

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Klara Poljanec

1133/USH

**BIODOSTUPNOST MINERALNIH  
TVARI U NUSPROIZVODIMA  
ŽITARICA I ULJARICA  
TRETIRANIH  
KRIOMLJEVENJEM I  
ULTRAZVUKOM VISOKOG  
INTENZITETA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Krpan te uz pomoć asistentice Saše Drakula, mag. ing.

Diplomski rad izrađen je u okviru znanstveno-istraživačkog projekta Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (IP-2016-06-3789), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Krpan na brojnim savjetima i prenesenom znanju tijekom izrade diplomskog rada ali i tijekom cjelokupnog studiranja.*

*Veliko hvala Saši Drakula, mag. ing. na uloženom velikom trudu i vremenu te što je svojim znanjem, savjetima i strpljenjem pomogla u izradi ovog diplomskog rada.*

*Također od srca veliko hvala mojim roditeljima, bratu, sestri, prijateljima i dečku na velikoj podršci, razumijevanju i strpljenju, bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda  
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### BIODOSTUPNOST MINERALNIH TVARI U NUSPROIZVODIMA ŽITARICA I ULJARICA TRETIRANIH KRIOMLJEVENJEM I ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA

*Klara Poljanec, 1133/USH*

**Sažetak:** U ovom radu ispitan je utjecaj kriomljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta na biodostupnost bakra, cinka i magnezija te udio fitata u uzorcima posija prosa, ljuski heljde, pogače uljane repice i bučine pogače. Biodostupnost mineralnih tvari određena je *in vitro* intestinalnom metodom za određivanje dijalizabilnosti. Kriomljevenje i ultrazvuk visokog intenziteta imali su različit utjecaj na biodostupnost mineralnih tvari i udio fitata ovisno o određivanoj mineralnoj tvari i vrsti tretiranog uzorka. Najveće povećanje biodostupnosti bakra utvrđeno je kod kriomljevenog uzorka posija prosa, najveće povećanje biodostupnosti magnezija kod uzorka ljuski heljde tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta, dok do povećanja biodostupnosti cinka nije došlo u niti jednom slučaju. Najveće smanjenje udjela fitata utvrđeno je kod uzorka ljuski heljde tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta.

**Ključne riječi:** biodostupnost, fitati, kriomljevenje, mineralne tvari, ultrazvuk visokog intenziteta

**Rad sadrži:** 48 stranica, 20 slika, 5 tablica, 82 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

**Pomoć pri izradi:** Saša Drakula, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni
2. Izv. prof. dr. sc. Marina Krpan
3. Prof. dr. sc. Ksenija Marković
4. Prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjena)

**Datum obrane:** 26. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Quality Control  
Laboratory for Food Quality Control  
Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### BIOACCESSIBILITY OF MINERALS IN CEREAL AND OILSEED CROP BY-PRODUCTS TREATED BY CRYOGENIC GRINDING AND HIGH INTENSITY ULTRASOUND

*Klara Poljanec, 1133/USH*

**Abstract:** This research aimed to investigate the effect of cryogenic grinding and high intensity ultrasound on bioaccessibility of copper, zinc, and magnesium as well as phytate content from millet bran, buckwheat hulls, rapeseed cake, and pumpkin seed cake. Mineral bioaccessibility was determined by *in vitro* intestinal method for dializability. Cryogenic grinding and high intensity ultrasound had a different effect on mineral bioaccessibility and phytate content depending on the tested mineral and the type of treated sample. The largest increase in copper bioaccessibility was found in millet bran sample treated with cryogenic grinding, the largest increase in magnesium bioaccessibility was found in buckwheat hulls sample treated with high intensity ultrasound, while no increase in zinc bioaccessibility occurred in either case. The largest decrease in the phytate content was found in buckwheat hulls sample treated with high intensity ultrasound.

**Keywords:** bioaccessibility, cryogenic grinding, high intensity ultrasound, minerals, phytates

**Thesis contains:** 48 pages, 20 figures, 5 tables, 82 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. Marina Krpan, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Saša Drakula, MSc

**Reviewers:**

1. PhD. Dubravka Novotni, Associate Professor
2. PhD. Marina Krpan, Associate Professor
3. PhD. Ksenija Marković, Full Professor
4. PhD. Ines Panjkota Krbavčić, Full Professor

**Thesis defended:** September 26, 2019.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. MINERALNE TVARI.....	2
2.1.1. Magnezij.....	2
2.1.2. Bakar .....	2
2.1.3. Cink .....	3
2.2. BIOISKORISTIVOST MINERALNIH TVARI .....	3
2.2.1. Metode kvantifikacije bioiskoristivosti mineralnih tvari.....	4
2.2.1.1. <i>In vitro</i> metode .....	5
2.2.2. Metode povećanja bioiskoristivosti mineralnih tvari.....	6
2.2.3. Fitinska kiselina i fitati .....	8
2.3. ATOMSKA SPEKTROMETRIJA U ODREĐIVANJU MINERALNIH TVARI .....	10
2.4. BILJNE SIROVINE KAO IZVOR MINERALNIH TVARI .....	11
2.4.1. Buča.....	11
2.4.2. Proso.....	12
2.4.3. Uljana repica .....	12
2.4.4. Heljda .....	13
2.5. KRIOMLJEVENJE .....	13
2.6. ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA .....	14
2.6.1. Ultrazvuk niskog intenziteta.....	15
2.6.2. Ultrazvuk visokog intenziteta.....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
3.1. UZORCI .....	16
3.2. ODREĐIVANJE BIODOSTUPNOSTI.....	17
3.2.1. Princip metode.....	17
3.2.2. Kemikalije .....	17
3.2.3. Uređaji i ostala oprema.....	17
3.2.4. Priprema posuda .....	18
3.2.5. Priprema enzima.....	18
3.2.5.1. Priprema otopine pepsina.....	18
3.2.5.2. Priprema otopine pankreatina i žučnog ekstrakta.....	18
3.2.6. Postupak .....	18
3.3. PRIPREMA OTOPINE MINERALNOG OSTATKA (PEPELA) .....	19
3.3.1. Princip metode.....	19
3.3.2. Kemikalije .....	19
3.3.3. Uređaji i ostala oprema.....	20
3.3.4. Postupak .....	20



