

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Martina Herceg
942/PI

**UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA
UDIO PREHRAMBENIH
VLAKANA, MASNIH KISELINA I
CIKLINOPEPTIDA POGAČE
LANA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Marka Obranovića. 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).

Zahvaljujem mentoru doc.dr.sc. Marku Obranoviću na pomoći i savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela te na uputama tijekom pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju ulja i masti na opuštenoj radnoj atmosferi i savjetima.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestrama, bratu i prijateljima što su mi uvijek davali snažan vjetar u leđa i pružali bezuvjetnu podršku i razumijevanje tijekom školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA UDIO PREHRAMBENIH VLAKANA, MASNIH KISELINA I CIKLINOPEPTIDA POGAČE LANA

Martina Herceg, 942/PI

Sažetak: Pogača lana je privukla veliku pozornost prehrambene industrije zbog specifičnog sadržaja masnih kiselina, proteina, vlakana te ciklinopeptida. Iako sadrži veliki udio antinutritivnih komponenti te se zbog toga koristi isključivo kao stočna hrana, navedene nutritivne komponente predstavljaju jedan od važnijih razloga zašto se u posljednjih nekoliko desetljeća sve više spominje moguće iskorištenje iste i implementiranje u prehranu ljudi. Cilj ovog rada je bio istražiti te ispitati djeluje li kriogeno mljevenje (bez i s hlađenjem uz pomoć tekućeg dušika) na povećanje nutritivne vrijednosti lanene pogače. Rezultati mljevenja su pokazali statistički značajan učinak kriogenog mljevenja na udio ciklinopeptida CL_A, CL_B, CL_E i CL_OKSID. Kriogeno mljevenje imalo je statistički značajan utjecaj na udio zasićenih masnih kiselina: miristinske (C14:0), stearinske (C18:0), behenske (C22:0) i lignocerinske (C24:0). Nasuprot tome, provedena metoda uz pomoć kriogenog mljevenja nije pokazala statistički značajan utjecaj na udio vlakana, proteina i mineralnih tvari.

Ključne riječi: pogača lana, kriogeno mljevenje, vlakna, ciklinopeptidi, masne kiseline

Rad sadrži: 55 stranica, 11 slika, 10 tablica, 59 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. Marko Obranović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni
2. doc. dr. sc. Marko Obranović
3. prof. dr. sc. Dubravka Škevin
4. izv. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjena)

Datum obrane: 15. 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 CRYOMILLING ON FIBERS, FATTY ACIDS AND CYCLOLINOPEPTIDES CONTENT OF FLAXSEED CAKE

Martina Herceg, 942/PI

Abstract: Flaxseed meal has attracted great deal of attention of the food industry due to the specific content of fatty acids, proteins, fibers and cyclolinopeptides. Although it contains a large amount of antinutritive components and therefore is only used as feed, these nutritional components represent one of the most important reasons why it has been mentioned frequently over the past few decades for possible utilization and implementation in the diet of humans. The aim of this thesis was to determine whether or not cryogenic milling (without and with cryocooling) affects the increase in nutritional value of flaxseed cake. The milling results showed a significant effect of cryogenic grinding on cyclolinopeptides CL_A, CL_B, CL_E and CL_OXID. Cryogenic milling also affected saturated fatty acids: myristic (C14:0), stearic (C18:0), behenic (C22:0) and lignoceric (C24:0). In spite of that, the cryogenic grinding method did not show any major changes in the proportion of fibers, proteins and minerals.

Keywords: flaxseed meal, cryomill, fibers, cyclolinopeptides, proteins, fatty acids

Thesis contains: 55 pages, 11 figures, 10 tables, 59 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

Reviewers:

1. PhD. Dubravka Novotni, Associate professor
2. PhD Marko Obranović, Assistant professor
3. PhD. Dubravka Škevin, Full professor
4. PhD. Sandra Balbino, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 15th of July, 2019.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SJEME LANA	2
2.1.1. Biološka kvalifikacija i sastav	2
2.1.2. Proizvodnja i upotreba lana	3
2.2. PROIZVODNJA I SASTAV ULJA	3
2.3. LANENA POGAČA	4
2.3.1. Kemijski sastav i upotreba lanene pogače	4
2.3.2. Nutritivne komponente pogače lana	5
2.4. KRIOGENO MLJEVENJE	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Reagensi i standardi	16
3.1.2. Aparatura	17
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u sjemenu i pogači	18
3.2.2. Određivanje udjela ulja u sjemenu i pogači	19
3.2.3. Određivanje udjela proteina u lanenoj pogači	20
3.2.4. Mljevenje pogače kriomlinom	21
3.2.6. Određivanje sastava masnih kiselina pomoću GC-a	22
3.2.7. Određivanje udjela mineralnih tvari u lanenoj pogači	23
3.2.8. Određivanje udjela netopivih i topivih vlakana	24
3.2.9. Određivanje udjela ciklolinopeptida	28
3.2.10. Statistička obrada	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. KVALITETA SJEMENA I POGAČE LANA	30
4.1.1. Veličina čestica	31
4.2. SASTAV MASNIH KISELINA	33
4.3. UDIO TOPIVIH I NETOPIVIH VLAKANA	37
4.4. UDIO PROTEINA I MINERALNIH TVARI	40
4.5. UDIO CIKLOLINOPEPTIDA (CL)	42
5. ZAKLJUČAK	50
6. LITERATURA	51

1. UVOD

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka iz obitelji *Linaceae* koja uključuje deset rodova i više od 150 vrsta. Laneno sjeme je bogat izvor α -linolenske kiseline, topivih i netopivih dijetalnih vlakana, proteina i fitokemikalija kao što su lignani. Ove komponente su od velikog značaja za prehrambenu i farmaceutsku industriju. Kao takvo se smatra funkcionalnom hranom jer pozitivno utječe na ljudsko zdravlje.

Pogača lana je kruti ostatak koji se dobije prešanjem lanenog sjemena te se većinom koristi kao stočna hrana. Lanena pogača je dobar izvor prehrambenih vlakana, proteina i bioaktivnih komponenti i kao takva predstavlja izazov za inkorporaciju u širi asortiman proizvoda. Koristi se u industrijske svrhe, kao stočna hrana, a ističe se zbog kemijskog sastava.

Kako bi se istražio nutritivni potencijal lanene pogače, korištena je nova metoda mljevenja uz primjenu kriogenog hlađenja. Na pogači uljane repice prethodno je provedeno istraživanje s ciljem da se vidi kako bi ovakav način mljevenja utjecao na oslobađanje bioaktivnih spojeva (Mandura, 2018).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj tretmana mljevenja bez primjene i uz primjenu kriogenog hlađenja na nutritivne spojeve pogače lana, sirovine koja bi zbog svojeg kvalitetnog nutritivnog sastava mogla obogatiti prehranu ljudi i iskoristiti kao sirovina u prehrambenoj industriji.

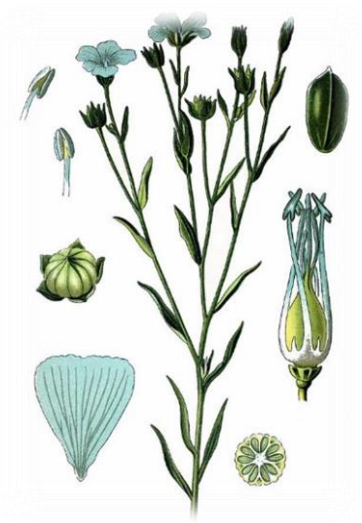
2. TEORIJSKI DIO

2.1. SJEME LANA

2.1.1. Biološka kvalifikacija i sastav

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka (rasprostranjena u području plodnog polumjeseca) iz obitelji *Linaceae* koja uključuje deset rodova i više od 150 vrsta (Slika 1). Zrelo laneno sjeme je duguljasto i spljošteno, a obuhvaća zametak s dva kotiledona okružena tankim endospermom i glatkom, sjajnom žutom do tamno smeđom sjenicom (trup) (Shim i sur., 2014). Najčešće se koristi smeđi lan. Boja sjemena određena je količinom taninskih pigmenata, kojih u žutom sjemenu lana nema, a komercijalno se uzgaja i prodaje u Kanadi (Marambe i Wanasundara, 2017). Smeđa sorta lana raste do visine od 0,3 do 1 metra te se uzgaja za proizvodnju tekstilnih vlakana i ulja. Sorte lana koje se koriste za proizvodnju tekstilnih vlakana obično imaju dužu stabljiku, 80-120 cm visoku i manje sjeme. Sorte koje se koriste za dobivanje ulja imaju kraće i jako razgranate stabljike, 60-80 cm visoke i veći broj sjemenki. Istraživanja su pokazala da je za rast i razvoj lana najpogodnije plodno tlo fine teksture i ilovačka tla (pijesak, mulj i glina).

Osim što je jedan od najbogatijih izvora α -linolenske kiseline i lignana (antikancerogen), laneno sjeme je osnovni izvor visoko kvalitetnih proteina i topivih vlakana te fenolnih spojeva (DeLuca i sur., 2018). Sadržaj proteina lanenog sjemena varira od 20 do 30 % (globulin i glutelin, ali ne i albumin), dok je sadržaj ulja u sjemenu 32 % do 43 %.



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

2.1.2. Proizvodnja i upotreba lana

Prije više od 60 godina, prosječna svjetska proizvodnja lana je bila oko 3,4 mil. tona, što je bilo više od suncokreta (2,5 mil. tona) i nešto manje od uljane repice (3,8 mil. tona). Od tada, svjetska proizvodnja lana varira između 2 i 3 mil. tona dok je proizvodnja ostalih uljarica znatno porasla (Bosanac, 2017).

U svijetu se lan koristi u obliku lanenog sjemena i lanenih vlakana. Vlaknasti lan se uglavnom uzgaja u Europi i koristi se prvenstveno u poljoprivredi i za izradu tkanina i niti koje se koriste u tapeciranju, ribarskim mrežama i konopcima. Laneno sjeme jedno je od važnijih usjeva (kultiviran na 2,6 milijuna hektara) uljarica koje se koristi u industrijske svrhe, prehrani te kao stočna hrana (pogača lana). Ulje se može konzumirati i koristiti za proizvodnju boja, lakova, linoleuma, platnenih tkanina, tiskarskih boja i sapuna.

Zemlje u kojima se lan najviše proizvodi su Indija, Kanada (najveći svjetski proizvođač lana), Kina, Sjedinjene Američke Države, Etiopija. Daje ulje bogato omega-3 masnim kiselinama (protuupalno svojstvo), probavljivim proteinima i lignanima (DeLuca i sur., 2018).

2.2. PROIZVODNJA I SASTAV ULJA

Laneno ulje sadrži nizak udio zasićenih masti (9 % ukupnih masnih kiselina), a bogato je polinezasićenim masnim tvarima (73 %). Hladno prešano laneno ulje dobiveno bez ekstrakcije otapalom prikladno je za ljudsku potrošnju, ali nije preporučljivo za kuhanje i koristi se kao prehrambeni dodatak zbog omega-3 masnih kiselina.

Omega-3 masne kiseline su osjetljive na toplinu, kisik i svjetlost, stoga se za proizvodnju ulja najviše koristi proces hladnog prešanja. Treba izbjegavati bilo koji oblik prekomjernog zagrijavanja jer visoka temperatura može dovesti do oksidacije ulja. Stoga je poželjna niska razina vlage što rezultira boljim prinosom ulja (Bozan i Temelli, 2008).

a) Hladno prešanje

Prešanjem lanenog sjemena može se proizvesti hladno prešano ili djevičansko ulje. Laneno ulje koje se koristi za ljudsku prehranu je hladno prešano te nikakvi dodaci u njemu nisu dozvoljeni. Prema industrijskim standardima, hladno prešanje se provodi kada temperatura proizvodnog procesa ne prelazi 50 °C. Prešanje se uglavnom provodi na pužnim prešama, a zbog velike količine ulja i radi postizanja boljeg iskorištenja ponekad je potrebno dvostruko prešanje

pogače. Tijekom prešanja se mogu koristiti pužne preše sa hlađenjem jer zbog trenja dolazi do zagrijavanja preše i materijala.

Tehnologija proizvodnje ulja započinje s pripremom sjemena a uključuje uklanjanje nečistoća ispod 1 % i podešavanje udjela vode na 9,5-10 %. Optimalni udio vode minimalizira stvaranje finih čestica nakon mljevenja i pomaže postizanju maksimalnog iskorištenja. Sjemenke s optimalnom vlažnosti zatim se melju pomoću rotirajućih valjaka kako bi se razorile stanice biljnog tkiva i time postiglo lakše izdvajanje ulja. Potrebno je mljeti do optimalne veličine (presitno samljevena sirovina otežava cijedenje ulja) i mljeti jednoliko kako bi se održao konstantan režim daljnje prerade. Nakon prešanja ulje se filtrira i pakira u boce od tamnog stakla u struji dušika ili nekog drugog inertnog plina zbog toga što je laneno ulje jako osjetljivo na oksidaciju (Mikolaj, 2017).

Oksidativna stabilnost važan je parametar u procjeni kakvoće ulja i masti, a na oksidativnu stabilnost sjemenskih ulja značajno utječe sastav masnih kiselina i negliceridne komponente kao što su tokoferol i tokotrienol. Oksidacijski proces uglavnom uključuje degradaciju polinezasićene masne kiseline (PUFA) i stvaranje slobodnih radikala, što uzrokuje gubitak funkcionalnih svojstava i nutritivne vrijednosti (Moslavac i sur., 2009).

2.3. LANENA POGAČA

2.3.1. Kemijski sastav i upotreba lanene pogače

Lan je komercionalno dostupan u obliku sjemena, brašna i lanene pogače. Lanena pogača je kruti ostatak koji se dobije nakon prešanja lanenih sjemenki prilikom proizvodnje lanenog ulja. Ona visoke kvalitete ne smije sadržavati manje od 30 % proteina. Na tržištu postoje dvije vrste lanene pogače s obzirom na udio proteina, od 30-32 % i 40 % proteina (Mikolaj, 2017) Proteinska frakcija sadrži povoljan odnos aminokiselina, od kojih se najviše ističu lizin, treonin i tirozin, a od sumpornih aminokiselina sadrži metionin i cistin. Prema kemijskom sastavu lanena pogača sadrži 11-14 % vode, 30-34% proteina, 6-9 % masti, 31-35 % ekstrahiranih tvari bez dušika i 9-10 % celuloze (Tablica 1). Od biološki važnih aminokiselina sadrži 22,5% arginina, 8,7 % lizina, 3,1 % cistina i 5,4 % triptofana od ukupnog aminokiselinskog udjela u pogači (Goyal i sur., 2014).

Lanena pogača se koristi kao stočna hrana, sadrži oko 10 % sluzi koja pozitivno utječe na rad probavnog trakta te apsorpciju vode. Esencijalni aminokiselinski indeks lanene pogače je 69 u

odnosu na onu od soje (79) i uljane repice (75), dok prema FAO, razina proteina za lanenu pogaču iznosi 82, a soju 67. Neto iskorištenje i učinkovitost bjelančevina iz lanene pogače je neznatno niža u odnosu na sojinu pogaču, dok je udio proteina veći u lanenoj u odnosu na sojinu pogaču (Marambe i Wanasundara, 2017).

Provedeno je istraživanje u kojemu se htjelo uvidjeti kako će prehrana obogaćena lanenom pogačom utjecati na rast, razvoj peradi tj. pilića te utjecaj na kvalitetu mesa. Isti su hranjeni sa 100 g lanene pogače/kg. Rezultati su pokazali negativan učinak na rast pilića, ali pozitivne učinke vezane uz smanjenje razine kolesterola, masti i sposobnosti vezanja vode, antioksidativni potencijal. Došlo je i do povećanja pH svježeg mesa i lipidne peroksidacije istog (Mir i sur., 2018).

