer, P., Hollman, P.C. (2005) The relative bioavailability of enterolignans in humans is enhanced by milling and crushing of flaxseed. *J. Nutr.* **135**, 2812-2816.
- Meghwal, M., Goswami, T.K. (2010) Cryogenic grinding of spices is a novel approach whereas ambient grinding needs improvement. *Cont. J. Food Sci. Technol.* **4**, 24-37
- Morris, D.H. (2007) *Flax – a health and nutrition primer*, 4.izd. [online], Flax Council of Canada, <<https://flaxcouncil.ca/resources/nutrition/technical-nutrition-information/flax-a-health-and-nutrition-primer/>>. Pristupljeno 7. ožujka 2019.
- Muir, A.D. (2006) Flax lignans – analytical methods and how they influence our understanding of biological activity. *J. AOAC Int.* **89**, 1147-1157.
- Nemes, S.M., Orsat, V. (2011) Microwave-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside-Method Development. *Food Bioprocess. Technol.* **4**, 1219-1227.
- Niwa, T., Nakanishi, Y., Danjo, K. (2010) One-step preparation of pharmaceutical nanocrystals using ultra cryo-milling technique in liquid nitrogen. *Eur. J. Pharm. Sci.* **41**, 78-85.
- Nyström, L., Lampi, A.M., Rita, H., Aura, A.M., Oksman-Caldentey, K.M., Piironen, V. (2007) Effects of processing on availability of total plant sterols, steryl ferulates and steryl glycosides from wheat and rye bran. *J. Agr. Food Chem.* **55**, 9059-9065.
- Obranović, M. (2015) Karakterizacija lanenog ulja inozemnih sorata uljnoga lana uzgojenih na području Republike Hrvatske. Doktorski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Ogunronbi, O., Jooste, P.J., Abu, J.O., Van der Merwe, B. (2011) Chemical composition, storage stability and effect of cold-pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. *J. Food Process. Pres.* **35**, 64-79.
- Pag, A.I., Radu, D.G., Draganescu, D., Popa, M.I., Sirghie, C. (2014) Flaxseed cake-a sustainable source of antioxidant and antibacterial extracts. *Cell. Chem. Technol.* **48**, 265-273.

- Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2019) *Narodne novine* **11**, Zagreb
- Retsch GmbH (2017a) The Art of Milling, <<http://online.fliphtml5.com/uebb/ftup/#p=2>>. Pristupljeno 25. ožujka 2019.
- Retsch GmbH (2017b) CryoMill Manual: Cryogenic Mixer Mill CryoMill, <[https://pdfs.wolflabs.co.uk/service/Retsch\\_freezer-mills\\_CryoMill\\_manual.pdf](https://pdfs.wolflabs.co.uk/service/Retsch_freezer-mills_CryoMill_manual.pdf)>. Pristupljeno 25. ožujka 2019.
- Retsch GmbH (2017c) General Catalogue, <<http://online.fliphtml5.com/uebb/lxpb/#p=12>>. Pristupljeno 25. ožujka 2019.
- Rosa, N.N., Barron, C., Gaiani, C., Dufour, C., Micard, V. (2013) Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *J. Cereal Sci.* **57**, 84-90.
- Saxena, S.N., Sharma, Y.K., Rathore, S.S., Singh, K.K., Barnwal, P., Saxena, R., Upadhyaya, P., Anwer, M.M. (2015) Effect of cryogenic grinding on volatile oil, oleoresin content and anti-oxidant properties of coriander (*Coriandrum sativum* L.) genotypes. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 568-573.
- Schaller, H. (2003) The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.* **42**, 163-175.
- Shahidi, F. (2000) Antioxidant factors in plant foods and selected oilseeds. *Biofactors* **13**, 179-185.
- Shim, Y.Y., Gui, B., Arnison, P.G., Wang, Y., Reaney, M.J. (2014) Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **38**, 5-20.
- Sicilia, T., Niemeyer, H.B., Honig, D.M., Metzler, M. (2003) Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 1181-1188.
- Singh, K.K., Jhamb, S.A., Kumar, R. (2012) Effect of pretreatments on performance of screw pressing for flaxseed. *J. Food Process. Eng.* **35**, 543-556.

Struijs, K., Vincken, J.P., Verhoef, R., van Oostveen-van Casteren, W.H., Voragen, A.G., Gruppen, H. (2007) The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls. *Phytochemistry* **68**, 1227-1235.

Šrajbek, M. (2017) Izolacija bioaktivnih spojeva iz lanene pogače. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-Biotehnološki fakultet.

Touré, A., Xueming, X. (2010) Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **9**, 261-269.

Voučko, B., Benković, M., Čukelj, N., Drakula, S., Novotni, D., Balbino, S., Čurić, D. (2018) Influence of cryo-grinding on antioxidant activity and amount of free phenolic acids, rutin and tyrosol in whole grain buckwheat and pumpkin seed cake. U: *The 20th international research conference proceedings*.

Wang, G., Huang, X., Pei, D., Duan, W., Quan, K., Li, X., Di, D. (2016) DPPH-HPLC-DAD analysis combined HSCCC for screening and identification of radical scavengers in *Cynomorium songaricum* Rupr. *New J. Chem.* **40**, 3885-3891.

Ye, J., Schoenung, J.M. (2004) Technical cost modeling for the mechanical milling at cryogenic temperature (cryomilling). *Adv. Eng. Mater.* **6**, 656-664.

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

Yuan, J.P., Li, X., Xu, S.P., Wang, J.H., Liu, X. (2008) Hydrolysis kinetics of secoisolariciresinol diglucoside oligomers from flaxseed. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 10041-10047.

Zanwar, A.A., Hegde, M.V., Bodhankar, S.L. (2010) In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Linum usitatissimum*. *Pharmacology* **1**, 683-696.

Zhang, W., Xu, S. (2007) Microwave-assisted extraction of secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed hull. *J. Sci. Food Agr.* **87**, 1455-1462.

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

Zhu, K., Huang, S., Peng, W., Qian, H., Zhou, H. (2010) Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber. *Food Res. Int.* **43**, 943-948.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ivana Kuraica

ime i prezime studenta