3.4. ODREĐIVANJE UDJELA VODE/SUHE TVARI POSTUPKOM SUŠENJA .....	21
3.4.1. Princip metode.....	21
3.4.2. Uređaji i ostala oprema.....	21
3.4.3. Postupak .....	21
3.5. ODREĐIVANJE UDJELA BAKRA, MAGNEZIJA I CINKA .....	21
3.6. ODREĐIVANJE FITATA I UKUPNOG FOSFORA .....	22
3.6.1. Princip metode.....	22
3.6.2. Kemikalije .....	23
3.6.3. Uređaji i ostala oprema.....	23
3.6.4. Postupak pripreme uzorka .....	24
3.6.5. Kolorimetrijsko određivanje fosfora .....	24
3.6.6. Priprema baždarnog dijagrama.....	24
3.6.7. Obrada rezultata mjerenja.....	25
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>26</b>
4.1. UTJECAJ KRIOMLJEVENJA I ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA BIODOSTUPNOST BAKRA, CINKA I MAGNEZIJA.....	26
4.2. UTJECAJ KRIOMLJEVENJA I ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA UDIO FITATA.....	36
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>41</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>42</b>

# 1. UVOD

Bioiskoristivost mineralnih tvari kod čovjeka jedan je od kritičnih faktora s obzirom na to da je apsorpcija mineralnih tvari iz biljaka često mala. Ona može biti značajna gotovo kao i sam sastav mineralnih tvari kada se procjenjuje korisnost mineralnih tvari u ljudskoj prehrani (Fairweather-Tait i Hurrell, 1996; Frossard i sur., 2000). Međutim, kada se proučava uloga bioaktivnih spojeva u ljudskom zdravlju, njihova bioiskoristivost nije uvijek dobro poznata. Prije nego bioaktivni spojevi postanu bioiskoristivi moraju se osloboditi iz matriksa hrane i modificirati u gastrointestinalnom traktu. Stoga je prije zaključivanja o bilo kakvom učinku na zdravlje potrebno analizirati utječe li proces probave na bioaktivne spojeve i njihovu stabilnost, zato što će to u konačnici utjecati na njihovu biodostupnost i moguće korisne učinke. Prema tome, bioiskoristivost obuhvaća pojam biodostupnost i bioaktivnost (Carbonell-Capella i sur., 2014; Fernandez-Garcia i sur., 2009). Tijekom godina razvijene su i prilagođene *in vitro* metode za utvrđivanje bioiskoristivosti i biodostupnosti nutrijenata. Te metode mogu pružiti vrlo korisne informacije osobito kada se uzme u obzir veliki broj čimbenika koji mogu utjecati na apsorpciju hranjivih tvari (Etcheverry i sur., 2012).

Funkcionalni sastojci dobiveni iz industrijskih nusproizvoda mogu značajno poboljšati prehrambenu vrijednost proizvoda. Nusproizvodi prehrambene industrije bogati su izvor funkcionalnih sastojaka, poput vlakana, mineralnih tvari, fitokemikalija i dr. (Martins i sur., 2017). U ovom istraživanju od nusproizvoda prehrambene industrije korišteni su: posije prosa, ljuske heljde, pogača uljane repice i bučina pogača.

Brojna istraživanja usmjerena su na razvoj novih tehnika ili kombinaciju postojećih s ciljem dobivanja proizvoda visoke kvalitete. Od tih tehnika u ovom radu primjenjivane su tehnika kriomljevenja te tretman ultrazvukom visokog intenziteta. Tijekom procesa kriogenog mljevenja, materijal se smrzava s ciljem povećanja njegove lomljivosti. Smrzavanje dovodi do povećanja čvrstoće materijala, deformacija u njegovoj strukturi čime se posljedično smanjuje vrijeme i energija potrebni za usitnjavanje uzorka. Kod primjene ultrazvuka visokog intenziteta dolazi do fizičkih promjena i ubrzavanja određenih kemijskih reakcija u materijalu koji se obrađuje. To posljedično dovodi do inaktivacije mikroorganizama i enzima, bolje ekstrakcije, olakšane homogenizacije i dr. (Režek Jambrak i sur., 2014.; Pouzar i sur., 2008).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj kriomljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta na biodostupnost magnezija, bakra i cinka u uzorcima ljuski heljde, bučine pogače, posija prosa i pogače uljane repice. Također biti će proveden postupak određivanja fitata i ukupnog fosfora u navedenim uzorcima.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. MINERALNE TVARI**

Mineralne tvari, kao esencijalni mikronutrijenti, potrebni su za normalnu funkciju ljudskog metabolizma. Klasificiraju se kao makro- ili mikroelementi (elementi u tragovima) koji su potrebni tijelu u većim, odnosno manjim količinama (Nosratpour i Jafari, 2018).

Mineralne tvari imaju raznolike funkcije u organizmu. Natrij, klor i kalij utječu na ravnotežu tjelesnih tekućina, odnosno održavaju homeostazu. Natrij, klor, kalij, kalcij i magnezij ključni su za prijenos živčanih impulsa i kontrakciju mišića. Fosfor i magnezij sudjeluju u metabolizmu glukoze, masnih kiselina, aminokiselina i vitamina. Kalcij, fosfor i magnezij formiraju strukturu kostiju i zuba (Vranešić Bender i Krstev, 2008).

#### **2.1.1. Magnezij**

Magnezij je esencijalni nutrijent za ljudski organizam, koji je identificiran kao enzimski kofaktor u više od 300 enzimskih reakcija. Nedostatak magnezija povezan je s nastankom mnogih bolesti kao što su ishemijska kardiopatija, hipertenzija, osteoporoza, intolerancija na glukozu i dijabetes ili infarkt miokarda.

Magnezij je prisutan u gotovo svakoj namirnici te bi raznolika prehrana trebala osiguravati dovoljan unos magnezija. Unatoč tome, prehrana u razvijenim zemljama ponekad ne osigurava dovoljan unos magnezija zbog prevelike konzumacije procesirane hrane. Međutim, kada prehrana uključuje konzumaciju zelenog povrća i cjelovitih žitarica koje su bogate magnezijem, onda ona osigurava dovoljan unos tog elementa (Jodral-Segado i sur., 2003).

Učinkovitost apsorpcije magnezija varira između 25 i 75 % s obzirom na unos magnezija. Veliki unos vlakana rezultira slabijom apsorpcijom magnezija zbog inhibitornog efekta fitaze prisutne u vlaknima. Međutim, visoka količina magnezija u proizvodima bogatim fitatima i celulozom povećava unos magnezija i nadomješta njegovu smanjenu apsorpciju (Nosratpour i Jafari, 2018).