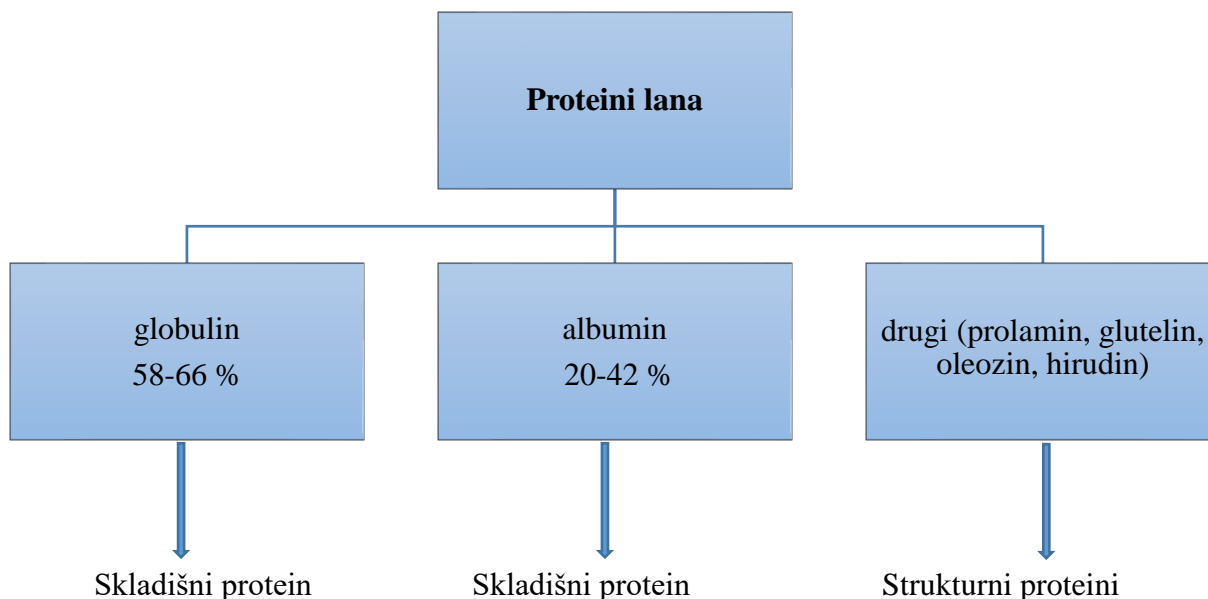
Tablica 1. Kemijski sastav pogače lana (Gutiérrez i sur., 2019)

Voda (%)	11-14
Proteini (%)	30-34
Masti (%)	6-9
Celuloza (%)	9-10
Nedušične ekstrahirane tvari (%)	31-35

2.3.2. Nutritivne komponente pogače lana

2.3.2.1. Proteini

Varijabilnost sadržaja proteina u lanu se može pripisati genetičkim i okolišnim čimbenicima. Pri hladnijim uvjetima, sadržaj proteina je niži u odnosu na udio ulja. Udio proteina se uglavnom kreće u rasponu od 20,9 do 48,1 %, sa srednjom vrijednosti od 34,5 %. Postoje genetički materijali koji ukazuju na moguć uzgoj lana sa visokim udjelom proteina bez utjecaja na sadržaj ulja. Podjela proteina u lanu prikazana je u Slici 2. Udio proteina u lanenoj pogači je 39 %, a u pogači soje 48 %.



Slika 2. Proteini u lanu (Rabetafika i sur., 2011)

Funkcionalne osobine proteina:

Topivost: čimbenici koji utječu na topivost proteina su pH, interakcija iona (1,5 M NaCl) i pjenjenje. Na topivost proteina ne utječu pH 6-10 i omjer otapala-uzorka. Ukoliko dođe do povećane interakcije između iona i smanjenja omjera otapalo-uzorak, topivost se povećava. Više od 80 % proteina iz lanenog sjemena je topivo ukoliko je omjer otapalo-uzorak 16 a pH 6,8. Proteini visoke topivosti se primjenjuju prilikom emulgiranja, pjenjenja ili formiranja filmova. Proteini niske topivosti se primjenjuju u protein-protein interakcijama te ako se emulgiranje želi smanjiti.

Viskoznost: fizikalno-kemijski parametar pri kojem dolazi do stvaranja emulzije. Vodena suspenzija lanene pogače ima svojstva tiksotropne tekućine (postaje manje viskozna ako se podvrgava silama smicanja tj. miješanja). Ponašanje sile smicanja ovisi o koncentraciji bjelančevina lanene pogače, tj. proporcionalno se povećava s povećanjem koncentracije proteina.

Stvaranje pjene: formiranje pjene s proteinima važno je kako u kozmetičkoj tako i prehrambenoj industriji. Kapacitet stvaranja pjene i njezina stabilnost ovise o koncentraciji proteina. U lanenoj pogači, navedeni parametri se linearno povećavaju s povećanjem koncentracije proteina, a za to je zaslužan povećan broj topivih proteina. Prilikom nedostatka

neproteinskih komponenti, laneno ulje djeluje kao sredstvo protiv pjenjenja ili aktivni biorazgradivi surfaktant (smanjuje površinsku napetost).

Veličina čestica: veličina čestica i tretmani tijekom obrade lana utječu na sadržaj proteina unutar lanene pogače. Čestice lanene pogače od 850 μm (mikrona/mikrometara) imaju niži udio proteina od onih čija je veličina 420 μm . Moguće je smanjenje veličina čestice sa 358 na 300 μm pomoću ekstrakcije otapalom (tekući metanol- amonijak petroleter).

Boja: lanena pogača je zlatnožute boje. Prilikom ekstrakcije otapalom, dolazi do promjene boje u nešto svjetliju što je rezultat indikacije/reverzibilnog vezanja atoma vodika sa neproteinskim konstituentom, fenolom.

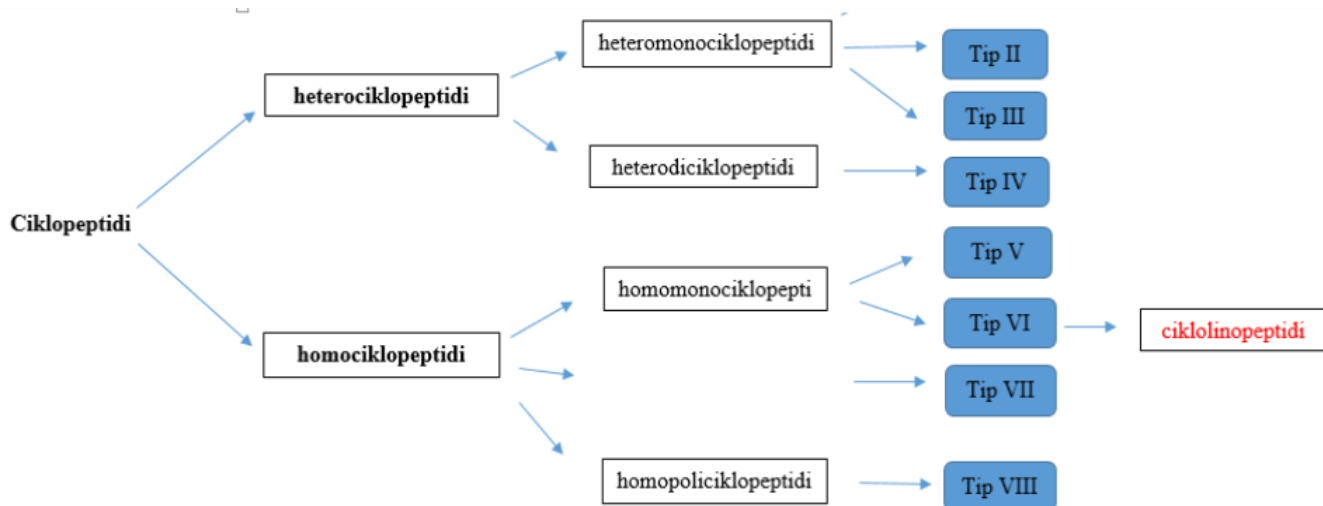
Iskorištenje proteina iz lana: proteini ekstrahirani iz sjemena lana mogu se koristiti pri proizvodnji konzervirane ribe, sladoleda, mesa, a sve to zahvaljujući prisustvu jako topivih i slabije topivih polisaharida. Interakcija između proteina i polisaharida bitna je i kod proizvodnje niskokaloričnih i nemasnih pekarskih proizvoda.

2.3.2.2. *Ciklolinopeptidi*

Istraživanja pokazuju da peptidi posjeduju širok spektar bioloških aktivnosti i mogu djelovati kao antikancerogeni i antimikrobni agensi. Neki peptidi proizvedeni u živim stanicama djeluju kao antioksidansi. Dobro poznati primjeri takvih antioksidanata uključuju hormone (melatonin, oksitocin i enkefalin) i peptide skeletnih mišića (karnosin i anzerin).

Neki autori smatraju da peptidi koji sadrže aromatske ostatke (tirozin, histidin, triptofan i fenilalanin) mogu stabilizirati reaktivne vrste kisika putem prijenosa elektrona. Peptidi su također dobro poznati kelatori metala i ovo svojstvo može doprinijeti antioksidativnim svojstvima. Struktura aminokiselina također utječe na antioksidacijsku aktivnost (Sharav i sur., 2013).

Biljni ciklopeptidi (Slika 3) su ciklički spojevi formirani od 2-37 proteina povezanih peptidnim vezama ili od neproteinskih aminokiselina. Većina ciklopeptida je pronađena u višim biljkama tijekom posljednjih pola stoljeća. Pripadaju 26 obitelji, 65 rodova i 120 vrsta. Primjerice, biljke *Caryophyllaceae* i *Rhamnaceae* sadrže ciklopeptide.



Slika 3. Podjela biljnih ciklopeptida prema Tan i Zhou (2006)

Laneno ulje sadrži prirodne hidrofobne cikličke peptide (ciklinopeptidi/CL) koji sadrže osam ili devet aminokiselinskih ostataka (Jadhav i sur., 2013). Kaufmann i Tobschirbel su 1959. godine izolirali ciklinopeptid A (CLA, tip VI) iz *Linum usitatissimum*. Deset godina kasnije, Prox i Weygand su odredili primarnu strukturu CLA [ciklo (-Pro-Pro-Phe-Phe-Leu-Ile-Ile-Leu-Val)] (Picur i sur., 2006).

U sjemenkama lana identificirano je oko 20 orbitida s različitim strukturama i imenovani su prema nomenklaturi koju su predložili Shim i suradnici (2014). Istraživanja su pokazala da orbitidi pokazuju značajnu imunosupresivnu aktivnost, te imaju potencijalnu antitumorsku aktivnost induciranjem stanične apoptoze. Ciklinopeptidi se mogu vezati s humanim serumskim albuminom i tvoriti komplekse s metalom terbijem (Tb) te tvori kristalne molekule s alkoholima. Te se biološke aktivnosti odnose ne samo na njihove karakteristike, već i na njihov sadržaj, koji ovise o botanici, okolišu, uzgoju ili vremenu žetve (Zou i sur., 2017).

Postoje različite tehnike za detekciju i identifikaciju ciklinopeptida, kao što je masena spektrometrija, spektroskopija kružnog dikroizma (CD), infracrvena (IR) spektroskopija i NMR (nuklearna magnetna rezonanca). NMR i CD mogu pružiti detaljne informacije o konformacijskim strukturama ciklinopeptida (Zou i sur., 2017).

Drugi sličan ciklički peptid nazvan CLB izoliran je u Weygandovom laboratoriju. Razlikuje se od CLA zbog Met ostatka i ima sljedeći slijed: ciklo (-Ile-Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Ile-Met-Leu).

CLB je ponovno proučavan od strane Morita i suradnika (1999). U istoj istraživačkoj skupini opisani su i drugi ciklički peptidi iz *Linuma* (Mso - metionin sulfoksid) (Picur i sur., 2006).

CLC ciklo (-Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Ile-Mso-Leu-Ile-);

CLD ciklo (-Pro-Phe-Phe-Trp-Ile-Mso-Leu-Leu-);

CLE ciklo (-Pro-Leu-Phe-Ile-Mso-Leu-Val-Phe-);

CLF ciklo (-Pro-Phe-Phe-Trp-Val-Mso-Leu-Mso-);

CLG ciklo (-Pro-Phe-Phe-Trp-Ile-Mso-Leu-Mso-);

CLH ciklo (-Pro-Phe-Phe-Trp-Ile-Mso-Leu-Met-);

CLI ciklo (-Pro-Phe-Phe-Trp-Val-Met-Leu-Mso-).

Morita i suradnici (1999) su identificirali strukturu CL_B koristeći NMR i IR metode. Reaney i suradnici (2013) potvrdili su strukture 9 tipova CL pomoću NMR metode. No, masena spektrometrija ima prednosti zbog jednostavne pripreme uzoraka, visoke osjetljivosti i širokog dinamičkog raspona. Stefanowicz (2004) je identificirao gotovo potpun skup CL iz svježe mljevenog lana uporabom MS i MS/MS analize. Gui i suradnici (2012) identificirali su i kvantificirali 6 tipova CL-a pomoću HPLC analize (Zou i sur., 2017).

U nedavnim istraživanjima su otkrivena još dva imunosupresiva, CL_J i CL_K, koji su prilikom istraživanja pokazala bolju termičku i kemijsku stabilnost pri povišenim temperaturama u čistim ili suhim organskim otopinama, a da nije došlo do njihovog otapanja. Međutim, 6 i 4 (roditeljski peptidi) od kojih su izolirani 11 i 12, su rastavljeni na derivate olefina. To pokazuje da je sulfon bočni lanac i ciklična struktura ciklolinopeptida 11 i 12 zaslužna za stabilnost istih pri povišenim temperaturama. Osim toga, termički stabilni peptidi imaju široku primjenu u biomedicini i nanotehnologiji (Jadhav i sur., 2013).

2.3.2.3. Vitamini i minerali

Najzastupljeniji vitamini u sjemenu lana su tokoferoli (α -, β -, i γ -oblik) i niacin (Bernacchia i sur., 2014).

Lan sadrži manje količine vitamina topivih u vodi i masti. Vitamin E (vitamin topiv u mastima) je u lanu prisutan kao gama-tokoferol. Na sadržaj tokoferola u lanu utječe sorta, zrelost sjemena, regija uzgoja, uvjeti uzgoja i način ekstrakcije. Sadržaj gama-tokoferola može biti u rasponu od 8,5 do 39,5 mg/100 g sjemena. Lan također sadrži i malu količinu vitamina K (filokinon) bitnu za formiranje proteina, zaslužnih za zgrušavanje krvi i izgradnju kostiju (Morris, 2007).

Širok spektar minerala poput fosfora, kalija, kalcija, magnezija, sumpora mala količina željeza i cinka prisutna je u sjemenkama lana (Tablica 2) (Kozłowski i sur., 2014).

Tablica 2. Sadržaj mineralnih tvari u lanu (Kozłowski i sur., 2014)

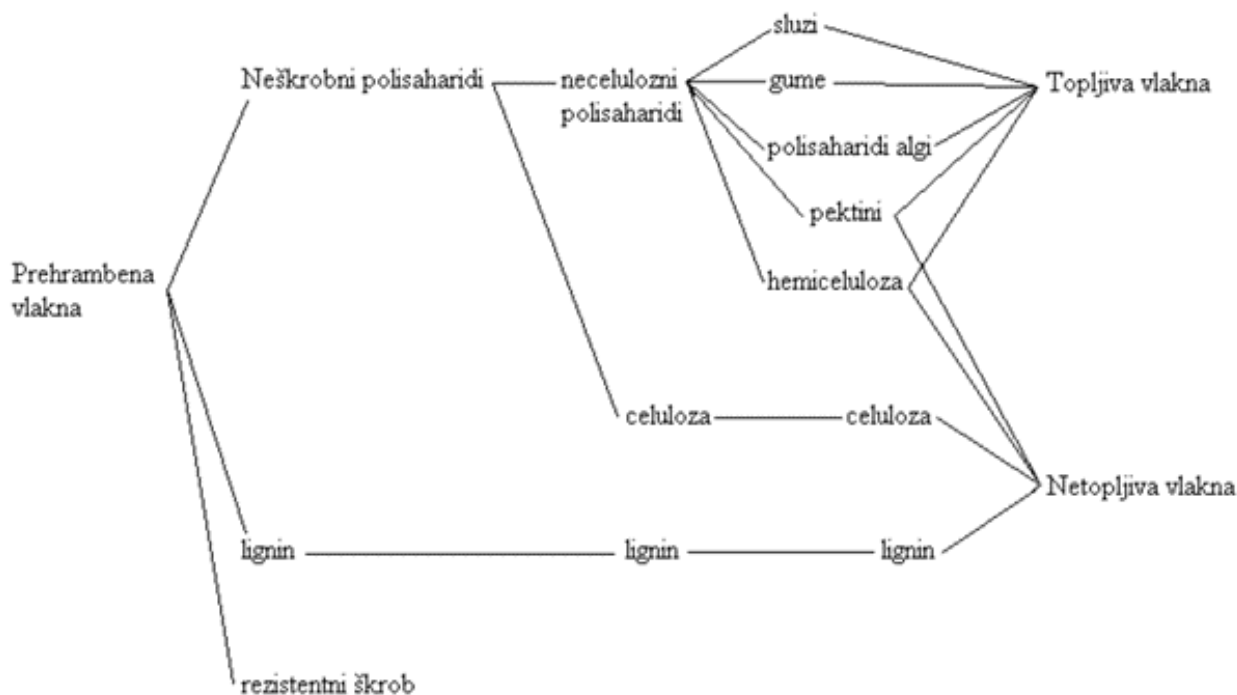
Minerali (mg g ⁻¹)		Minerali (μg g ⁻¹)	
Natrij	0.6	Cink	123.2
Kalij	12.1	Željezo	207.6
Kalcij	4.5	Bakar	20
Magnezij	6.1	Mangan	58.5
Fosfor	9.9		
Sumpor	4.0		

2.3.2.4. Prehrambena vlakna

Prehrambena vlakna (Slika 4) opisuju različite vrste biljnih tvari koje enzimi, odgovorni za probavu kod čovjeka ne mogu lako razgraditi (Soni i sur., 2016).