#### **2.1.2. Bakar**

Bakar je element u tragovima prisutan u svim tkivima koji je potreban za stanično disanje, aminaciju peptida, biosintezu neurotransmitera, tvorbu pigmenata i jačinu vezivnog tkiva. On je i kofaktor brojnih enzima te ima važnu ulogu u razvoju središnjeg živčanog sustava. Bakar može biti uključen i u proizvodnju slobodnih radikala Haber-Weiss reakcijom koja rezultira oštećenjem mitohondrija, lomom DNA te oštećenjem neurona (Desai i Kaler, 2008).

Apsorpcija bakra odvija se u tankom crijevu. Tijekom apsorpcije dolazi do nadmetanja iona bakra s ostalim dvovalentnim kationima. Ioni bakra vezani su za metalothionein većim afinitetom nego cink i ostali ioni. Količina apsorbiranog bakra može biti regulirana količinom metalothioneina u stanicama. Neto apsorpcija bakra varira od 25 % do 60 %. Namirnice bogate bakrom su: školjke, jetra, bubrezi, meso, čokolada, orašasti plodovi i druge (Mahan i sur., 2012).

### 2.1.3. Cink

Cink je jedan od najvažnijih elemenata u tragovima zbog svojih brojnih bioloških funkcija: potreban je kao katalitička komponenta za više od 200 enzima te kao strukturni sastojak brojnih proteina, hormona, neuropeptida, hormonskih receptora itd. Zbog uloge u razvoju stanice i diferencijaciji, programiranoj staničnoj smrti, transkripciji gena, funkcioniranju membrane te brojnim enzimskim aktivnostima, cink se smatra glavnim elementom u osiguravanju ispravnog funkcioniranja metabolizma, od faze embrionalnog razvoja pa sve do kraja života (Fabris i Mocchegiani, 1995).

Prisutan je u brojnim namirnicama, međutim, njegova bioiskoristivost varira. Namirnice životinjskog podrijetla imaju veću bioiskoristivost nego one na bazi žitarica. Razlog tome je fitinska kiselina. (Nosratpour i Jafari, 2018). Klinički znakovi nedostatka cinka opisani su kao hipogonadizam, blaga anemija te niska razina cinka u krvnoj plazmi. Ovaj nedostatak uzrokovan je namirnicama bogatim nerafiniranim žitaricama i beskvasnim kruhom koji sadrže visoku količinu vlakana i fitata koji stvaraju kelate s cinkom i sprječavaju njegovu apsorpciju. Prekomjerni unos cinka interferira s apsorpcijom bakra te rezultira anemijom, vrućicom i poremećajima središnjeg živčanog sustava (Mahan i sur., 2012).

## 2.2. BIOISKORISTIVOST MINERALNIH TVARI

Bioiskoristivost (engl. *bioavailability*) se definira kao količina unesene hranjive tvari koja se apsorbira te je dostupna za fiziološke funkcije i ovisi o probavi, oslobađanju iz matriksa hrane, apsorpciji od strane crijevnih stanica te transportu do tjelesnih stanica. Prije nego postanu bioiskoristive, bioaktivne komponente moraju se osloboditi iz matriksa hrane i modificirati u gastrointestinalnom traktu. Prema tome, bioiskoristivost obuhvaća pojam biodostupnosti i bioaktivnosti.

Biodostupnost (engl. *bioaccessibility*) se definira kao količina unesene hranjive tvari koja je potencijalno dostupna za apsorpciju te je ovisna o probavi i oslobađanju iz matriksa hrane.

Bioaktivnost (engl. *bioactivity*) je specifični učinak nakon izlaganja određenom sastojku hrane. To uključuje unos u tkiva i posljedični fiziološki odgovor. Također uključuje informacije o tome kako se bioaktivni spojevi prenose i dođu do ciljnog tkiva, njihova komunikacija s biomolekulama, metabolizmom i biotransformacijskim karakteristikama (Etcheverry i sur., 2012; Fernandez-Garcia i sur., 2009).

Ukupna količina mineralnih tvari nije koristan indikator njihove količine dostupne tijelu budući da je samo određena količina bioiskoristiva. Bioiskoristivost mineralnih tvari varira od manje od 1 % pa sve do 90 % te je ključan faktor za učinkovitost hrane.

Čimbenici koji utječu na bioiskoristivost mineralnih tvari su njihov kemijski oblik u hrani, kelatni agensi, redoks potencijal sastojaka hrane, međusobne interakcije mineralnih tvari i fiziološko stanje pojedinca. Bioiskoristivost mineralnih tvari u tijelu povezana je s probavom, brzinom apsorpcije u stanicama crijeva te prijenosom u tjelesne stanice (Miller, 2007). Organske kiseline, uključujući askorbinsku, limunsku i mliječnu kiselinu, mogu povećati njihovu bioiskoristivost. Njihov utjecaj ovisi o sastavu hrane, vrsti i udjelu mineralne tvari te udjelu organske kiseline. Mogu formirati topljive kelate s mineralima, što štiti mineralne tvari od taloženja i vezanja za inhibitore. Fitati su poznati kao snažni inhibitori i kelatori koji ograničavaju bioiskoristivost najviše dvovalentnih i trovalentnih mineralnih tvari. Visoke razine fitata uglavnom se nalaze u žitaricama, mahunarkama, korijenju i povrću. Polifenolni spojevi također smanjuju bioiskoristivost mineralnih tvari, a nalaze se najviše u hrani kao što je čaj, kava te mnogi drugi ekstrakti povrća i voća (Nosratpour i Jafari, 2018).

### 2.2.1. Metode kvantifikacije bioiskoristivosti mineralnih tvari

Postoje tri glavne metode za kvantifikaciju bioiskoristivosti mineralnih tvari koje uključuju: *in vitro* testovi, biološki testovi te istraživanja ravnoteže (Fairweather-Tait i Southon, 2003; Watzke, 1998).

U tijeku su brojna znanstvena istraživanja koja se bave razvojem i poboljšanjem metoda određivanja apsorpcije mineralnih tvari u tijelu. Jedan od novih pristupa je primjena radio i stabilnih izotopa za obilježavanje mineralnih tvari kako bi se pratio njihov metabolički put te kako bi se procijenila frakcijska apsorpcija iz konzumirane hrane. Zbog toga je razvijeno nekoliko novih metoda temeljenih na izotopima za procjenu apsorpcije mineralnih tvari koje uključuju: retenciju cijelog tijela ( $\gamma$ -emitirajući izotopi), pojavu/nestanak plazme, ravnotežu izotopa (praćenje fecesa i urina), izlučivanje urina (metoda dvostrukih izotopa) i ugradnju hemoglobina (posebice za željezo) (Lowe i Jackson, 2001).

Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) i masena spektrometrija induktivno spregnute plazme (ICP-MS) koriste se za točno određivanje mineralnih izotopa za procjenu njihove bioiskoristivosti (Gharibzahedi i Jafari, 2017).

#### 2.2.1.1. *In vitro* metode

U načelu postoje četiri *in vitro* metode određivanja biodostupnosti i/ili bioiskoristivosti, a to su: topljivost, dijalizabilnost, gastrointestinalni model za biodostupnost te Caco-2 model za bioiskoristivost, koje su opisane u Tablici 1.

U svakoj od navedenih metoda koristi se *in vitro* probava koja simulira ljudski probavni sustav u dva (ponekad tri) koraka koji uključuju želučanu i intestinalnu probavu. Kod želučane probave pepsin (iz svinjskog želuca) se dodaje prije zakiseljavanja uzoraka na pH 2 (kako bi se simulirao želučani pH odrasle osobe) ili pH 4 (kod simulacije dječjeg želučanog pH). Zakiseljavanje uzoraka do pH 2 odnosno 4 je bitno zato što se pepsin počne denaturirati i gubi svoju aktivnost pri  $\text{pH} \geq 5$ . Prije početka intestinalne probave uzorci se neutraliziraju na pH 5,5 – 6 prije dodatka pankreatina i soli žučnih kiselina, te se u konačnici prilagođava na pH 6,5 – 7. Treći korak, koji se ponekad koristi, te prethodi želučanoj fazi je probava od strane lingvalne alfa-amilaze. To je enzim koji razara glikozidne veze molekula škroba, tj. amiloza i amilopektin. Nakon što je testirana namirnica probavljena, bioiskoristivost/biodostupnost se može mjeriti pomoću četiri metode opisane u Tablici 1 (Etcheverry i sur., 2012).

**Tablica 1.** Prednosti i ograničenja *in vitro* metoda određivanja biodostupnosti i/ili bioiskoristivosti (Etcheverry i sur., 2012)

<b>Metoda</b>	<b>Prednosti</b>	<b>Ograničenja</b>
<b>Topljivost (mjeri biodostupnost)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• jednostavna</li> <li>• relativno jeftina</li> <li>• lako se provodi, ne zahtijeva puno opreme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ponekad nije pouzdani indikator bioiskoristivosti</li> <li>• ne može procijeniti stopu unosa, apsorpcije ili kinetike transporta</li> <li>• ne može mjeriti komponente hranjivih tvari na mjestu apsorpcije</li> </ul>
<b>Dijalizabilnost (mjeri biodostupnost)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• jednostavna</li> <li>• relativno jeftina</li> <li>• lako se provodi, ne zahtijeva puno opreme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ne može procijeniti stopu unosa, apsorpcije ili kinetike transporta</li> <li>• ne može mjeriti komponente hranjivih tvari na mjestu apsorpcije</li> </ul>
<b>Gastrointestinalni model (mjeri biodostupnost-kada se spari s intestinalnim stanicama može također mjeriti i bioiskoristivost)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• uključuje mnoge parametre probave (peristaltiku, tjelesnu temperaturu itd.)</li> <li>• omogućuje prikupljanje crijevnog sadržaja u bilo kojem koraku probavnog sustava</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• skupo</li> <li>• samo nekoliko validiranih studija</li> </ul>
<b>Caco-2 stanični model (mjeri bioiskoristivost)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• omogućuje proučavanje hrane ili hranjivih tvari na mjestu apsorpcije</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zahtjeva obučene stručnjake</li> </ul>

### 2.2.2. Metode povećanja bioiskoristivosti mineralnih tvari

Povećanje količine biodostupnih mikronutrijenata u biljnoj hrani kod ljudske prehrane predstavlja veliki izazov te je od velike važnosti za zemlje u razvoju. Teoretski, to bi se moglo postići povećanjem ukupne količine mikronutrijenata u jestivim dijelovima biljaka, kao što su žitarice i mahunarke, istodobno povećavajući udio spojeva koji potiču njihov unos kao što su askorbinska kiselina i/ili smanjujući udio spojeva koji inhibiraju njihovu apsorpciju, kao što su fitinska kiselina ili fenolni spojevi (Frossard i sur., 2000).

Nekoliko tradicionalnih metoda prerade i pripreme hrane mogu se koristiti u kućanstvu kako bi se povećala biodostupnost mikronutrijenata. Te metode uključuju: termičku i mehaničku obradu, namakanje, fermentaciju i klijanje te su niže ukratko opisane.

a.) Termička obrada

Termička obrada može poboljšati bioiskoristivost mikronutrijenata kao što su tiamin i jod uništavanjem određenih antinutrijenata (npr. fitati). No, hoće li termička obrada degradirati fitat, koji je snažan inhibitor apsorpcije željeza, cinka i kalcija, ovisi o biljnoj vrsti, temperaturi i pH vrijednosti (Hotz i Gibson, 2007; i Pneros-Schneier, 1994). Fitati su termostabilne komponente koje nije lako degradirati termičkom obradom. Međutim, intrinzična biljna fitaza je termolabilna te produljena izloženost visokoj temperaturi može dovesti do inaktivacije endogenog enzima. Stoga da bi se poboljšala defosforilacija fitata tijekom termičke obrade, preporučuje se korištenje biljaka s toplinski stabilnim fitazama ili dodavanje egzogenih toplinski stabilnih fitaza (Kumar i sur., 2010).

b.) Mehanička obrada

Mehanička obrada koristi se za uklanjanje posija i/ili klica iz žitarica što može smanjiti sadržaj fitata, ako je lokaliziran u vanjskom aleuronskom sloju (npr. riža, pšenica). Samim time bioiskoristivost željeza, kalcija i cinka može se povećati, ali se istodobno i može smanjiti sadržaj mineralnih tvari i nekih vitamina (Hotz i Gibson, 2007).

c.) Namakanje

Namakanje se često koristi kao predobrada kako bi se olakšala obrada zrna mahunarki i sjemena žitarica. Sam postupak može trajati 15 – 20 min ili duže ovisno o daljnjim koracima obrade (Kumar i sur., 2010). Namakanje žitarica u vodi može rezultirati pasivnom difuzijom u vodi topljivih fitata koji se zatim mogu ukloniti dekantiranjem vode. Količina reduciranih fitata ovisi o biljnoj vrsti, pH i uvjetima namakanja. Namakanjem se također mogu izgubiti neki polifenoli i oksalati koji inhibiraju apsorpciju željeza i kalcija (Perlas i Gibson, 2002; Hotz i Gibson, 2007).