Postoje dvije glavne vrste vlakana, a to su: dijetalna i funkcionalna vlakna. Dijetalna vlakna se sastoje od neprobavljivih biljnih ugljikohidrata i drugih materijala koji su netaknuti u biljkama. Sjemenke cijelog lana i mljeveni lan su izvori prehrambenih vlakana. Funkcionalna vlakna se sastoje od neprobavljivih ugljikohidrata koji su ekstrahirani iz biljaka, pročišćeni i dodani u hranu. Ukupna vlakna čine oko 28 % težine sjemenki lana. Glavne frakcije vlakana u lancu sadrže celulozu (glavni strukturni materijal stijenki biljnih stanica), gumu (vrsta polisaharida koji u dodiru s vodom ili drugom tekućinom postaje viskozna) te lignin (visoko razgranato vlakno koje se nalazi unutar staničnih stijenki drvenastog bilja). Lignini doprinose snazi i krutosti stijenke stanica (Morris, 2007).

Lan je prepoznatljiv zbog zdravstvenih prednosti svojih ulja i fitokemikalija kao što su lignani te topivih i netopivih vlakana. Lanena vlakna su poznata kao prirodna, biorazgradiva vlakna sa dobrim mehaničkim svojstvima. Osim toga su mekana, sjajna i fleksibilna te su čvršća od vlakana pamuka. Mekana lanena vlakna se koriste u izradi čipke, dok se grublja koriste za proizvodnju užadi. Služe kao sirovina u proizvodnji novčanica, cigareta, jačanje plastičnih materijala. Zbog ekoloških razloga i dobrih mehaničkih svojstava se sve više koriste kao zamjena za staklo (Singh i sur., 2011).



Slika 4. Klasifikacija prehrambenih vlakana (Leovac, 2014)

Udio toplivih i netopivih vlakana varira između 20:80 i 40:60. Glavna netopljiva frakcija vlakana sastoji se od celuloze i lignina, a topljive frakcije vlakana imaju svojstva gume (Muir i Westcott, 2003).

Unos prehrambenih vlakana pruža mnoge zdravstvene prednosti. Pojedinci s visokim unosom dijetalnih vlakana imaju značajno niži rizik za razvoj koronarne bolesti srca, moždanog udara, hipertenzije, dijabetesa, pretilosti i nekih gastrointestinalnih bolesti. Netopiva vlakna povećavaju volumen crijeva te zbog toga imaju laksativan učinak i sprječavaju konstipaciju. S druge strane, topiva vlakna održavaju razinu glukoze u krvi i utječu na sniženje razine LDL-kolesterola u krvi (Goyal i sur., 2014).

Povećani unos vlakana pogoduje brojnim gastrointestinalnim poremećajima. Prebiotička vlakna pojačavaju imunološku funkciju. Unos prehrambenih vlakana pruža djeci slične pogodnosti kao i za odrasle. Preporuke za unos prehrambenih vlakana su 38 g za muškarce dobi do 50 godina, a 25 g za žene dobi do 50 godina. Muškarci stariji od 50 godina trebali bi zbog smanjenog unosa energije u ovoj životnoj dobi unositi 30 g, a žene 21 g (Vranešić i sur., 2008).

2.3.2.5. Masne kiseline

Masne kiseline su karboksilne kiseline, često s dugim nerazgranatim lancem, a mogu biti zasićene ili nezasićene. Zasićene masne kiseline ne sadrže dvostruke (kovalentne) veze ili druge funkcionalne skupine u molekularnom lancu. Nezasićene masne kiseline su kiseline oblika sličnog zasićenim, osim što kod njih postoji jedna ili više alkenjskih funkcijjskih skupina unutar lanca.

Lan je povijesno cijenjen zbog obilja masnoće, što osigurava jedinstvenu mješavinu masnih kiselina. Masne kiseline su organski spojevi koji se nalaze u gotovo svim namirnicama. Postoje dvije skupine omega masti: omega-3 i omega-6 masne kiseline. Linolenska kiselina, eikosapentaenska kiselina (EPA) i dokosaheksanska kiselina (DHA) su tri vrste omega-3 masnih kiselina i nutritivno su važne. Pokazalo se da sve tri masne kiseline smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti (Soni i sur., 2016). Lan je bogat polinezasićenim masnim kiselinama, posebno ALA, (esencijalna omega-3 masna kiselina) i linolnom kiselinom (LA). Ove dvije polinezasićene masne kiseline su neophodne za ljude. Laneno sjeme sadrži 35 do 45 % ulja, od čega je 45 do 52 % ALA (Soni i sur., 2016), dok linolna kiselina čini 16 % ukupnih masnih kiselina (Morris, 2007).

Udio linolenske kiseline u lanenom ulju varira zbog raznih čimbenika, pa tako lan uzgojen u Kanadi sadrži 5 % palmitinske kiseline (16:0), 3 % stearinske kiseline (18:0), 17 % oleinske kiseline (18:1), 15 % linolne (omega-6) kiseline (18:2) i 59 % linolenske kiseline (18:3) dok slična sorta lana uzgojena u Sjevernoj Dakoti sadrži 5-6 % palmitinske kiseline (16:0), 3-6 % stearinske kiseline (18:0), 19-29 % oleinske kiseline (18:1), 14-16 % linolne kiseline (18:2) te 45-52 % linolenske kiseline (18:3). Niže temperature tijekom 10-25 dana nakon cvatnje su glavni uzrok višeg udjela linolenske kiseline u lanenom sjemenu (Ćapin, 2016).

Laneno i repičino ulje imaju najniže razine nutritivno nepoželjnih zasićenih masnih kiselina. Razina poželjnih mononezasićenih tvari u lanenom ulju je skromna. Udio ALA u pojedinim biljnim uljima je prikazan u Tablici 3.

Tablica 3. Sadržaj ALA u biljnim uljima (postotak od ukupnih masnih kiselina) (Morris, 2007)

Tradicionalna ulja (%)	
Laneno ulje	57
Repičino ulje	11
Sojino ulje	8

U usporedbi s ostalima, laneno ulje sadrži nešto manju koncentraciju tokoferola (upola manju nego u suncokretovom i repičinom ulju i za trećinu manje nego u sojinom ulju). Dominantni tokoferol u lanenom ulju je γ -tokoferol (oko 80 %), a kao jedinstveni antioksidans se pokazao plastokromanol-8, derivat γ -tokoferola sa dvostruko dužim bočnim lancem. Steroli su prisutni u lanenom ulju, ali u mnogo manjim koncentracijama nego u ostalim biljnim uljima. Tako npr. u lanenom ulju ukupna koncentracija sterola iznosi $2,3 \text{ mg g}^{-1}$ dok u biljnim uljima (suncokret, soja, repica) koncentracija je $4,1\text{-}6,9 \text{ mg g}^{-1}$. Sastav sterola je sličan kao i kod drugih ulja što znači da je β -sitosterol najzastupljeniji a zatim kampesterol i $\Delta 5$ -avenasterol (Przybylski, 2005).

2.4. KRIOGENO MLJEVENJE

Kriogeno mljevenje je grana inženjerstva u kojoj se primjenjuju niske temperature, od apsolutne nule (-273,15 °C) do -150 °C. Kao i svaka metoda, kriogeno mljevenje ima prednosti i nedostatke. Specifična potrošnja energije, smanjenje veličine čestica (povećanje raspoložive površine tvari), zadržavanje boje i okusa uzoraka, kontrola atmosfere i temperature samo su neke od prednosti kriogenog mljevenja u odnosu na konvencionalne metode.

Jedno od glavnih ograničenja uobičajnog procesa mljevenja je toplinsko oštećenje koje se može prevenirati kontroliranim temperaturnim uvjetima. Promjene u kvaliteti materijala tijekom mljevenja vrlo su složene za materijale koji sadrže velike količine hlapivih ulja i masti koje se lako oksidiraju.

Upotreba kriogena, kao što je tekući dušik (LN₂) ima dvostruku ulogu. Ograničava prirodno povišenje temperature prehrambenih proizvoda tijekom procesa, što može dovesti do stvaranja grudica u materijalu iz drobilice, a rezultat su nejednake granule i razvoj oksidacijskih reakcija koje mogu biti uklonjene stvaranjem inertne atmosfere uvođenjem dušika (Goswami, 2019).

Zahvaljujući svojoj vrlo niskoj temperaturi (-196 °C pri prirodnom tlaku), tekući dušik se koristi za mljevenje prehrambenih proizvoda kao što su ulje, kava, začini, bilje, kakao, sjemenke i orašasti plodovi, zatim hrane koja bi mogla proći kroz promjene okusa i izgubiti dio svoje arome tijekom tradicionalnog mljevenja. Prednosti uporabe tekućeg dušika u primjeni ove tehnologije odnosi se na visoku dostupnost, inertnost, dobro provođenje topline i jednostavno rukovanje. Dok su nedostaci visoka potrošnja energije i troškovi rada postrojenja (Wilczek i sur., 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Materijal koji je korišten tijekom ovog rada je pogača lana, proizvedena laboratorijskim dvostrukim hladnim prešanjem (veće iskorištenje ulja iz pogače) na pužnoj preši (Komet, model CA/53, Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka) na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta U Zagrebu iz sjemena lana (OPG Janković). Lanena pogača, dobivena kao nusproizvod prilikom proizvodnje lanenog ulja je samljevena (8 grama uzorka) na kriomlinu (Retsch + Apollo Haan, Njemačka) i potom skladištena pri temperaturi od -18 do -20 °C.

3.1.1. Reagensi i standardi

- Sumporna kiselina 96 %, Carlo Erba reagens S.A.S (Francuska)
- Borna kiselina 4 % sa metilnim crvenilom i brom-krezol zeleno, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, Carlo Erba Reactifs- SDS (Francuska)
- Octena kiselina, 2 M, Macron Fine Chemicals™ (Pennsylvania, SAD)
- Etanol 95 %, Kefo (Sisak, Hrvatska)
- Etanol 78 %, Kefo (Sisak, Hrvatska); priprema: odmjernu tikvicu od 1 l stavi 180 mL destilirane vode te se tikvica do oznake napuni 96 %-tnim etanolom
- Aceton, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska)
- Enzimski set K-INTDF, Megazyme International Ireland (Wicklow, Irska); čuvaju se na temperaturi 0 - 5 °C:
 - termostabilna α -amilaza (E-BLAAM); 3000 Ceralpha Units mL⁻¹
 - proteaza (E-BSPRT); 50 mg mL⁻¹; 350 Tyrosine Units mL⁻¹
 - amiloglukozidaza (E-AMGDF); 200 pNP β -maltoside Units mL⁻¹ (ili 3,300 Units mL⁻¹ on soluble starch)
- D-sorbitol, Megazyme set
- Celite, Sigma-Aldrich
- Smola Amberlite FPA53, ROHM AND HAAS FRANCE S.A.S., Dow
- Smola Amberlite 200CNa, ROHM AND HAAS FRANCE S.A.S., Dow (aktivacija natapanjem 30 minuta u dvostruko većem volumenu 7 % HCl, potom ispiranje)

- 0,561 M otopina HCl; priprema: 9,63 mL 37 %-tne otopine HCl-a se otpipetira u odmjernu tikvicu od 200 mL u koju je prethodno stavljeno oko 100 mL vode te se nadopuni do oznake destiliranom vodom
- Otopina NaOH 5 %; priprema: u odmjernu tikvicu od 100 mL se stavi 5 g NaOH te se otopi u 95 mL destilirane vode
- Otopina HCl 5 %; priprema: 12,24 mL 37 %-tne HCl se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL u koju je prethodno stavljeno oko 50 mL destilirane vode te se nadopuni do oznake destiliranom vodom
- Otopina za pranje filter lončića, Labex, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Otopina NaOH 6 M; priprema: 24 g NaOH se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom
- Metanol, Kefo (Sisak, Hrvatska)
- Trisma ® Base , Sigma cat. no. T-1503 (SAD)
- Maleatni pufer; priprema: doda se 170 mL melatnog pufera u Duran bocu, nakon toga 0,0586 g pankreasne α -amilaze i 0,176 mL amiloglukozidaze

3.1.2. Aparatura

- Analitička vaga, ALS220-4N, Kern & Sohn (Njemačka)
- Tehnička vaga
- Uparivač s dušikom
- Laboratorijska pužna preša (Komet, model CA/53, Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka)
- Kriomlin (Retsch + Apollo Haan, Njemačka)
- Kjeltec 2100 uređaj (Foss A/S, Hillerød, Danska)
- Centrifuga (Rotina 35, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen)
- Vortex uređaj (IKA MS 3 basic, IKA-Works, Staufen im Breisgau, Njemačka)
- Vakumski otparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Vodena kupelj s tresilicom (Bibby Scientific™ Stuart™ SBS40 Waterbath, UK)
- Eksikator
- Magnetska mješalica KA® RT5 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
- Mufolna peć, KR170, W. C. HERAEUS HANAU (Njemačka)

- Termometar, Quartz
- pH metar 3510, Jenway 3510 (UK)
- Vakuumpumpe KIF LAB (Njemačka)
- HPLC uređaj (Shimadzu, Japan)

3.2. METODE RADA

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

Za određivanje udjela vode u lanenom sjemenu i pogači korištena je standardna metoda (HR EN ISO 665:2004) sušenja do konstantne mase u sušioniku pri temperaturi od 103 ± 2 °C. Zatim se na analitičkoj vagi u osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu bez poklopca izvaže 5 g uzorka (sjemena), s točnošću 0,001 g. Posudica se stavi u sušionik, prethodno zagrijan na temperaturu od 103 ± 2 °C. Uzorak se suši sve dok ne postigne konstantnu masu, tj. do trenutka kada razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne bude najviše 0,005 g. Za svaki uzorak se naprave dva paralelna mjerenja, a razlika među njima ne smije biti veća od 0,5 %.

Kao rezultat uzima se srednja vrijednost dva paralelna određivanja. Udio vode i u sjemenu i u pogači izražava se u postocima, prema jednadžbi [1]:

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

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 sjemenu i pogači

Za određivanje udjela ulja u sjemenu lana korištena je standardna ISO metoda ekstrakcije po Soxhletu (HRN EN ISO 659:2010). U čahurama za ekstrakciju na analitičkoj vagi je izvagano po 10 g samljevenog lana i samljevene lanene pogače (određivane su po dvije paralele za svaki uzorak). Mljevenje uzorka je provedeno u električnom mlinu za kavu. Izvagani uzorak u čahuri se zatvori vatom i stavi u ekstraktor. Nakon toga se doda petroleter (otapalo), a ekstrakt se skuplja u tikvicu u koju se doda 2-3 kuglice za vrenje. Navedena ekstrakcija traje 8 sati. Kada je proces ekstrakcije završen, otapalo se otpari, a ostatak stavi na sušenje u sušionik pri 103 ± 2 °C sve dok ne postigne konstantnu masu.

Rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja s tim da razlika ne prelazi 0,5 %.

Maseni udio ulja izračuna se prema jednadžbi [2]:

$$\text{➤ udio ulja (\%)} = \frac{m_1 - m_0}{m_2} \times 100 \text{ [2]}$$

gdje je:

m_0 = masa prazne epruvete (g)

m_1 = masa pune epruvete (g)

m_2 = masa uzorka (g)

3.2.3. Određivanje udjela proteina u lanenoj pogači

Korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 20483:2014) za određivanje proteinskog i neproteinskog dušika, koja se temelji na oslobađanju reducirajućeg dušika uz pomoć sumporne kiseline u obliku amonijevog sulfata.

Odvažuje se 0,5 g uzorka (samljevenog sjemena, tj. lanene pogače) s točnošću 0,001 g. Uzorak se prebaci u staklenu kivetu, a potom se stave po dvije Kjeldahl tablete za spaljivanje (Merck, Darmstadt, Njemačka). Nakon toga se u kivetu doda 15 mL 96 % sumporne kiseline. Uzorci se spaljuju u bloku za spaljivanje uz povećanje temperature svakih 10-15 minuta. Postupak traje 3-4 sata dok otopina ne bude bistra. Plavo-zelena bistra tekućina i kiveta bez crnih mrlja, pokazuje potpunu digestiju uzorka, pri čemu rezultira dobivanjem amonijevog sulfata. Nakon što se otopina ohladi pri sobnoj temperaturi, u uzorak se doda 70 mL destilirane vode te se kiveta stavi u destilacijsku jedinicu Kjeltex 2100 uređaja (Foss A/S, Hillerød, Danska), a na izlaznu kondenzacijsku jedinicu se postavi erlenmayerova tikvica sa 25 mL 4 %-tne otopine borne kiseline s metilnim crvenilom i brom-krezol zeleno (služe kao indikatori). Uređaj automatski dodaje 5 x 10 mL natrijeve lužine (40 % otopine NaOH) i destiliranu vodenu paru (4 minute) pri čemu se kondenzira u bornu kiselinu. Količina prisutnog dušika u uzorku se određuje titracijom pomoću klorovodične kiseline ($c = 0,1 \text{ M}$) do promjene boje iz plavo-zelene u crvenu. Navedeni postupak vrijedi i za slijepu probu.

Udio proteina izračunava se prema formuli [3] iz udjela prisutnog dušika koji se računa prema formuli [4]. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina dvaju paralelnih određivanja:

$$\text{➤ \% dušika} = \frac{(V_2 - V_1) \times c(\text{HCl}) \times 14,008}{m} \times 100 \text{ [3]}$$

gdje je:

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

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

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

m = masa uzorka (mg)

$\text{\% proteina} = \text{\% dušika} \times f \text{ [4]}$

f = faktor konverzije za uljarice je 6,25

3.2.4. Mljevenje pogače kriomlinom

Pogača uljane repice samljevena je na vibracijskom kriomlinu (Retsch + Apollo, Haan, Njemačka) (Slika 5) sa spremnikom tekućeg dušika na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uređaj se sastoji od kućišta, cilindra za mljevenje s pripadajućim čepom za zatvaranje/otvaranje, cilindra za protutežu, posude za mljevenje, filter rešetke, ventila za dovod dušika i ventila za regulaciju tlaka.

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

Vrijeme i načini mljevenja uzorka pogače koji su provedeni prikazani su u diplomskom radu Ivone Kuraice (2019), a za potrebe ovog istraživanja korištena su dva različita vremena mljevenja pogače (8 i 16 minuta) te dva načina mljevenja (sa 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnjih analiza.



Slika 5. Kriomlin (CryoMill, Retsch, Haan, Njemačka; 2017)

3.2.5. Ekstrakcija nepolarnih komponenti

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

3.2.6. Određivanje sastava masnih kiselina pomoću GC-a

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

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

Analiza dobivenih metilnih estera provedena je na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network uz plameno-ionizacijski detektor (Agilent, Santa Clara, SAD). Korištena je kapilarna kolona DB-23 ($60 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$). Protok helija kao plina nosioca iznosio je $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, uz split 60:1. Temperatura injektora postavljena je na $250 \text{ }^\circ\text{C}$, a temperatura detektora na $280 \text{ }^\circ\text{C}$. Temperatura pećnice je programirana je da raste $7 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ od $60 \text{ }^\circ\text{C}$ do $220 \text{ }^\circ\text{C}$ uz zadržavanje na maksimalnoj temperaturi od 17 minuta.

Kvalitativno određivanje masnih kiselina provedeno je usporedbom retencijskih vremena njihovih metilnih estera s retencijskim vremenima komercijalnih, sastavom poznatih standarda.

Metodom normizacije površine ispod pikova, računa se pojedinačni udio masne kiseline i izražava kao % od ukupnih masnih kiselina.

Analiza je provedena u 2 paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

3.2.7. Određivanje udjela mineralnih tvari u lanenoj pogači

Prvi korak pri određivanju udjela mineralnih tvari je vaganje uzorka od 5 g. Potom se u svaku posudicu s uzorkom doda 1,5 mL etanola i stavi na grijač sat vremena. Uzorak se zagrijava do prestanka dimljenja. Osušen i djelomično spaljen uzorak se stavlja u mufolnu peć na 800 °C, 4 sata. Uzorak se mora ohladiti u eksikatoru, a dobiveni pepeo se važe na analitičkoj vagi. Za svaki uzorak odrađena su 3 paralelna mjerenja.

Udio mineralnih tvari izračunava se prema formuli [5]:

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

gdje je:

m_0 = masa uzorka (g)

m_1 = masa ostatka (g)

V = količina vode (srednja vrijednost) u ispitivanom uzorku (%)

3.2.8. Određivanje udjela netopivih i topivih vlakana

Za određivanje udjela vlakana korištena je standardna metoda AOAC 2011.25 (Megazyme, 2017).

Uzorak se prije analize mora odmastiti ukoliko je sadržaj masti veći od 10 %. Uzorak se prije analize ekstrahira petroleterom u aparatu po Soxhletu 1 sat. Uzorak se potom stavi u čahure napravljene od filterpapira. Nakon ekstrakcije, petroleter se otpari, a tikvica s ostatkom osuši na temperaturi od 100 °C, 1 sat, hladi u eksikatoru i važe. Na uzorcima koji se analiziraju se paralelno odredi i vlaga. Analiziraju se dvije paralele lanene pogače i dvije paralele slijepe probe.

Odvaže se 0,1 g mljevenog uzorka, $\pm 0,005$ g u Duran boce od 250 mL. Uzorak se navlaži sa 1 mL etanola (95 %), doda se 40 mL maleatnog pufera (pH 6) koji sadrži pankreasnu α -amilazu i amiloglukozidazu. Uzorci se inkubiraju u vodenoj kupelji s tresilicom (brzina trešnje je 150 rpm) na 37 °C, točno 16 sati. Potom se u uzorak doda 3 mL 0,75 M trizma bazične otopine (pH~8.2) koja je zaslužna za inaktivaciju enzima i isti se lagano promiješa. Duran boce s malo olabavljenim čepom se stave u drugu kupelj na temperaturu od 95-100 °C/20 minuta uz povremeno miješanje boce. Nakon što se uzorci ohlade na temperaturu od 60 °C, doda se 100 μ L otopine proteaze, promiješa te inkubira na 60 °C/30 minuta. Boce se izvade iz kupelji i odmah se doda 4 mL 2 M octene kiseline (pH~4.3) i 1 mL internog standarda tj. D-sorbitola ($c=100$ mg mL⁻¹).

3.2.8.1. Netopiva vlakna

Za netopiva vlakna, prethodno osušen i izvagan lončić s celitom se namoči sa približno 15 mL etanola (78 %) sa bocom štrcaljkom, poravna sa staklenim štapićem i posuši pod vakuumom. Ispiranje i poravnavanje celita se uvijek radi na odsisnoj boci za otpad.

Zatim se otopina uzorka i enzima profiltrira u drugu odsisnu bocu predviđenu za uzorak i ispiru sa 7 x 5 mL destilirane vode (prethodno zagrijane na 60 °C). Bitno je dobro isprati Duran bocu kako bi što više iskoristili isti uzorak. Sakupljeni filtrat se podesi na volumen 85 mL u menzuru te se sačuva za određivanje topivih vlakana u Duran boce od 1000 mL.

Treći korak je stavljanje lončića na odsisnu bocu za otpad, koji se ispere sa po dvije porcije 15 mL etanola (78 %-tni), 15 mL 95 %-tnog etanola i 15 mL acetona. Filtrat od ispiranja se baci, a lončići se preko noći osuše na 105 °C, prekriveni sa aluminijskom folijom te se nakon hlađenja važu na analitičkoj vagi. Potom se izračuna udio netopivih vlakana velike molekulske mase (IDF).

3.2.8.2. Topiva vlakna velike molekulske mase

Za određivanje topivih vlakana velike molekulske mase (SDFP) potrebno je zagrijati filtrat (~85 mL) na 60 °C te dodati 340 mL (volumen izmjeren na sobnoj temperaturi) 95 %-tnog etanola zagrijanog na 60 °C, a potom dobro promiješati.

Otopina se taloži minimalno 60 minuta pri sobnoj temperaturi te se ponovi postupak filtriranja kao za netopiva vlakna, s tim da se sadržaj boce, odnosno uzorak ispire sa 7 x 5 mL 78 %-tnog etanola. Zatim se lončići prebacena odsisnu bocu za otpad i isperu sa po dvije porcije 15 mL etanola (78 %-tni), 15 mL 95 %-tnog etanola i 15 mL acetona.

Filtrat se sačuva za određivanje topivih vlakana male molekulske mase (SDFS), a ostatak na lončiću se osuši i korigira za proteine i pepeo.

3.2.8.3. Određivanje topivih vlakana male molekulske mase (SDFS) na HPLC-u

Jedan filtrat od dvaju paralelnih određivanja se sačuva za slučaj potrebe (prolijevanja), a drugi se otpari i deionizira. Polovina drugog filtrata prenese se u tikvicu za otparavanje od 500 ili 1000 mL te se na rotavaporu pod vakuumom na 60 °C otpari do suha. Tikvica se ispire sa 5 mL deionizirane vode i okreće oko 2 minute na rotavaporu, dok se sve ne otopi. Zatim se otopina prebaci u polipropilenske bočice od 15 mL (falkonice) i čuva u zamrzivaču za daljnju analizu do idućeg dana. Uzorak se deionizira tako da se 4 mL otopine prenese na kolonu za deionizaciju sa dobro izmiješanim kationskim i anionskim (Amberlite i Ambersep) smolama. Na koloni se eluira brzinom 1 mL min⁻¹ (~1 kap/ 3 sekunde), a protok se prilagodi zakretanjem ventila kolone uz povremeno provjeravanje istog, jer može doći do promjene protoka tijekom elucije. Eluat se skuplja u Falcon epruvetu od 50 mL koja je smještena u kadici manifolda. Kada uzorak uđe među smole, doda se 2 mL deionizirane vode na vrh kolone. Nakon što taj volumen deionizirane vode prođe kroz kolonu, doda se još ~20 mL do vrha kolone i eluira se istom brzinom. Eluat se prebaci u okruglu tikvicu od 250 mL i upari do suha na rotavaporu na 60 °C. U tikvicu se doda 1 mL deionizirane vode i 2 minute vrti na rotavaporu kako bi se otopili šećeri. Otopina se

pipetom prebaci u polipropilensku posudu te se preko šprice filtrira preko 0,45 µm filtera. Tako pripremljeni uzorak se injektira u HPLC s RI detektorom. Mobilnu fazu čini otopina Na₂Ca-EDTA u vodi (50 mg L⁻¹) s pritokom 0,5 mL min⁻¹. Kolona se grije na temperaturu od 90 °C, a vrijeme propuštanja uzorka je 30 minuta.

Za kvantifikaciju je potrebno kroz HPLC propustiti i otopine glukoze tri puta (c= 5, 10 i 20 mg mL⁻¹). Propusti se i interni standard, D-sorbitol (c= 0,1 mg mL⁻¹ x 3) i standardi za utvrđivanje retencijskog vremena sadržanih u enzimskom setu (maltoza i maltodekstrin x 2). Odredi se vrijeme razgraničenja između maltoze (DP2) i oligosaharida (DP3) te se odredi površina svih pikova sa stupnjem polimerizacije većim od točke razgraničenja za DP2 i DP3. Ukupan zbroj predstavlja SDFS.

Očita se površina pikova za otopinu glukoze i internog standarda s 3 kromatograma. "Faktor odgovora" (Rf) je recipročna vrijednost nagiba pravca dobivenog usporedbom omjera površina za D-glukozu/D-sorbitol (y-os) u odnosu na omjer mase d-glukoze/D-sorbitol (x-os). Zatim se izračuna srednja vrijednost faktora odgovora (0,97 za D-sorbitol):

$$\text{➤ Faktor odgovora (Rf)} = (\text{PA/IS}) / (\text{PA-Glu}) \times (\text{Wt-Glu/Wt-IS})$$

gdje je:

PA-IS = površina pika internog standarda (D-sorbitol)

PA-Glu = površina pika D-glukoze

Wt-Glu = masa D-glukoze u standardu

Wt-IS = masa D-sorbitola u standardu

$$\text{➤ Slijepa proba (B)} = (\text{BR}_1 + \text{BR}_2) / 2 - \text{PB} - \text{PA} \text{ (mg)}$$

gdje je:

BR₁ i BR₂ = masa ostatka dvaju paralelnih određivanja slijepe probe (mg)

PB i PA = masa proteina i pepela određena u ostatku slijepe probe (mg)

$$\text{Vlakna HMWDF, IDF ili SDFP} = \frac{R_1 + R_2 - PB - PA - B}{\frac{(m_1 + m_2)}{2}} \times 100 \text{ (mg/100g)}$$

gdje je:

R_1 = masa ostatka 1 uzorka mase m_1 (mg)

R_2 = masa ostatka 2 uzorka mase m_2 (mg)

m_1 = masa uzorka 1 za analizu (g)

m_2 = masa uzorka 2 za analizu (g)

PA = masa pepela iz ostatka R_1 (mg)

PB = masa proteina iz ostatka R_2 (mg)

$$\text{HMWDF (\%)} = \frac{\text{HMWDF (mg / 100 g)}}{1000}$$

$$\text{IDF (\%)} = \frac{\text{IDF (mg / 100 g)}}{1000}$$

$$\text{SDFP (\%)} = \frac{\text{SDFP (mg / 100 g)}}{1000}$$

Topiva vlakna male molekulske mase (SDFS):

$$\text{SDFS (mg/100 g)} = R_f \times (m\text{-IS, mg}) \times (\text{PA-SDFS}) / (\text{PA-IS}) \times \frac{100}{m}$$

gdje je:

R_f = faktor odgovora

m-IS = masa (u mg) internog standarda sadržana u 1 mL otopine internog standarda, pipetirane u uzorak (100 mg)

PA-SDFS = površina pikova za SDFS

PA-IS = površina pika internog standarda (D-sorbitol)

m = masa uzorka (m_1 ili m_2) uzorka, čiji je filtrat koncentriran i analiziran na LC-u (g)

3.2.9. Određivanje udjela ciklolinopeptida

Ekstrakcija ciklolinopeptida (CL) je rađena prema modificiranoj metodi od Aladedunye i suradnika (2013). U ovom radu u svrhu detekcije ciklolinopeptida tekućinskom kromatografijom je korištena modificirana metoda iz diplomskog rada Radonić (2018). Modificirani su parametri rada: brzina protoka otapala, temperature kolone, volumen injektiranog uzorka i gradijent protoka otapala u ovisnosti o vremenu (Tablica 4).

3.2.9.1. Priprema uzoraka za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HLPC)

U epruvetu se izvaže 0,1 g mljevenog uzorka, $\pm 0,005$ g i doda se 10 mL metanola. Uzorak se zatim vorteksira 1 minutu i stavi u ultrazvučnu kupelj na temperaturu od $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 1 h. Nakon toga uzorci se centrifugiraju 30 minuta na $4000\text{ } \text{min}^{-1}$. Alikvot supernatanta se propusti kroz 0,45- μm poliviniliden-difluorid (PVDF) filter (Whatman, Buckinghamshire, Velika Britanija) i analizira pomoću HLPC-a.