d.) Fermentacija

Fermentacija može inducirati hidrolizu fitata djelovanjem mikrobnog fitaze. Mikrobnog fitaze prisutne su kao enzimi standardne mikroflore na površini žitarica i mahunarki ili su inokulirane kao starter kulture (Sandberg i sur., 1999; Hotz i Gibson, 2007).

e.) Klijanje

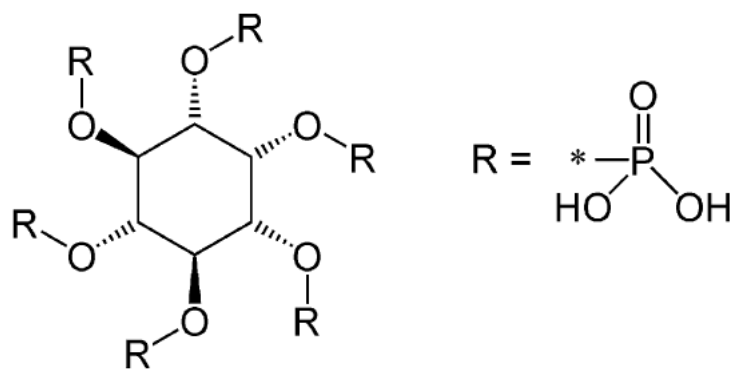
Klijanje povećava endogenu aktivnost fitaze kod žitarica, mahunarki i sjemenki uljarica putem sinteze *de novo*, aktivacije intrinzične fitaze ili oboje (Egli i sur., 2002).

Ovi učinci naglašavaju da je vjerojatno najbolja strategija za poboljšanje bioiskoristivosti mineralnih tvari u prehrani zapravo integrirani pristup koji kombinira različite tradicionalne postupke za preradu i pripremu hrane opisane u gornjem tekstu (Gibson i sur., 2003).



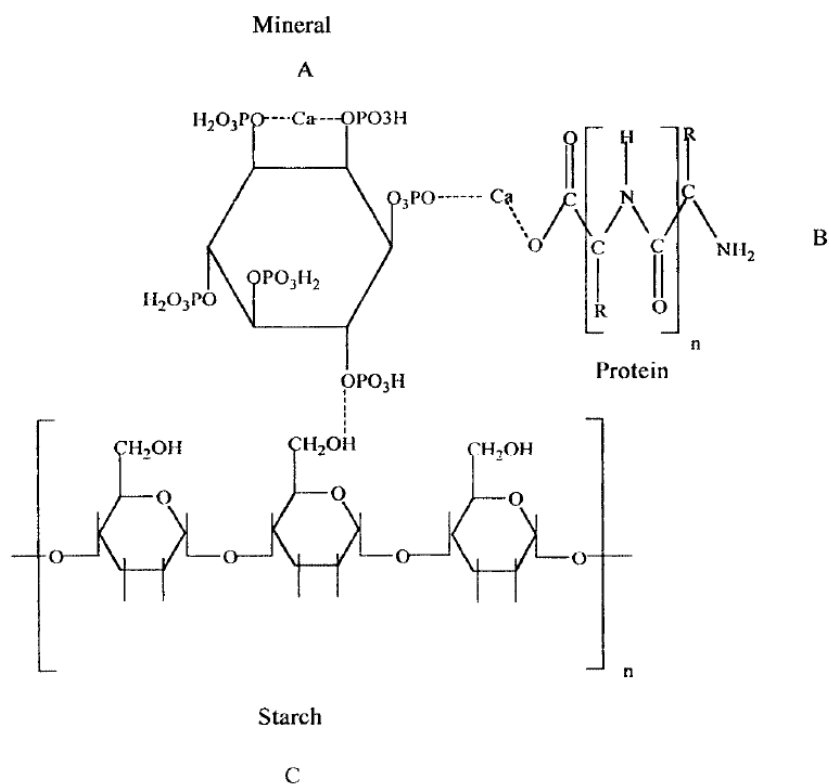
### 2.2.3. Fitinska kiselina i fitati

Fitinska kiselina je mioinozitol-1,2,3,4,5,6-heksakis dihidrogen fosfat (Slika 1). Ona predstavlja glavni oblik skladištenja fosfora koji čini 1 – 5 % mase žitarica, mahunarki, uljanih sjemenki i orašastih plodova. Ona predstavlja 50 – 85 % ukupnog fosfora u biljkama (Gupta i sur., 2013). Sadrži 12 izmjenjivih protona zbog čega može tvoriti komplekse s viševalentnim kationima te pozitivno nabijenim proteinima te se zbog toga može javiti u raznim oblicima. Fitinska kiselina može biti prisutna kao slobodna kiselina, fitati ili fitini ovisno o fiziološkoj pH vrijednosti te prisutnim ionima metala (Oatway i sur., 2001).



**Slika 1.** Struktura fitinske kiseline (Kumar i sur., 2010)

Zahvaljujući svojim kelatnim svojstvima veže mineralne tvari, proteine i škrob. To povezivanje mijenja topljivost, funkcionalnost, probavu i apsorpciju navedenih tvari. Pri neutralnim vrijednostima pH, fosfatne grupe fitinske kiseline su negativno nabijene čime je omogućena interakcija s pozitivno nabijenim komponentama kao što su mineralne tvari i proteini. Metalni ioni mogu se povezati s jednim ili više fosfatnih grupa čime formiraju komplekse čija topljivost varira (Slika 2A). Proteini se mogu vezati direktno s fitinskom kiselinom pomoću elektrostatskih veza (Slika 2B). Povezivanje sa škrobom odvija se vodikovim vezama (Slika 2C). Fitinska kiselina najviše veže cink zato što s njime formira najstabilniji i netopljivi kompleks. Ostale mineralne tvari i nutrijenti na koje može utjecati su: kalcij, natrij, željezo, magnezij, mangan i klor. Uklanjanje fitinske kiseline povećava bioiskoristivost brojnih kationa te samim time i nutritivnu vrijednost namirnice (Oatway i sur., 2001; Gupta i sur., 2013; Rickard i Thompson, 1997).