Tablica 4. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A Acetonitril (%)	Volumni udio otopine B H₂O (%)
0	40.0	60.0
20.00	65.0	35.0
25.00	75.0	25.0
27.00	100	0
50.00	100	0
51.00	40.0	60.0
65.00	45.0	55.0

Ciklolinopeptidi su određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) pomoću Agilent Technologies HPLC serije 1200 s DAD detektorom. Razdvajanje izoliranih

fenolnih spojeva iz pogače lana provedeno je na nepolarnoj koloni Phenomenex (Kinetex 150mm x 4.6mm, 2.6 μm , 100 \AA). Volumen uzorka od 5 μL injektiran je u uređaj. Acetonitril je korišten kao mobilna faza A, dok je voda korištena kao mobilna faza B. Protok otapala bio je 0.4 mL min^{-1} . DAD detektorom snimljeni su kromatogrami pri valnoj duljini od 214 nm. CL_OKSID je identificiran usporedbom vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja čistog standarda. Kvantifikacija pojedinačnih ciklolinopeptida provedena je korištenjem baždarne krivulje pripremljene iz odgovarajuće otopine standarda. Identifikacija ostalih ciklolinopeptida provedena je pomoću smjese komercijalno dostupnih standarda i kvantificirano preko baždarne krivulje za CL_OKSID.

3.2.10. Statistička obrada

Za statističku obradu dobivenih rezultata analize korišteni su programi Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) i Microsoft Excel 2013 (Microsoft, 2013). Faktorska analiza varijance (ANOVA) provedena je kako bi se odredio utjecaj dvije nezavisne varijable (načina i vremena mljevenja) na udio proteina, masnih kiselina, udio topivih i netopivih vlakana kao i udio ciklolinopeptida.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Lan je u posljednjem desetljeću postao izrazito cijenjena uljarica i neizostavan dio u prehrani ljudi zbog svojih brojnih nutritivnih prednosti. U 2009./2010. godini zabilježena je ukupna proizvodnja lanenog sjemena od 2,3 milijuna tona, dok je prema FAO iz 2014. godine zabilježena proizvodnja od 1,173 milijuna tona (Bekhit i sur., 2018). Laneno sjeme se tradicionalno koristi za proizvodnju ulja, no velika pozornost je usmjerena na nusproizvod od lana, lanenu pogaču, koja se uglavnom koristi za ishranu stoke zbog visokog sadržaja proteina, ugljikohidrata i minerala. Nedostatak znanja o upotrebi te prisutnost cijanogenih spojeva su neki od čimbenika zbog kojih lanena pogača nije dovoljno iskorištena. Uklanjanje ulja iz lanene pogače dovodi do povećanja udjela proteina, vlakana i lignana. Pravilno iskorištenje lanene pogače bi dovelo do smanjenja troškova prilikom proizvodnje i bolje zbrinjavanje nusproizvoda. Primjena lanene pogače u prehrambenim proizvodima poput kruha i žitarica može biti dobra polazna točka, budući da su potrošači sve više informirani o prednostima koje donosi ta uljarica.

U ovom radu provedene su analize na sjemenu lana uzgojenom 2018. godine u okolici Dvora na Uni, OPG-u Janković. Parametri kao što su udio vode i hlapljivih tvari te udio ulja i mineralnih tvari su određeni, a primarni cilj ovog rada je bio utvrditi utjecaj kriogenog mljevenja pogače na udio topivih i netopivih vlakana, proteina te udio i sastav masnih kiselina, kao i prisutnost ciklolinopeptida (CL).

4.1. KVALITETA SJEMENA I POGAČE LANA

Nakon provedenih preliminarnih istraživanja provedenih, određeni su osnovni parametri kvalitete sjemena i pogače lana (udio vode, udio ulja i udio mineralnih tvari) koji su prikazani u Tablici 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja za svaki uzorak.

Prema Morrisu (2007), udio vode u sjemenu smeđeg lana uzgojenog na području Kanade je 7,7 %, žute sorte 7,0 % dok prema Bozan i Temelli (2008) iznosi 6,4 % i u skladu je s rezultatima prikazanim u Tablici 4. Nizak udio vode (5,28 %–6,43 %) znači i veću otpornost ispitivanog uzorka jer bi u suprotnom veći sadržaj vode mogao uzrokovati razgradnju masnih kiselina mikrobnim djelovanjem.

Udio ulja u žutoj sorti lana je 43,6 %. Udio ulja u sjemenu je određen metodom po Soxhletu u dva paralelna mjerenja i uzeta je srednja vrijednost koja je niža (33,50 %) u odnosu na udio ulja u spomenutim istraživanjima. Manja variranja u kemijskom sastavu nisu neočekivana s obzirom na zemljopisni položaj u kojem se uzgaja, raznolikost i tlo.

Tablica 5. Osnovni parametri kvalitete sjemena i pogače lana

UZORAK	<i>Udio vode</i> (%)	<i>Udio ulja</i> (%)	<i>Udio mineralnih tvari</i> (%)
<i>Sjeme</i>	7,70	33,50	-
<i>Pogača</i>	10,61	9,23	6,07

U laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, postupkom dvostrukog prešanja na pužnoj preši iz sjemena lana je proizvedeno laneno ulje, a lanena pogača koja je nastala kao nusproizvod se koristila za daljnja istraživanja kojima je glavni cilj bio odrediti osnovne parametre kvalitete. Udio vode u pogači lana iznosi 10,61 % čemu je uzrok dodatak vode prije samog prešanja kako bi se postigla optimalna vlažnost od 9,50 -11 % i postiglo što bolje iskorištenje prešanja. Dobiveni udio mineralnih tvari u pogači je 6,07 % i u skladu je s navedenim istraživanjem (7 %). Udio mineralnih tvari u sjemenu je viši te iznosi 2,4 %, u odnosu na rezultate prikazane u Tablici 5.

Možemo zaključiti da iskorištenje procesa proizvodnje ulja i kvaliteta ispitivanog uzorka u ovom radu zadovoljava kriterije kvalitetnog lanenog sjemena.

4.1.1. Veličina čestica

Raspodjela veličine čestica određena je metodom laserske difrakcije na uređaju Malvern Mastersizer 2000, a prikazana je vrijednostima parametara raspodjele veličine čestica: $d(0,1)$, $d(0,5)$, $d(0,9)$, $D[3,2]$ te je definiran raspon (span) i specifična površina. Analiza je provedena na kontrolnom uzorku pogače lana koji mljevenog na mlinu s diskovima, te na uzorcima koji su mljeveni s krio mlinom pri sobnoj temperaturi (bez uporabe tekućeg dušika) i uzorcima mljevenim krio mlinom uz uporabu tekućeg dušika pri temperaturi od $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Parametri raspodjele veličine čestica (μm) 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 provedeni i prikazani su u diplomskom radu Ivone Kuraice (2019) u kojem je na istim uzorcima pogače

ispitivan utjecaj kriogenog mljevenja sa/bez hlađenja tekućim dušikom na koncentraciju fenola, sterola i antioksidacijsku aktivnost. Za daljnja istraživanja uz kontrolni uzorak, korišteni su oni uzorci tretirani u vremenskom intervalu od 8 i 16 minuta, sa i bez kriogenog hlađenja (Tablica 6).

Tablica 6. Parametri raspodjele veličine čestica (μm) te specifična površina ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) uzoraka mljevenih bez (BH) i uz primjenu kriogenog hlađenja (H), 8 i 16 minuta u odnosu na kontrolni (P) uzorak pogače (Kuraica, 2019)

UZORAK	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)	D [3,2]	Raspon	Specifična površina
P	72,00	241,24	434,20	127,02	1,50	0,019
8 BH	35,00	167,07	383,36	78,62	2,09	0,031
16 BH	25,72	129,66	354,05	61,73	2,53	0,040
8 H	21,48	115,26	287,08	52,79	2,30	0,046
16 H	11,14	59,41	151,02	29,10	2,35	0,084

4.2. SASTAV MASNIH KISELINA

Budući da su masne kiseline neizostavna komponenta u uljima, analiza istih nije zanemarena ni kod lanenog ulja, odnosno lanene pogače. Analiza masnih kiselina provedena je metodom plinske kromatografije, a vrijednosti masnih kiselina detektiranih u uzorku lanene pogače izražene su kao postotak od njihovog ukupnog udjela.

U Tablici 7 je prikazan sastav masnih kiselina u ekstrahiranim masnim frakcijama obične pogače i pogače koja je dodatno usitnjena na vibracionom kriomlinu (uzorci H i BH) sa i bez hlađenja mlina. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja za svaki uzorak.

Esencijalne, polinezasićene masne kiseline kao što su omega-3 i omega-6 su nužne za čovjeka jer ih organizam ne može sintetizirati sam, stoga se unose hranom. Zbog svoje nezasićenosti pomažu u održavanju fleksibilnosti stanične membrane. Bitan je omjer omega-3 i omega-6 masnih kiselina jer višak jedne može utjecati na biološke učinke druge masne kiseline (Morris, 2007). Važan je za uravnoteženu sintezu eikozanoida (derivati arahidonske kiseline) u tijelu. Velika potrošnja biljnih ulja (bogatih omega-6) u odnosu na morsku hranu (bogatu omega-3) utječe na povećanje tog omjera.

Prema istraživanjima, idealan omjer bi bio 2:1 do 4:1 omega-3 i omega-6 (Abedi i Sahari, 2014). Udio ALA u lanenom sjemenu ovisi o načinu proizvodnje, klimatskim promjenama, tlu, vremenu žetve i sorti (Obranović, 2015). Tako biosintezi ALA u lanenom sjemenu odgovaraju hladniji uvjeti, dok uvjeti pri kojima se izvodi mljevenje, u ovom slučaju hlađenje, ne utječu na udio masnih kiselina. Duži vremenski period mljevenja može negativno utjecati na ALA, jer dolazi do oksidacije prilikom oštećenja sjemena a time i do užeglosti (Roozegar i sur., 2014).

Analizom je utvrđeno da u lanenoj pogači dominira omega-3, tj. esencijalna α -linolenska masna kiselina (56 %), što odgovara rasponu prema CODEX ALIMENTARIUS (Codex, 2019), a on iznosi 43,8-70 % od ukupnog udjela masnih kiselina.

Udio esencijalne omega-3 masne kiseline je najveći pri mljevenju u vremenskom intervalu 8 minuta s hlađenjem (57,5 %), što je 0,8 % više od kontrolnog uzorka, a 2 % više od uzorka mljevenog pri 8 minuta bez hlađenja. U istraživanju kojeg su proveli Danish i Nizami (2019) udio ALA je nešto niži (52 %) u odnosu na istraživanje od strane Abedi i Sahari (2014) gdje je udio ALA 58,7 %. Prema Morrisu (2007), sorta smeđeg lana sadrži 58,2 % ALA, a žutog lana 50,9 %. Udio omega-6 (linolna) masne kiseline (11,1 %) tretirane pri 8 minuta sa hlađenje, 0,2

% više u odnosu na kontrolni uzorak. Detektirana je i oleinska masna kiselina u kontrolnom uzorku te iznosi 18,0 %, dok je prema literaturi udio oleinske masne kiseline 9,8-36,0 %, a za linolnu masnu kiselinu on iznosi 8,3-30,0 % od ukupnog udjela masnih kiselina i u skladu je s dobivenim rezultatima.

Udio palmitinske kiseline (C16:0) je približno isti (6,5 %) kod svih ispitanih uzoraka, 1,5 % viši u odnosu na istraživanje kojeg su proveli Bernacchia i suradnici (2014) (5 %). Mononezasićena heptadekanska (margarinska) kiselina (C17:1) nije detektirana u uzorcima bez i sa hlađenjem tekućim dušikom, osim u kontrolnom uzorku pogače sa 0,1 %.

Sadržaj masnih kiselina kao i omjer između nezasićene i zasićene masne kiseline važan su parametar za određivanje nutritivne vrijednosti određenog ulja. Stoga je najnoviji trend u prehrambenoj industriji odrediti sastav jestivih ulja i drugih prehrambenih proizvoda za sadržaj svake pojedine masne kiseline. Rezultati su pokazali da suncokretovo ulje, ulje šafranike i laneno ulje sadrže najveći postotak dugolančanih mono i polinezasićenih masnih kiselina u usporedbi sa sadržajem ukupnih zasićenih masnih kiselina u lanenom ulju (9,6 %), suncokretovom ulju (8,8 %) i ulju šafranike (7,2 %) (Kostik i su., 2013).

Guimarães i suradnici (2013) su analizirali razliku između ulja sezama i lana. Zbroj zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina je bio veći u odnosu na laneno ulje. Zbroj zasićenih masnih kiselina u ulju lana iznosi 10,8 %, a kod sezama 36,4 %.

No, zbroj MUFA i PUFA kod lanenog ulja je bio veći nego kod ulja sezama. To pokazuje da je laneno ulje dobar izvor masnih kiselina s kardioprotektivnim svojstvima (Guimarães i sur., 2013). Morris (2007) navodi razliku u udjelu masnih kiselina između sorte smeđeg i žutog lana. Udio zasićenih masnih kiselina kod smeđeg lana je iznosio 8,7 % a kod žutog 9,0 %. Tako je 18,0 %, odnosno 23,5 % MUFA zabilježeno kod smeđeg, tj. žutog lana, što odgovara rezultatima navedenim u Tablici 7. Ako se uspoređi ukupan zbroj mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina u odnosu na suncokretovo ulje (31,5 %), laneno i ulje šafranike imaju manji udio MUFA (18,3 % i 16,6 %). No, veći udio PUFA (69,6 %) ima laneno u odnosu na suncokretovo ulje i to za 10,1 %, gdje je za suncokretovo prema Kostiku i suradnicima (2013) zabilježen postotak od 59,5.

Pravilno skladištenje lanenog ulja je bitno kako ne bi došlo do procesa oksidacije kojem su polinezasićene masne kiseline najviše podložne, jer dolazi do stvaranja slobodnih radikala, a time i do narušavanja nutritivne vrijednosti i gubitka funkcionalnih svojstava lanenog ulja.

Udio trans masne kiseline C18:2t (moguće nastale pod utjecajem povišene temperature prilikom prešanja) je 0,8 % od ukupnih masnih kiselina i ne mijenja se tijekom mljevenja sa i bez hlađenja. Nizak udio istih je poželjan jer negativno utječu na ljudski organizam i ubrzavaju degeneraciju stanica.

Tablica 7. Sastav masnih kiselina kontrolnog uzorka pogače ($p \leq 0,05$) te pogača mljevenih sa i bez hlađenja (8 i 16 minuta)

Masna kiselina (% od ukupnih)	UZORAK				
	P	8 min BH	16 min BH	8 min H	16 min H
C14:0 ‡	ND*	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C16:0	6,4 ± 0,1	6,5 ± 0,2	6,5 ± 0,1	6,5 ± 0,0	6,7 ± 0,1
C16:1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C17:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C17:1	0,1 ± 0,0	ND*	ND*	ND*	ND*
C18:0 ‡	3,6 ± 0,0	3,5 ± 0,0	3,7 ± 0,0	3,7 ± 0,0	3,5 ± 0,0
C18:1n9	18,0 ± 0,2	17,6 ± 0,2	18,2 ± 0,2	18,3 ± 0,0	18,0 ± 0,2
C18:2t	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0
C18:2c	10,9 ± 0,1	10,7 ± 0,2	11,0 ± 0,1	11,1 ± 0,0	10,9 ± 0,2
C18:3n6	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1
C18:3n3	56,7 ± 0,6	55,5 ± 0,5	57,2 ± 0,5	57,5 ± 0,1	56,2 ± 0,7
C20:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C20:1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C22:0 ‡	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C24:0 ‡	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
∑ zasićene	10,5	10,3	10,8	10,8	10,7
∑ mononezasićene	18,3	17,8	18,4	18,5	18,2
∑ polinezasićene	68,7	67,4	69,3	69,6	68,2
ω6/ω3	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
n.i. **	2,5 ± 1,1	4,5 ± 1,1	1,7 ± 0,9	1,1 ± 0,0	2,8 ± 1,1

ND- nije detektirano; *definirano kao $\leq 0,05$ % ; **neidentificirane masne kiseline

‡ Način mljevenja ima statistički značajan utjecaj na udio masnih kiselina ($p \leq 0,05$)

Statističkom obradom, način mljevenja je pokazao značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) na udio miristinske (C14:0), stearinske (C18:0), behenijske (C22:0) i lignocerinske masne kiseline (C24:0). U kontrolnom uzorku pogače, zasićena miristinska kiselina (C14:0) nije detektirana, no u ostalim uzorcima tretiranim bez i sa hlađenjem tekućim dušikom, ona iznosi 0,1 %, za polovicu više nego u istraživanju kojeg su proveli (Zambiasi i sur., 2007) (0,05 %).

Neke studije su izvijestile o različitim učincima zasićenih masnih kiselina na ljudsko zdravlje. Zaključeno je da laurinska kiselina (C12:0) kao i miristinska kiselina (C14:0) povećavaju koncentraciju ukupnog kolesterola u plazmi, prva zbog povećanja LDL kolesterola, druga zbog porasta koncentracije LDL i HDL kolesterola (Orsavova i sur., 2015). Stearinska masna kiselina je u najvećem udjelu identificirana kod uzorka pogače tretirane 16 minuta bez hlađenja (3,7 %), a prema literaturi iznosi 3,03 %. Udio behenske masne kiseline se s vremenom i načinom mljevenja u odnosu na kontrolni uzorak pogače lana smanjio za 0,2 %, dok u prethodno navedenom istraživanju nije detektirana. Kao statistički značajna se pokazala i lignocerinska masna kiselina (C24:0). Temperatura i različito vrijeme mljevenja u kriomlinu nije utjecalo na promjenu u udjelu iste, a on iznosi 0,1 %. U znanstvenom radu (Dubois i sur., 2007) lignocerinska kiselina nije identificirana.

U uzorcima je prikazan omjer omega-6 i omega-3 od 0,2:1 i nije se mijenjao tijekom povećanja vremenskog intervala ili promjene temperaturnih uvjeta. Udio je bio nešto niži usporedno s literaturom koja navodi prosjek od 0,3 od ukupnog udjela (Dubois i sur., 2007).

Zbog kroničnog deficita omega-3 masne kiseline u prehrani ljudi, dodatak lanenog ulja može znatno utjecati na povećanje ravnoteže ka preporučenom unosu te samim time utjecati na poboljšanje zdravlja. Također može biti alternativno rješenje za one populacije koje su koncentrirane u regijama diljem svijeta gdje nema velikog pristupa morskoj hrani, koja je najbolji izvor omega-3 masne kiseline.

4.3. UDIO TOPIVIH I NETOPIVIH VLAKANA

Vlakna (vrijednosti za lan) su definirana kao mješavina polimernih ne-škrobnih polisaharida kao što su celuloza (71,2 %), hemiceluloza (18,6 %), pektin (2,0 %) i lignin (2,2 %). Prirodna vlakna su biljnog, životinjskog ili mineralnog podrijetla. Biljna vlakna, kao što i sam naziv implicira su klasificirana prema izvoru u biljkama: ona koja se nazale u stabljici, lišću i sjemenu biljke. Dijetalna vlakna (DF) također se mogu podijeliti prema topivosti u vodi kao topiva dijetalna vlakna (SDF) i netopiva dijetalna vlakna (IDF). Lignin, celuloza i neke hemiceluloze obično čine glavninu IDF-a, dok pektin, inulin, β -glukani, galaktomanani, gume i drugi ne-škrobni polisaharidi čine SDF.

Različiti uvjeti ekstrakcije utječu na karakteristike dobivenih vlakana. Mljevenjem lanenog sjemena se povećava dostupnost hranjivih tvari (Roozegar i sur., 2014). No, mehanička primjena kao što je mljevenje utječe na vlaknastu mrežu, izlažući hidroksilne skupine, čime se povećava kapacitet zadržavanja vode vlakana i povećava površina, a time se povećava prinos vlakana nakon ekstrakcije. Međutim, prekomjerno mljevenje dovodi do smanjene sposobnosti zadržavanja vode. Mehanička primjena također utječe na veličinu čestica dobivenih vlakana. Što je veličina čestica manja, to je veći kapacitet vezanja masti (Maphosa i Jideani, 2015).

Prema Shim i suradnicima (2014), topiva vlakna (velike i male molekulske mase), također poznata kao sluz, se lako ekstrahiraju s vrućom i teže s hladnom vodom. S druge strane, pomažu u održavanju razine glukoze u krvi i snižavanju razine kolesterola u krvi.

Udio vlakana ovisi i o sorti lana. U istraživanju na lanenoj pogači kojeg su proveli Bell i Keith (1993) dokazano je da je udio vlakana veći kod smeđe (29 %) u odnosu na žutu sortu lana (24 %). Proučavajući razliku nutritivnih komponenti kod soje i zelenog graška, otkriveno je da sjeme soje sadrži 15,6 %, a zeleni grašak 6,3 % prehrambenih vlakana.

Cilj ovog rada bio je istražiti da li mljevenje uz hlađenje tekućim dušikom i različiti vremenski intervali mljevenja provedeni na lanenoj pogači imaju utjecaj na promjenu u udjelu i sastavu prehrambenih vlakana.

Tablica 8. Udio topivih i netopivih vlakana u pogači lana [‡]

UZORAK	IDF (g 100 g uzorka⁻¹)	SDFP (g 100 g uzorka⁻¹)	SDFS (g 100 g uzorka⁻¹)	TDF (g 100 g uzorka⁻¹)
P	29,47 ± 2,26	5,73 ± 4,08	1,25 ± 0,87	36,46 ± 6,01
8 BH	31,48 ± 1,70	5,51 ± 2,58	2,55 ± 1,86	39,55 ± 1,40
16 BH	26,93 ± 0,26	7,60 ± 0,35	0,10 ± 0,01	35,53 ± 0,08
8 H	22,01 ± 4,10	5,35 ± 1,28	1,91 ± 0,90	29,28 ± 4,27
16 H	21,75 ± 14,09	1,88 ± 1,26	1,21 ± 0,63	24,76 ± 1,97

[‡] Utjecaj mljevenja nema statistički značajan učinak na udio topivih i netopivih vlakana ($p > 0,05$)

IDF- netopiva dijetalna vlakna

SDFP- topiva dijetalna vlakna velike molekulske mase

SDFS- topiva dijetalna vlakna male molekulske mase

TDF- ukupna dijetalna vlakna

Utjecaj kriomljevenja, vrijeme trajanja procesa kao i njihova međusobna interakcija nisu imali statistički značajni učinak ($p < 0,05$) na ukupnu količinu (TDF) vlakana pogače (Tablica 8). U istraživanju provedenom na sjemenu lana, Tarpila i suradnici (2005) navode kako je udio netopivih vlakana iznosio 33,2 %, a udio topivih 11,0 %. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je smanjenje udjela i topivih i netopivih vlakana u odnosu na spomenuto istraživanje manje zbog djelovanja mehaničke sile (dužeg vremenskog perioda mljevenja) i oštećenja strukture vlakana. Udio topivih vlakana velike molekulske mase (SDFP) u uzorku tretiranom pri 16 minuta sa hlađenjem je niži u odnosu na kontrolni za 3,78 %, a to se također može pripisati degradaciji strukture vlakana. Mljevenjem uzoraka do 16 minuta bez hlađenja, udio topivih vlakana velike molekulske mase u odnosu na kontrolni se povećao. Rezultati su u skladu sa istraživanjima koje su proveli Bernacchia i suradnici (2014), gdje je udio topivih vlakana bio u rasponu 4,3-8,6 %, a netopivih 12,8-17,1 %. Zbog svoje otpornosti na vlačna opterećenja, topiva vlakna ostaju stabilna unutar frakcije i zbog toga se mogu detektirati.

SDFS (topiva vlakna male molekulske mase) su detektirana na HPLC-u u manjoj količini u odnosu na ona velike molekulske mase. Ako usporedimo sve uzorke sa i bez hlađenja u odnosu na kontrolni uzorak, možemo primjetiti kako se udio topivih vlakana male molekulske mase tretiranog pri 8 minuta bez i 8 minuta sa hlađenjem povećao za 1,3 % odnosno 0,6 %. No, udio SDFS u uzorcima mljevenim u dužem vremenskom periodu od 16 minuta bez i 16 minuta sa hlađenjem u odnosu na kontrolni je manji za 1,15 % i 0,04 %. Povećanje udjela se može pripisati pucanju stanične stijenke i oslobađanju vlakana, dok se dužim mljevenjem molekula vlakana degradirala.

Nekoliko autora je u svojim znanstvenim radovima objavilo da kriogeno mljevenje prednjači pri konvencionalnom mljevenju u smislu zadržavanja hlapljivih sastojaka i aroma, boje i raspodjele veličine čestica konačnog pudera (Karam i sur., 2016).

Iako su rezultati istraživanja u ovom radu pokazali određene promjene tijekom kriogenog mljevenja pri različitim vremenskim intervalima, što se može vidjeti iz Tablice 8, statističkom obradom je utvrđeno da ovakav način mljevenja pogače lana nije pokazao značajan učinak na udio topivih i netopivih vlakana. Premda dovoljno neistražena, pogača lana koja sadrži nutritivne komponente i kao takva predstavlja visoko kvalitetan nusproizvod lanenog ulja, postaje sve češćom temom znanstvenih radova usmjerenih na utjecaj prehrambenih vlakana na zdravlje čovjeka, ponajprije na konstipaciju, snižavanje razine kolesterola i dr.

4.4. UDIO PROTEINA I MINERALNIH TVARI

Zbog svojih funkcionalnih osobina i zdravstvenih prednosti, proteini predstavljaju bitnu komponentu u sjemenu lana. Moguće sinergističko djelovanje sa drugim bioaktivnim komponentama lana poput vlakana i lignana, mogu povećati vrijednost lanene pogače kao nusproizvoda (Rabetafika i sur., 2011).

Obradom lanenog sjemena se udio proteina povećava, a udio ulja smanjuje. Morris (2007) navodi kako je udio proteina u mljevenom sjemenu 26 %, a pepela 3,4 %. Smanjenje veličine čestica tijekom kriogenog mljevenja uzoraka je znatno utjecalo na udio proteina.

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 9 udio detektiranih proteina u kontrolnom uzorku pogače iznosi 11,85 %. Hlađenjem uzorka pri 16 minuta, taj se udio povećao za 6,76 %. Prema Rabetafika i suradnicima (2011), udio proteina u pogači lana je u rasponu od 20-25 % i u skladu je s uzorkom tretiranim pri sobnoj temperaturi na 8 minuta (20,15 %). Možemo zaključiti kako usitnjavanje uzorka tj. smanjenje veličine čestica rezultira povećanjem broja proteina. Mikroniziranje čestica može utjecati i na povećanje broja mineralnih tvari. To se vidi u razlici između kontrolnog uzorka, uzorka 8 BH, 16 BH i 16 H te je zabilježeno povećanje za 1,5 %, 10,02 % i 9,88 %. Prilikom kriogenog hlađenja uzorka na 8 minuta, udio mineralnih tvari je ispod razine detekcije, a to može biti rezultat greške prilikom mjerenja, odnosno različite preciznosti uređaja ili uvjeta mjerenja.

Prema Mazza (2002) udio proteina u odmašćenoj lanenoj pogači je bio 42,2 %, a udio mineralnih tvari je 7,42 %, manji za 3,15 % u odnosu na vrijednost kontrolnog uzorka. Razlog smanjenja udjela u odnosu na navedena istraživanja može biti i moguć zaostatak ulja u pogači lana kao i temperatura pri procesu kriogenog mljevenja.

Treba uzeti u obzir i genetičke i okolišne čimbenike koji imaju značajan učinak na varijabilnost proteina. Iako se proteini iz lanene pogače koriste isključivo kao izvor energije u životinjskoj prehrani, zbog velike dostupnosti bi se mogli uvrstiti i u prehranu ljudi jer su istraživanja pokazala brojne zdravstvene pogodnosti vezane za proteine izolirane iz lanenog sjemena.

Unatoč tome što rezultati iz ovog rada ne prikazuju statistički značajan utjecaj načina krio mljevenja sa i bez hlađenja tekućim dušikom, Mazza (2002) u svom znanstvenom radu naglašava nekoliko prednosti sinergističkog djelovanja proteina i vlakana iz lanenog sjemena. Iako je poznato da lanena sluz smanjuje razinu glukoze u krvi, malo je vjerojatno da samo ona ima takav učinak. Pretpostavlja se da bjelančevine lana mogu utjecati na razinu glukoze u krvi

na dva načina. Prvo, protein u sjemenu lana stimulira izlučivanje inzulina, što može dovesti do smanjenog glikemijskog odgovora. Nadalje, proteini mogu biti važni u određivanju glikemijskog odgovora hrane zbog njegove interakcije s polisaharidima. Lignani su također poznati po tome što imaju jaka svojstva vezanja proteina, što može ukazivati na djelomični kemopreventivni učinak proteina lanenog sjemena u kombinaciji s ligninima. Također se mogu uvrstiti u neke prehrambene proizvode koji se koriste za snižavanje tjelesne mase ili pak u hranu za novorođenčad.

Tablica 9. Udio proteina i mineralnih tvari u pogači lana

<i>UZORAK</i>	<i>Udio proteina (%)</i> *	<i>Udio mineralnih tvari (%)</i> *
<i>P</i> ‡	11,85 ± 7,36	10,57 ± 14,17
<i>8 BH</i> ‡	20,15 ± 7,40	12,07 ± 12,20
<i>16 BH</i> ‡	11,35 ± 8,03	20,59 ± 14,56
<i>8 H</i> ‡	17,30 ± 10,86	ND
<i>16 H</i> ‡	18,61 ± 6,27	20,45 ± 27,93

ND- nije detektirano

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija dvaju paralelnih određivanja za svaki uzorak

‡Način mljevenja nema statistički značajan utjecaj na udio proteina i mineralnih tvari ($p > 0,05$)

4.5. UDIO CIKLOLINOPEPTIDA (CL)

Provedenom referentnom metodom uz pomoć ultrazvučne kupelji, iz pogače lana (tretirane bez i sa hlađenjem tekućim dušikom) su detektirani ciklolinopeptidi prikazani u Tablici 10. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija dva paralelna određivanja za svaki uzorak. Statističkom obradom je utvrđeno da je vrijeme mljevenja svih uzoraka te interakcija mljevenja i hlađenja sa i bez primjene tekućeg dušika imalo značajan utjecaj na udio ciklolinopeptida navedenih u Tablici 10.

CL se mogu podijeliti u 3 grupe ovisno o njihovim svojstvima i promjenama u količini tijekom skladištenja:

1. Grupa I. (CL_B, CL_J, CL_L, CL_M i CL_K) čija se količina obično smanjuje u ulju tijekom vremena;
2. Grupa II. (CL_C, CL_D, CL_E, CL_F i CL_G) i njihova količina se obično povećava tijekom vremena;
3. Grupa III. (CL_A, CL_H, CL_I i CL_N) čija količina ostaje nepromijenjena tijekom skladištenja (Aladedunye i sur., 2012).