**Slika 2.** Interakcije fitinske kiseline s mineralnim tvarima (A), proteinima (B) i škrobom (C) (Oatway i sur., 2001)

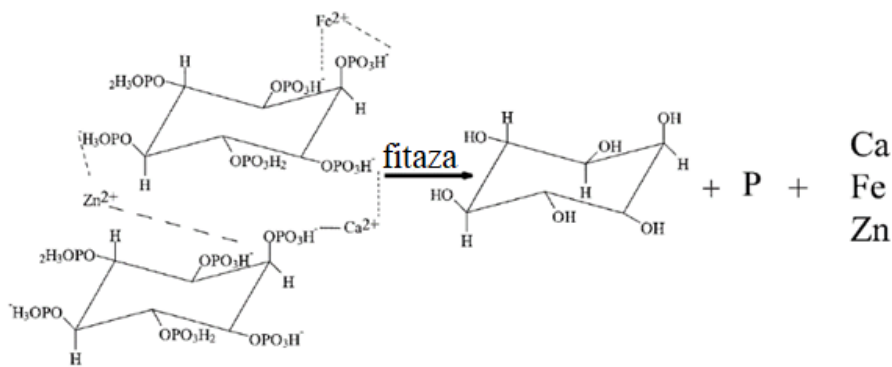
Soli fitinske kiseline, poznate pod nazivom fitati, smatraju se primarnim prehrambenim oblikom fosfata i inozitola u biljnim sjemenkama i žitaricama. Fitati se formiraju tijekom zrenja biljke te predstavljaju 60 – 90 % ukupnih fosfata. U prosjeku dnevni unos fitata je oko 2000 – 2600 mg kod vegetarijanaca i 150 – 1400 mg kod osoba koje konzumiraju sve vrste namirnica. Različite metode procesiranja i pripreme hrane rezultiraju redukcijom sadržaja fitata. Hidroliza fitata tijekom procesiranja hrane je rezultat aktivnosti fitaze koja je prirodno prisutna u biljkama i mikroorganizmima. Zbog toga fitaze imaju važnu primjenu u ljudskoj prehrani – zbog razgradnje fitata tijekom procesiranja hrane, ali i u probavnom sustavu. Međutim, sposobnost defosforilacije varira ovisno o vrsti biljke ili mikroorganizma. Tijekom procesiranja i pripreme hrane, fitati nisu u potpunosti hidrolizirani od strane endogenih fitaza te se u tu svrhu dodaju i egzogene fitaze (Greiner i Konietzny, 2006; Kumar i sur., 2010).

Fitaze (mio-inozitol-1,2,3,4,5,6-heksakis fosfat fosfohidrolaze) identificirane su u biljkama, mikroorganizmima te u nekim životinjskim tkivima. One predstavljaju podskupinu fosfataza

koje su sposobne postupno inicirati defosforilaciju fitata (mio-inozitol-1,2,3,4,5,6-heksakis fosfata) – najzastupljenijeg inozitol fosfata u prirodi (Greiner i Konietzny, 2006).

Fitaze se obično nalaze u prirodi i mogu se dobiti iz više izvora, uključujući biljne i životinjske izvore te mikroorganizme. Najčešće se javljaju u biljnom svijetu. Njihova aktivnost otkrivena je u mnogim vrstama biljaka kao što su: pšenica, raž, ječam, grašak, grah, soja, kukuruz itd. Općenito se pretpostavlja da se fitati tijekom klijanja sjemena, nakon razgradnje fitazom, iskorištavaju u obliku fosfata i inozitola (Gupta i sur., 2013).

Fitaza je jedini poznati enzim koji može inicirati hidrolizu fosfata na ugljiku 1, 3 ili 6 u inozitolnom prstenu fitata. Uklanjanje fosfatne skupine fitazom rezultira otpuštanjem kalcija, željeza, cinka i drugih metala, kao što je prikazano na Slici 3.



**Slika 3.** Fitatna hidroliza fitazom u inozitol, fosfat i druge dvovalentne elemente.

(Lei i Porres, 2003)

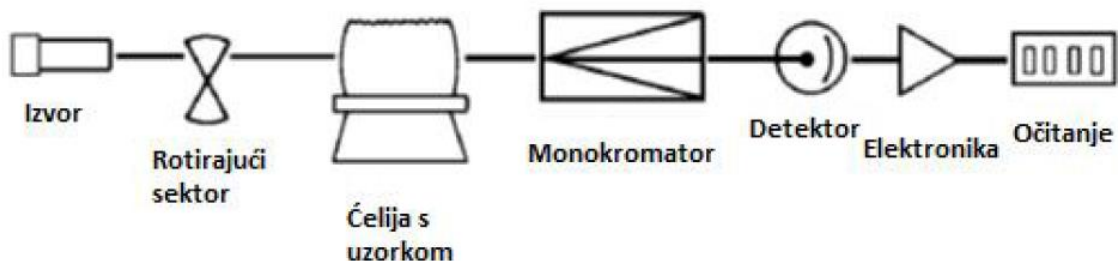
Aktivnost fitaze obično se mjeri količinom oslobođenog anorganskog fosfata u minuti iz određenog supstrata pod određenim uvjetima pH i temperature. Kao i kod ostalih enzima, aktivnost i funkcija fitaze su pod utjecajem inherentnih svojstava enzima i uvjeta djelovanja. Najvažnija svojstva fitaze su: specifičnost za određeni supstrat, termostabilnost, rezistentnost na proteolizu (Lei i Porres, 2003; Gupta i sur., 2013).

### 2.3. ATOMSKA SPEKTROMETRIJA U ODREĐIVANJU MINERALNIH TVARI

Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) jedna je od najčešće korištenih analitičkih tehnika (Ferreira i sur., 2018). Ona služi u analizi metala i metaloida, te je jedna od najvažnijih metoda elementarne analize. Temelji se na tri procesa: atomskoj apsorpciji, atomskoj emisiji i atomskoj fluorescenciji (Luterotti, 2013). Široko je primijenjena u istraživačkim laboratorijima, ali i u

prehrambenoj, farmaceutskoj i naftnoj industriji. S obzirom na proces atomizacije, dijeli se na plamenu atomsku apsorpcijsku spektrometriju (FAAS), elektrotermalnu atomsku apsorpcijsku spektrometriju (ETAAS) i atomsku apsorpcijsku spektrometriju pomoću kemijskih para (CVG-AAS) (Ferreira i sur., 2018; Leopold i sur., 2016). Izbor tehnike određuje se prema kemijskim svojstvima analita, njegovom sadržaju u uzorku, ali i fizikalno-kemijskim svojstvima uzorka. FAAS je najjednostavnija i najčešće korištena AAS tehnika s pragom detekcije u ppm (Ferreira i sur., 2018).

Kod atomske apsorpcije izvor svjetlosti (šuplja katodna lampa) emitira spektar koji je specifičan za element od kojeg je izrađen. Ta svjetlost se propušta kroz uzorak i fokusira u monokromatoru. Monokromator raspršuje svjetlost, a specifična valna duljina izolirane svjetlosti prelazi u detektor. Ovisno o intenzitetu svjetlosti proizvodi se električna struja koju obrađuje elektronika u uređaju. Elektronika će izmjeriti prigušenje svjetla u uzorku i pretvoriti očitavanje u stvarnu koncentraciju uzorka (Perkin-Elmer Corporation, 1964). Taj proces prikazan je na Slici 4.