Tablica 10. Udio ciklolinopeptida u pogači lana

UZORAK	CL_A ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CL_B ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CL_E ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CL_OKSID ($\mu\text{g g}^{-1}$)
P[‡]	2076,25 \pm 5,24	788,80 \pm 2,91	737,76 \pm 5,24	362,39 \pm 0,58
8 BH[‡]	1989,82 \pm 14,55	744,76 \pm 5,82	565,71 \pm 9,90	ND
16 BH[‡]	1793,08 \pm 2,91	671,90 \pm 0,58	494,51 \pm 1,16	ND
8 H[‡]	2067,20 \pm 9,90	753,81 \pm 18,63	597,41 \pm 27,94	331,93 \pm 1,75
16 H[‡]	2089,01 \pm 1,16	770,69 \pm 0,58	607,29 \pm 15,13	366,92 \pm 2,33

ND- nije detektirano

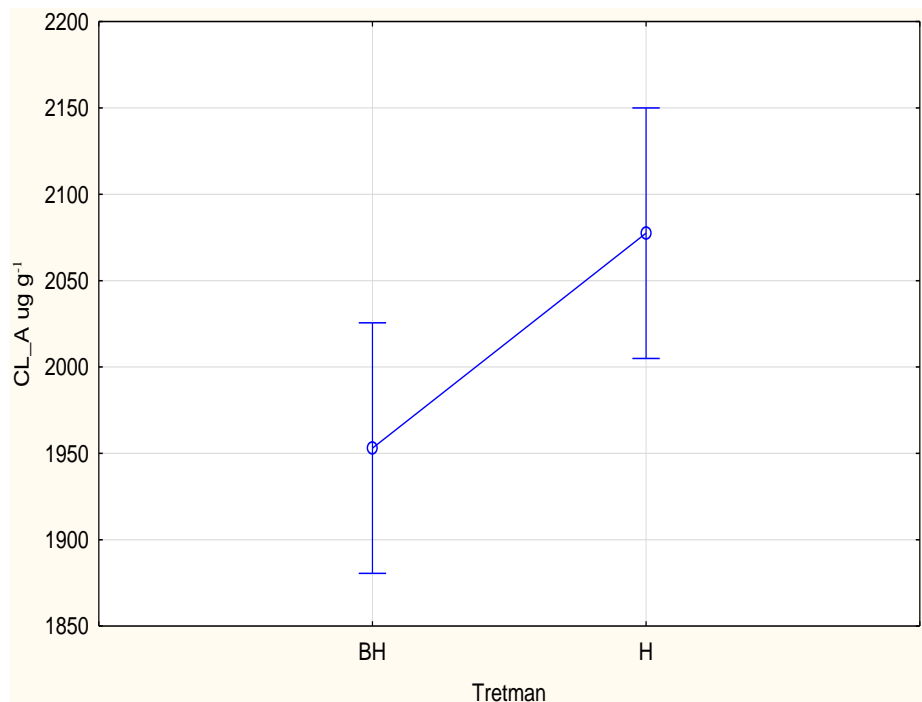
[‡] način mljevenja ima statistički značajan utjecaj na udio svih ciklolinopeptida ($p \leq 0,05$)

Metode ekstrakcije ciklolinopeptida se i dalje usavršavaju kao i njihova detekcija putem, pretežno, tekućinske kromatografije. Njihov udio u lanu (kao i u pogači i ulju) važan je pokazatelj nutritivnih vrijednosti kao i oksidacijskih promjena.

Također, treba uzeti u obzir da načini prerade i uvjeti skladištenja lanenog sjemena i ulja utječu na njegova fizikalno-kemijska svojstva. Svojstva ulja u sjemenu lana koje nije mehanički tretirano su stabilna i do godinu dana, neovisno o tome da li se koristi kao hrana za stoku (pogača) ili u ljudskoj prehrani. Rok trajanja lanenog ulja dobivenog postupkom hladnog prešanja je 3-6 mjeseci u zatvorenim bocama, a već nakon 1 dana skladištenja, ulje poprima gorak okus. Razlog tome je stvaranje cikličkog oktapeptida (CL_OKSID) koji sadrži aminokiselinu metionin (oksidirana) (Brühl i sur., 2008).

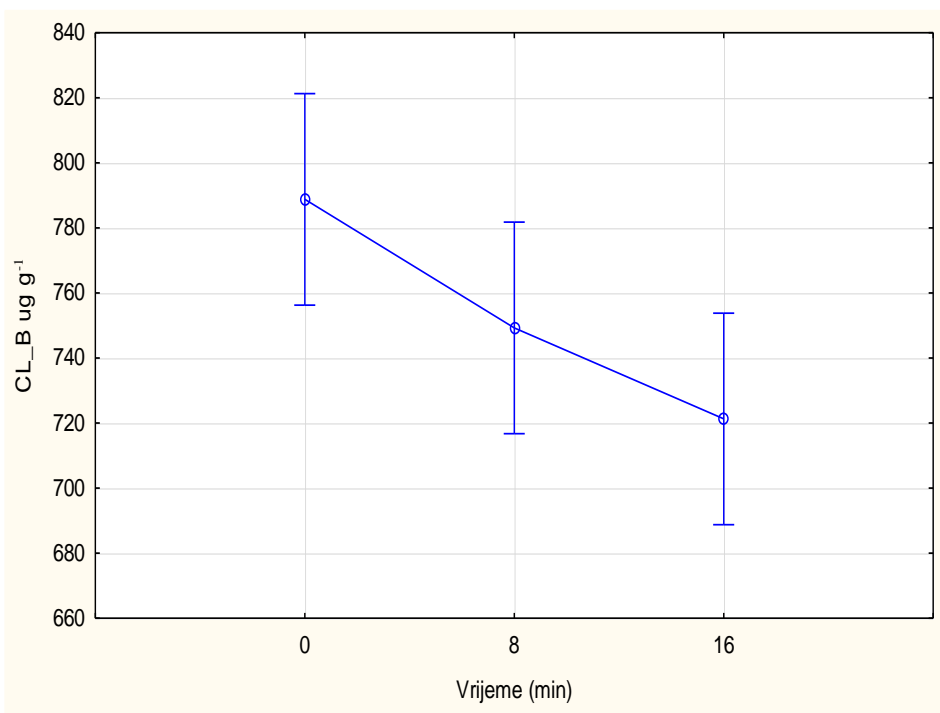
Oksidacijska stabilnost ciklolinopeptida procijenjena je i tijekom skladištenja ulja od lanenog sjemena i pogače. Opaženi su CL_E, CL_C i CL_M. Ciklolinopeptidi s dvije metioninske jedinice, CL_L i CL_M su pokazali najveće smanjenje, praćeno CL_J i CL_B, biološki aktivnim ciklolinopeptidom. Na kraju perioda skladištenja, količina oksidiranog CL_E se povećala četverostruko u ulju, dok su imunosupresivni ciklolinopeptidi A ostali nepromijenjeni (Aladedunye i sur., 2012). Gui i suradnici (2012) u svom istraživanju navode kako je koncentracija ciklolinopeptida bila veća u lanenom ulju netom nakon prešanja nego u lanenoj pogači. No, srednja vrijednost ukupnih CL u istraživanju koje su proveli Zou i suradnici (2017) bila je veća od vrijednosti koju su pronašli. Gui i suradnici (2012). Oni navode promjenu u udjelu ciklolinopeptida koji se proučavao na 13 različitih kineskih kultivara lanenog ulja. Postojale su značajne razlike ($p \leq 0,05$) u sadržaju pojedinačnih i ukupnih ciklolinopeptida u ispitivanim uljima. Ukupni sadržaj CL među tim uzorcima varirao je od 273 do 434 $\mu\text{g/g}^{-1}$, a CL_B i CL_A i CL_E predstavljali su najveći dio ukupnih CL u svim lanenim uljima, u rasponu od 55,6 do 84,3% ukupnih ciklolinopeptida.

Statističkom analizom je utvrđen značajan utjecaj načina tretmana (bez i s primjenom hlađenja) uz pomoć kriomlina na udio CL_A ($p \leq 0,05$). Iz dobivenih rezultata možemo primjetiti kako se udio CL_A tretiranog pri sobnoj temperaturi 16 minuta smanjio za 283,17 $\mu\text{g g}^{-1}$ u odnosu na kontrolni uzorak. Suprotno tome, u uzorku tretiranom pri 16 minuta s hlađenjem je zabilježena najveća količina CL_A (2089,01 $\mu\text{g g}^{-1}$). To potvrđuje činjenicu kako mljevenje uzoraka na nižim temperaturama u interakciji s dužim mehaničkim tretmanom ne utječe na narušavanje ranije spomenute stabilnosti ciklolinopeptida A. To je i dokazala provedena faktorska analiza varijance ovisnosti udjela CL_A o vrsti tretmana – bez (BH) i s primjenom hlađenja (H) (Slika 6).



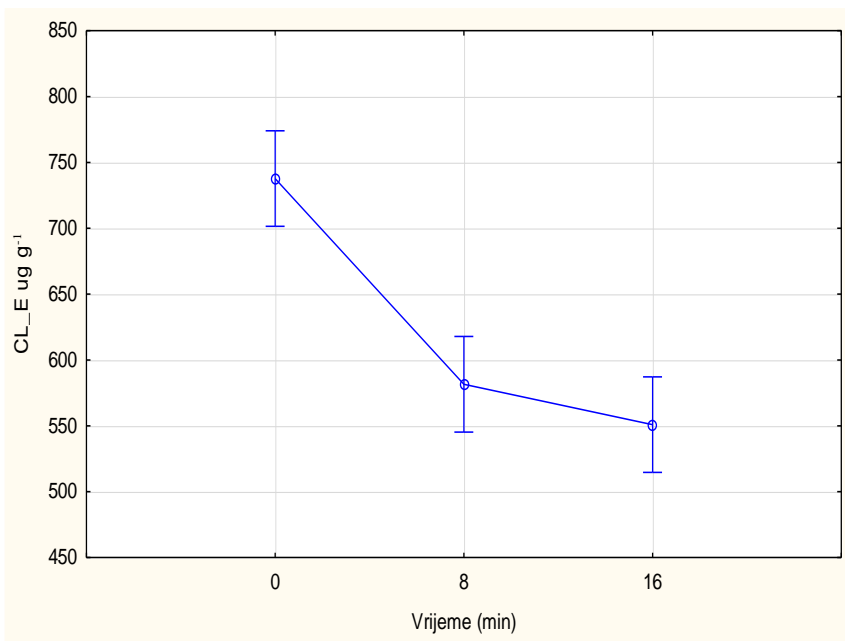
Slika 6. Faktorska analiza varijance ovisnosti udjela CL_A o vrsti tretmana – bez (BH) i s primjenom hlađenja (H) ($p \leq 0,05$)

Benedetti i Pedone (2005) zaključili su da fleksibilnost peptidne strukture igra važnu ulogu u biološkoj funkciji ciklolinopeptida A. Kasnije je konformacija CL_A u otopini proučavana i uz pomoć CD i NMR spektroskopije. Spomenuta istraživanja su ukazala na strukturnu sličnost CLA i antamanida, cikličkog dekapeptida, te je zaključeno da je CL_A mnogo fleksibilnija i stabilnija u otopini za razliku od antamanida (Picur i sur., 2006).



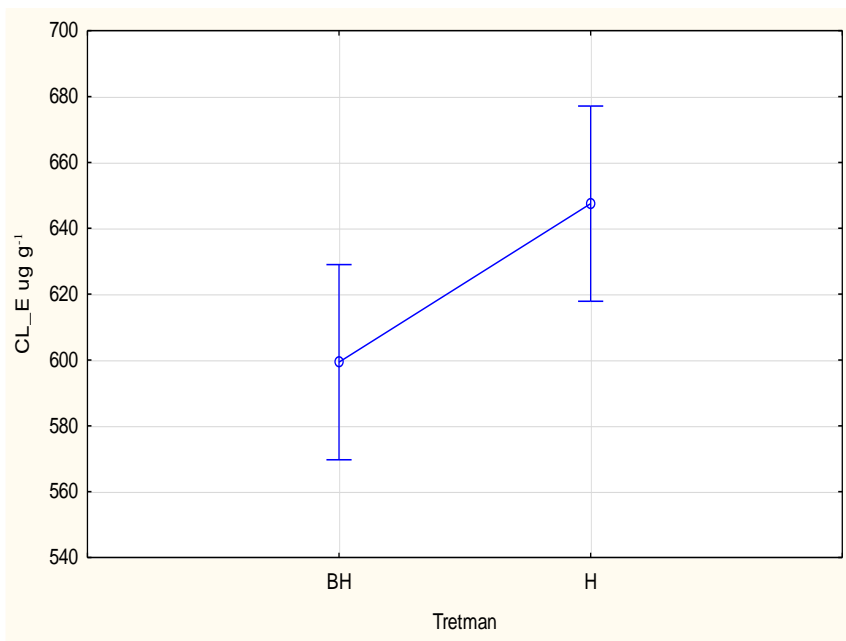
Slika 7. Faktorska analiza varijance ovisnosti udjela CL_B o vremenu mljevenja ($p \leq 0,05$)

Rezultati u ovom radu pokazuju prisutnost ciklolinopeptida B u uzorcima, dok u istraživanju provedenom od strane Gui i suradnika (2012), ciklolinopeptid B nije detektiran u nijednom uzorku. Osjetljivost ciklolinopeptida na oksidacijsku degradaciju se povezuje s prisutnošću i brojem metioninskih ostataka u ciklopeptidnoj strukturi, te možemo zaključiti da je razlog oksidacija metionina u metionin sulfoksid. Faktorska analiza varijance također je pokazala statistički značajnu ovisnost udjela ukupnih CL_B o vremenu mljevenja (Slika 7). Vidljivo je kako koncentracija ukupnih CL_B značajno smanjuje s produljenjem mehaničkog djelovanja te najmanju vrijednost dostiže nakon 16 minuta mljevenja (BH) u odnosu na kontrolni uzorak (smanjenje za $116,9 \mu\text{g g}^{-1}$). Sposobnost ekstrakcije ciklolinopeptida u većim količinama omogućila bi bolje iskorištavanje tih molekula te prehrambenoj i farmaceutskoj industriji osigurala proizvode s dodanom vrijednošću (Gui i sur., 2012).



Slika 8. Faktorska analiza varijance ovisnosti udjela CL_E o vremenu mljevenja ($p \leq 0,05$)

Najveći udio CL_E (Pro-Leu-Phe-Ile-MeSO-Leu-Val-Phe) je detektiran u kontrolnom uzorku pogače ($737,76 \mu\text{g g}^{-1}$). Ako usporedimo kontrolni uzorak pogače lana sa uzorkom koji je mljeven 8 i 16 minuta pri sobnoj temperaturi, vidimo da dolazi do smanjenja udjela za 172,05 i 243,25 $\mu\text{g g}^{-1}$. U skladu s navedenim, faktorska analiza varijance također je pokazala statistički značajnu ovisnost udjela CL_E o vremenu mljevenja (Slika 8). Vidljivo je kako udio CL_E značajno pada s produljenjem mehaničkog djelovanja te najmanju vrijednost dostiže nakon 16 minuta mljevenja.



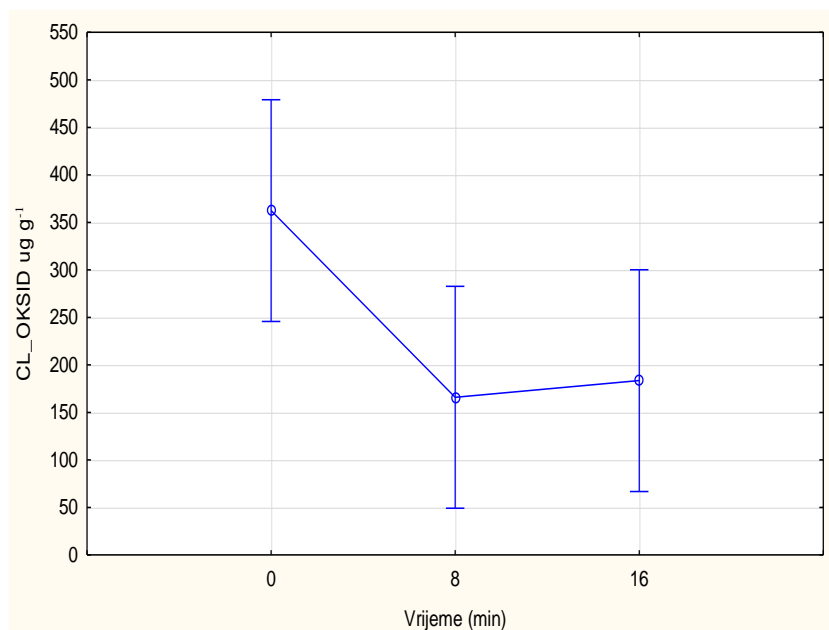
Slika 9. Faktorska analiza varijance ovisnosti udjela CL_E o vrsti tretmana – bez (BH) i s primjenom hlađenja (H) ($p \leq 0,05$)

Ako uzmemo u obzir način tretmana (bez i sa hlađenjem tekućim dušikom) mljevenja uzorka, možemo primjetiti znatan porast u udjelu CL_E. Interakcija vremena i temperature kojoj su uzorci bili podvrgnuti uvelike utječe na povećanje istog. To se vidi ukoliko usporedimo uzorak tretiran 16 minuta pri sobnoj temperaturi i onaj tretiran 16 minuta uz primjenu tekućeg dušika. Zabilježen je porast za $112,78 \mu\text{g g}^{-1}$. Budući da je CL_E zaslužan za gorak okus lanenog ulja, (podložan procesu oksidacije), možemo zaključiti da je pod utjecajem niskih temperatura, odnosno primjenom hlađenja sa tekućim dušikom, došlo do usporavanja oksidacijskog procesa. U skladu s navedenim, faktorska analiza varijance pokazala je statistički značajnu ovisnost udjela CL_E o načinu mljevenja (Slika 9).