**Slika 4.** Proces atomske apsorpcije (Perkin-Elmer Corporation, 1964)

## 2.4. BILJNE SIROVINE KAO IZVOR MINERALNIH TVARI

### 2.4.1. Buča

Buča pripada porodici *Cucurbitaceae*, u koju spadaju rodovi *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixita* i *Cucurbita ficifolia*. *Cucurbita pepo* L., *Cucurbita maxima* Duchesne i *Cucurbita moschata* Duchesne su tri ekonomski važne vrste koje se kultiviraju širom svijeta te imaju veliki udio u proizvodnji buče. Buča se sastoji od fleksibilne sočne stabljike s trostrukim listovima te raste od visine 0,6 do 5 m. U zrelosti daje cvijeće i plodove

koji sadrže brojne sjemenke. Sjemenke buče sadrže oko 40 % ulja i 32 % sirovih proteina te su potencijalan izvor ulja bogatog polinezasićenim masnim kiselinama (Caili i sur., 2006; Zdunczyk i sur., 1999). Tradicionalna proizvodnja ulja prešanjem bučinih sjemenki kao nusproizvod ostavlja bučinu pogaču sa 60 – 65 % proteina, koja se većinom koristi kao stočna hrana. Veliki porast potražnje za bučnim uljem, iz praktičnih, ekonomskih i ekoloških razloga povećava potrebu za iskorištavanjem bučine pogače kao nusproizvod njegove proizvodnje. Zbog visokog udjela proteina, dostupnosti i niske cijene, bučina pogača je vrijedna sirovina za dobivanje visoko vrijednih proteinskih proizvoda (Perčin i sur., 2008).

#### 2.4.2. Proso

Proso pripada skupini visoko varijabilnih sitno zasađenih trava, rasprostranjenih širom svijeta kao žitarice za stočnu, ali i ljudsku prehranu. Postoje različite vrste prosa, a neke od najpoznatijih su: biserno proso (*Pennisetum glaucum*), afričko proso (*Eleusine coracana*), talijansko proso (*Setaria italica*), obično proso (*Panicum miliaceum*) te brojni drugi (Singh i sur., 2019). Proso je uobičajeno u većini tropskih i suptropskih regija u svijetu, gdje se uzgaja na siromašnim tlima u područjima s niskom i nedostatnom količinom padalina (Devittori i sur., 2000). Ova žitarica znatno zadovoljava proteinske i energetske potrebe milijuna ljudi. Pri proizvodnji većine proizvoda od prosa, mehanički se uklanja vanjski sloj zrna, posije. Stoga su posije nusprodukt u proizvodnji proizvoda od prosa te se uglavnom koriste kao stočna hrana (Abdelrahman i sur., 1984). Posije prosa su vrlo jeftin i lako dobiveni nusproizvod koji sadrži brojne hranjive tvari kao što su proteini, masti, mineralne tvari, vitamini i prehrambena vlakna. Nažalost, puno posija prosa dobivenih kao nusproizvod u prehrambenoj industriji nije u potpunosti iskorišteno već se odbacuje kao otpad (Zhu i sur., 2018).

#### 2.4.3. Uljana repica

Uljana repica (*Brassica napus* L.) pripada porodici *Cruciferae* (*Brassicaceae*). Tri najpoznatije vrste su: *Brassica nigra*, *Brassica oleracea* i *Brassica campestris*. Ulje se dobiva iz sjemenki uljane repice. Sjemenke sadrže 15 % do 18 % proteina te osim ulja i proteina sadrže i 31 % do 34 % sirovih vlakana izraženo na suhu tvar (Culcuoglu i sur., 2002).

Prilikom ekstrakcije ulja iz sjemenki, preostaje nusproizvod koji se naziva pogača. Zbog velike potražnje za uljem repice u proizvodnji prehrambenog ulja i biogoriva, posljedično dolazi do proizvodnje velikih količina pogače. U Europskoj uniji (2012. - 2017.) 23,8 milijuna tona uljane repice prerađuje se u 9,6 milijuna tona ulja te 13,5 milijuna tona pogače. Ako se pretpostavi da pogača uljane repice sadrži 33 % sirovih proteina, to znači da se godišnje u Europskoj uniji

proizvodi oko 4,5 milijuna tona sirovih proteina uljane repice. Danas se pogača uljane repice uglavnom koristi kao stočna hrana i/ili izvan prehrambenog sektora. Međutim, proteini uljane repice imaju veliki potencijal za korištenje u ljudskoj prehrani zbog povoljnog sastava aminokiselina, biološke vrijednosti te visoke probavljivosti. No, s druge strane, ulje i pogača uljane repice mogu sadržavati i neke neželjene komponente koje mogu negativno utjecati na nutritivnu vrijednost i senzorska svojstva, a to su: fenolne komponente, glukozinolati, oligosaharidi i fitati (Lucke i sur., 2018; Culcuoglu i sur., 2002). Kemijski sastav i nutritivna vrijednost pogače uljane repice ovise o brojnim faktorima koji su povezani s tehnologijom i uvjetima proizvodnje (tip uljne preše, temperatura, vlažnost prilikom ekstrakcije itd.) (Leming i Lember, 2005).

#### 2.4.4. Heljda

Heljda pripada rodu *Fagopyrum* koji je član porodice *Polygonaceae* te se sastoji od 15 vrsta, od kojih su tri najvažnije: obična heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench.), tatarska heljda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) i višegodišnja heljda (*Fagopyrum dibotrys* Hara) (Li, 2003).