No, potrebna su daljnja istraživanja za potvrdu spomenutog utjecaja sorte i vanjskih čimbenika na gorčinu hladno prešanog lanenog ulja. Također je bilo naznaka da gorak okus lanenog ulja ne ovisi samo o udjelu CL_E. Neke sorte pokazale su stabilan sadržaj CL_E s povećanjem gorčine. U tom slučaju potrebno je dodatno ispitivanje gorkih spojeva i identifikacija dodatnih tvari s gorkim okusom (Brühl i sur., 2008).

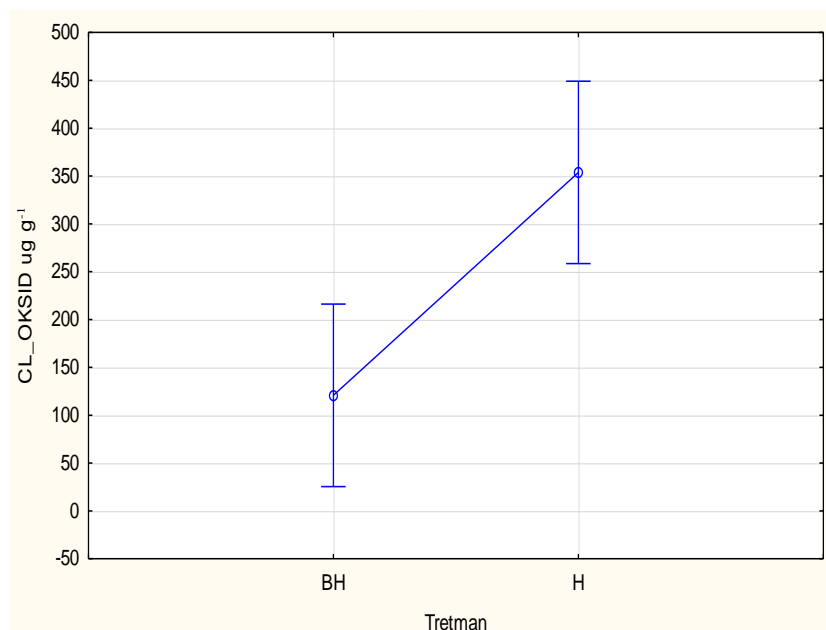
S obzirom da je CL_E nestabilan i relativno brzo prelazi u oksidirane oblike (CL_OKSID), prema rezultatima prikazanim u Tablici 10, u odnosu na kontrolni uzorak i vrijeme korištenog tretmana, CL_OKSID (8 min H) se smanjio za $30,46 \mu\text{g g}^{-1}$. Usporedbe radi, razlika između

CL_E (kontrolni uzorak) i CL_OKSID (kontrolni uzorak) je $375,37 \mu\text{g g}^{-1}$. To možemo pripisati mikroniziranju čestica uzoraka dužim trajanjem mljevenja i utjecaju mehaničkih sila. Navedeni rezultati su dokazani faktorskom analizom varijance ovisnosti udjela CL_OKSID o vremenu mljevenja (8 i 16 min) (Slika 10).



Slika 10. Faktorska analiza varijance ovisnosti udjela CL_OKSID o vremenu mljevenja ($p \leq 0,05$)

Ukoliko obratimo pažnju na oscilacije količine CL_OKSID s obzirom na promjene u temperaturnom rasponu, zaključujemo da u odnosu na kontrolni uzorak ($362,39 \mu\text{g g}^{-1}$) primjenom nižih temperatura dolazi do rasta CL_OKSID (16 H) za $36,33 \mu\text{g g}^{-1}$. S druge strane, uzorci tretirani pri sobnoj temperaturi (8 BH i 16 BH) nisu identificirani, a to se može pripisati zagrijavanju istih. Iz svega navedenog, faktorska analiza varijance ovisnosti udjela CL_OKSID o vrsti tretmana – bez (BH) i s primjenom hlađenja (H) dokazuje kako se uz kriogeno mljevenje, bez obzira na njihovu nestabilnost, pri sniženim temperaturama mogu detektirati i oksidirani ciklolinopeptidi jer hladniji uvjeti usporavaju proces oksidacije (Slika 11).



Slika 11. Faktorska analiza varijance ovisnosti udjela CL_OKSID o vrsti tretmana – bez (BH) i s primjenom hlađenja (H) ($p \leq 0,05$)

U ovom diplomskom radu je prikazano da krio mljevenje sa/bez upotrebe tekućeg dušika nema značajan utjecaj na udio topivih i netopivih vlakana kao i na razliku u sastavu masnih kiselina. Dokazan je povećan udio ALA masne kiseline i utvrđena pretpostavka kako se laneno ulje treba implementirati u prehranu ljudi radi pozitivnog učinka na zdravlje. Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu, mljevenje krio mlinom je pokazalo veliki učinak na udio ciklinopeptida i njihovo smanjivanje prilikom povećanja vremena i promjene pri sobnoj temperaturi u odnosu na hlađenje tijekom mljevenja. To ukazuje na činjenicu da su ciklinopeptidi indikatori oksidacije i kao takve ih je teško detektirati i kvantificirati u pogači lana. S obzirom da je ovo prvo istraživanje koje se osvrće na prisutnost i ponašanje ciklinopeptida prilikom ovakvog načina mljevenja, a prehrambena i farmaceutska industrija pokazuju veliki interes za iste, to daje dovoljno prostora za daljnja istraživanja i moguću primjenu lanene pogače kao nusproizvoda u svrhu povećanja nutritivne vrijednosti proizvoda.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja te dobivenih rezultata i rasprave, došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Utvrđeno je da način mljevenja ima statistički značajan utjecaj na udio stearinske masne kiseline (povećan udio pri 16 minuta bez hlađenja) te manje zastupljene zasićene masne kiseline – miristinske (0,1 % više u odnosu na kontrolni uzorak), behenske (smanjenje udjela s vremenom i načinom mljevenja u odnosu na kontrolni) i lignocerinske (male varijacije u udjelima između uzoraka).
2. Istraživanjem je utvrđeno da u lanenoj pogači dominira ALA (esencijalna omega-3 masna kiselina), u uzorku tretiranom pri 8 minuta s hladnjem tekućim dušikom.
3. Mljevenje nije imalo statistički značajni učinak ($p > 0,05$) na ukupnu količinu topivih i netopivih vlakana pogače, kao ni na udio proteina i mineralnih tvari.
4. U pogači lana su detektirani ciklolinopeptidi: CL_A, CL_B, CL_E i CL_OKSID. Način mljevenja je pokazao statistički značajan učinak na udio svih ciklolinopeptida.
5. Produženo mljevenje rezultiralo je smanjenjem udjela CL_B i CL_E.
6. Mljevenje uz hlađenje dovelo je do povećanja koncentracije CL_A, CL_E i CL_OKSID.

6. LITERATURA

Abedi, E., Sahari, M. (2014) Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci. Nutr.* **2** (5), 443-463.

Aladedunye, F., Sosinska, E., Przybylski, R. (2013) Flaxseed Cyclolinopeptides: Analysis and Storage Stability. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 419-428.

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

Bekhit, A., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch, J., Teh, S., Mohamed Ahmed, I., Al-Juhaimi, F., Saeedi, P. and Bekhit, A. (2018) Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **13**, 129-152.

Bell, J., Keith, M. (1993) Nutritional evaluation of linseed meals from flax with yellow or brown hulls, using mice and pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **43** (1-2), 1-18.

Benedetti, E., Pedone, C. (2005) Cyclolinopeptide A: inhibitor, immunosuppressor or other? *J. Pept. Sci.* **11** (5), 268-272.

Bernacchia, R., Preti, R., Vinci, G. (2014) Chemical Composition and Health Benefits of Flaxseed. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, [online] **2** (8), 2381-8980, <<https://www.austinpublishinggroup.com/nutrition-food-sciences/fulltext/ajnfs-v2-id1045.php>>. Pristupljeno 16. svibnja 2019.

Bosanac, P. (2017) Proteinski izolati iz uljnih pogača lana i konoplje-priprava, karakterizacija i biološka aktivnost. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Bozan, B., Temelli, F. (2008) Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technol.* **99** (14), 6354-6359.

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. Tech.* **110** (7), 625-631.

Ćapin, M. (2016) Izolacija bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda proizvodnje lanenog ulja. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

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

Danish, M., Nizami, M. (2019) Complete fatty acid analysis data of flaxseed oil using GC-FID method. *Data in Brief*, **23**, 103-845.

DeLuca, J., Garcia-Villatoro, E., Allred, C. (2018) Flaxseed Bioactive Compounds and Colorectal Cancer Prevention. *Curr. Oncol. Rep.* **20** (8).

Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J. i Parmentier, M. (2007) Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109** (7), 710-732.

Obranović, M. (2015) Karakterizacija lanenog ulja inozemnih sorata uljnog lana uzgojenih na području Republike Hrvatske. Doktorski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., Sihag, M. (2014) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J. Food Sci. Tech.* **51** (9), 1633-1653.

Goswami, T. (2019) *Recent Trends of Application of Cryogenics in Food Processing and Preservation*. [online] Imedpub.com, <<http://www.imedpub.com/articles/recent-trends-of-application-of-cryogenics-in-food-processing-and-preservation.php?aid=21592>>. Pristupljeno 21. svibnja 2019.

Gui, B., Shim, Y., Reaney, M. (2012) Distribution of Cyclolinopeptides in Flaxseed Fractions and Products. *J. Agric. Food Chem.* **60** (35), 8580-8589.

Guimarães, R., Macedo, M., Munhoz, C., Filiu, W., Viana, L., Nozaki, V., Hiane, P. (2013) Sesame and flaxseed oil: nutritional quality and effects on serum lipids and glucose in rats. *Food Sci. Tech.* **33** (1), 209-217.

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 Nutr.* **10** (4), 454-463.

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 20483:2014 Žitarice i mahunarke -- Određivanje sadržaja dušika i proračun sadržaja sirovih proteina (osnovna referentna metoda).

HRN EN ISO 12966-2:2017, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom - 2. dio: Priprava metilnih estera masnih kiselina (osnovna referentna metoda).

Jadhav, P., Okinyo-Owiti, D., Ahiahonu, P., Reaney, M. (2013) Detection, isolation and characterisation of cyclolinopeptides J and K in ageing flax. *Food Chem.* **138** (2-3), 1757-1763.

Karam, M., Petit, J., Zimmer, D., Baudelaire Djantou, E., Scher, J. (2016) Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *J. Food Eng.* **188**, 32-49.

Kozłowski, R., Kręgielczak, A., Radu, D., Pag, A., Sîrghie, C. (2014) Flax Seeds—Source of Biomedical and Food Products. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **603** (1), 122-135.

Kostik, V., Memeti, S. I Bauer, B. (2013) Fatty acid composition of edible oils and fats. *J. Hygienic Eng. Design.* **4**, 112-116.

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.

Kuraica, I. (2019) Utjecaj kriomljevenja na sastav fenola, sterola i antioksidacijsku aktivnost pogače lana. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

Leovac, S. (2014) Topljiva vlakna i sitost. Završni rad. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet.

Maphosa, Y., Jideani, V. (2015) Dietary fiber extraction for human nutrition—A review. *Food Rev. Int.* **32** (1), 98-115.

Marambe, H., Wanasundara, J. (2017) Protein From Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Sustainable Protein Sources*, str. 133-144.

Mazza, G. (2002) *Functional foods*. Lancaster, Pa. [u.a.]: Technomic Publ.

Megazyme (2017) <<https://secure.megazyme.com/Total-Dietary-Fiber-Assay-Kit>>. Pristupljeno 4. lipnja 2019.

Mikolaj, E. (2017) Ekstrakcija lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana. Završni rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

- Mir, N., Tyagi, P., Biswas, A., Tyagi, P., Mandal, A., Wani, M., Deo, C., Biswas, A., Verma, A. (2018) Performance and meat quality of broiler chicken fed a ration containing flaxseed meal and higher dietary lysine levels. *J. Agric. Sci.* **156** (2), 291-299.
- Morris, D. (2007) Description and Composition of Flax. In: D. Morris, ed., *Flax – A Health and Nutrition Primer*, 4th ed. Flax Council of Canada, str. 9-21.
- Morita, H., Shishido, A., Matsumoto, T., Itokawa, H., Takeya, K. (1999) Cyclolinopeptides B - E, new cyclic peptides from *Linum usitatissimum*. *Tetrahedron*, **55** (4), 967-976.
- Moslavac, T., Benčić, Đ., Pašić, M. (2009) Utjecaj dodatka različitih biljnih ulja na oksidacijsku stabilnost smjese suncokretovog ulja. *Glasnik Zaštite Bilja*, **3** (6), 65-75.
- Muir, A., Westcott, N. (2003) *Flax: The genus Linum*. Canada: Taylor & Francis Group.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J., Vicha, R. i Mlcek, J. (2015) Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Int. J. of Mol. Sci.* **16** (12), 12871-12890.
- Picur, B., Cebrat, M., Zabrocki, J., Siemion, I. (2006) Cyclopeptides of *Linum usitatissimum*. *J. Pept. Sci.* **12** (9), 569-574.
- Przybylski, R., Mag, T., Eskin, N., McDonald, B. (2005) Canola oil. U: Bailey's industrial oil and fat products, Vol. 2., Edible oil and fat products: Edible Oils, 6.izd., (Shahidi, F., ured.), Wiley, Hoboken, str. 6-121.
- Rabetafika, H., Van Remoortel, V., Danthine, S., Paquot, M., Blecker, C. (2011) Flaxseed proteins: food uses and health benefits. *Int. J. Food Sci. Tech.* **46** (2), 221-228.
- Radonić, P. (2018) Nove metode izolacija i detekcije biološko aktivnih spojeva iz ulja i pogače lana. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet.
- Rozeegar, M., Shahedi, M., Keramet, J., Hamdami, N., Roshanak, S. (2014) Effect of coated and uncoated ground flaxseed addition on rheological, physical and sensory properties of Taftoon bread. *J. Food Sci. Tech.* **52** (8), 5102-5110.
- Sharav, O., Shim, Y., Okinyo-Owiti, D., Sammynaiken, R., Reaney, M. (2013) Effect of Cyclolinopeptides on the Oxidative Stability of Flaxseed Oil. *J. Agric. Food Chem.* **62** (1), 88-96.

- Shim, Y., Gui, B., Arnison, P., Wang, Y., Reaney, M. (2014) Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **38** (1), 5-20.
- Singh, K., Mridula, D., Rehal, J., Barnwal, P. (2011) Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51** (3), 210-222.
- Soni, R., Katoch, M., Kumar, A., Verma, P. (2016) Flaxseed – composition and its health benefits. [ebook] *Research in Environment and Life Sciences*, str. 310-316, <https://www.academia.edu/33373626/Flaxseed_composition_and_its_health_benefits>.
- Pristupljeno 17. svibnja 2019.
- Tan, N., Zhou, J. (2006) Plant Cyclopeptides. *Chem. Rev.* **106** (3), 840-895.
- Tarpila, A., Wennberg, T. i Tarpila, S. (2005) Flaxseed as a functional food. *Curr. Top. Nutraceut. R.* **3** (3), 167-188.
- Wilczek, M., Bertling, J., Hintemann, D. (2004) Optimised technologies for cryogenic grinding. *Int. J. Miner. Process.* **74**, S425-S434.
- Vranešić Bender, D., Krstev, S. (2008) Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. *Medicus*, [online] **17** (1), 19-25, <<https://hrcak.srce.hr/37974>>. Pristupljeno 17. svibnja 2019.
- Young, R. (2004) Vegetable Fibers. *Encyclopedia Polymer Sci. Technol.* **12**, 401-415.
- Zambiazzi, R., Przybylski, R., Zambiazzi, M. i Mendonça, C. (2007) Composição em ácidos graxos de óleos e gorduras vegetais. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, **25** (1), 112-120.
- Zou, X., Chen, X., Hu, J., Wang, Y., Gong, D., Zhu, X., Deng, Z. (2017) Comparisons of proximate compositions, fatty acids profile and micronutrients between fiber and oil flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Compos. Anal.* **62**, 168-176.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Martina Herceg