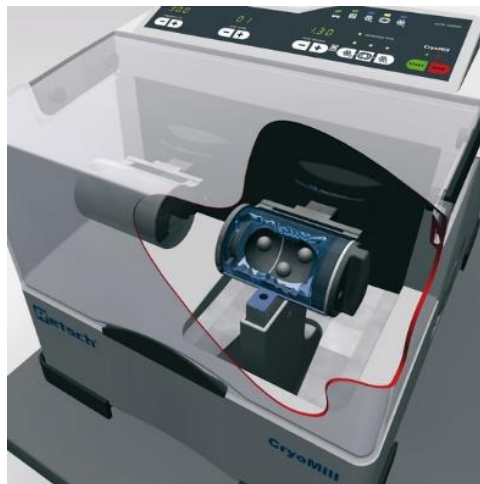
Heljda je u posljednjih nekoliko godina pokazala dobar tržišni potencijal zahvaljujući svojim nutritivnim i ljekovitim svojstvima (Zhu, 2016). Sadrži veliku količinu ugljikohidrata, proteina i masti te malu količinu mineralnih tvari i polifenola. Ugljikohidrati su najzastupljenija komponenta te čine 70 % sastava, od čega je 50 % škroba (Gao i sur., 2016). Sadržaj proteina je veći nego kod ostalih žitarica (pšenica, riža, kukuruz) te čini 9,61 % ukupnog sastava. Proteini heljde imaju visoku nutritivnu vrijednost, zahvaljujući njihovom sastavu aminokiselina. Heljda je bogata lizinom, koji čini 6 % ukupnog sastava aminokiselina. Sadržaj masti je također velik te prevladavaju većinom nezasićene masne kiseline, posebno oleinska i linolenska (Yang i sur., 2019). Osim toga, heljda je bogata kalijem, cinkom i bakrom, te osim mineralnih tvari sadrži i visoku količinu vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> te vitamina E u usporedbi s ostalim žitaricama (Bonafaccia i Fabjan, 2003).

## 2.5. KRIOMLJEVENJE

Mljevenje je proces redukcije zrna ili sjemena u prah primjenom različitih sila, posebice trljanjem, kompresijom, smicanjem ili udarcem između dvije tvrde površine (Meghwall i Goswami, 2014). Mljevenje na sobnoj temperaturi odnosi se na mljevenje pri uobičajenoj atmosferskoj temperaturi i tlaku, dok se kriomljevenje odnosi na mljevenje uz pomoć rashladnog sredstva kao što je tekući dušik (LN<sub>2</sub>) na temperaturama znatno nižim od atmosferske (Balasubramanian i sur., 2012). Tradicionalnim mljevenjem dolazi do povišenja

temperature uslijed trenja što može izazvati nepoželjne promjene na materijalu i gubitak nutritivno vrijednih komponenti. Tijekom procesa kriogenog mljevenja materijal se smrzava na vrlo niskoj temperaturi kako bi bio krhki i lakši za mljevenje. Tehnika kriogenog mljevenja pripada skupini tehnika kojima se postiže nanostrukturirano stanje pomoću teške plastične deformacije (Pouzar i sur., 2008; Lavernia i Schoenung, 2008).

Postoji nekoliko prednosti kriomljevenja u usporedbi s mljevenjem na sobnoj temperaturi. Prvo, smanjena aglomeracija uzorka i lijepljenje proizvoda za stijenke opreme, što rezultira učinkovitijim ishodom mljevenja (npr. boljim iskorištenjem i poboljšanjem mikrostrukture). Drugo, oksidacijske reakcije do kojih dolazi tijekom mljevenja na sobnoj temperaturi su reducirane zbog dušičnog okoliša. Treće, vrijeme mljevenja potrebno za postizanje nanostrukture je značajno smanjeno (Lavernia i Schoenung, 2008). Primjena tekućeg dušika u procesu kriomljevenja ima neosporne prednosti poput jednostavnog rukovanja, malo dodatne opreme te inertnost samog procesa kako bi se izbjegle eksplozije. Uz navedene prednosti, moraju se uzeti u obzir i nedostaci kao što je visoka cijena (Wilczek i sur., 2004). Na Slici 5. prikazan je uređaj za kriomljevenje.

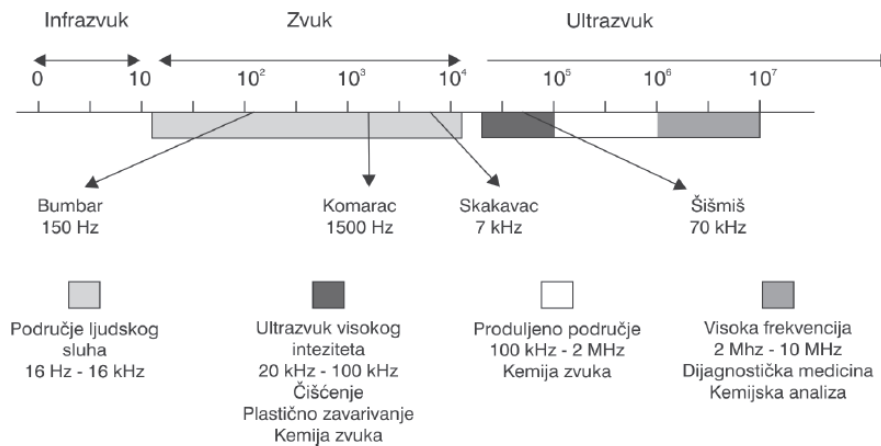


**Slika 5.** Kriomlin (Anonymous 1, 2019)

## **2.6. ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA**

Ultrazvuk je zvuk frekvencije iznad 20 kHz. Razvojem ultrazvuka niskog intenziteta koji se često koristi u dijagnostičke svrhe, razvio se i interes za upotrebu ultrazvuka visokog intenziteta prilikom obrađivanja hrane. S obzirom na primjenu u prehrambenoj industriji, ultrazvuk se dijeli na: ultrazvuk niskog intenziteta i visoke frekvencije te ultrazvuk visokog intenziteta i

niske frekvencije (Brnčić i sur., 2009a; Herceg i sur., 2009). Na Slici 6. prikazana su područja podjele zvuka prema frekvencijama.



**Slika 6.** Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Herceg i sur., 2009)

### 2.6.1. Ultrazvuk niskog intenziteta

Ultrazvuk niskog intenziteta (dijagnostički ultrazvuk) odnosi se na frekvencijski raspon od 2 MHz na više. To je nerazorna tehnika sa značajkama visokih frekvencija i niskih intenziteta (manje od 1 Wcm<sup>-2</sup>), te ona ne uzrokuje kemijske niti fizikalne promjene u materijalu kroz koji prolazi ultrazvučni val. Primjena ultrazvuka niskog intenziteta odnosi se na ispitivanje određenih svojstava sastojaka hrane, ali i gotovih prehrambenih proizvoda kao što su struktura, protok, debljina, kemijski sastav, veličina čestica ili prisustvo stranih tijela (Herceg i sur., 2009.; Brnčić i sur., 2009b).

### 2.6.2. Ultrazvuk visokog intenziteta

Ultrazvuk visokog intenziteta odnosi se na frekvencijski raspon od 20 do 100 kHz, uz prošireno područje do 2 MHz, te na visoki intenzitet u rasponu od 1 do 1000 Wcm<sup>-2</sup>. Koristi se za unaprjeđenje, poboljšanje ili mijenjanje fizikalno-kemijskih svojstava hrane tijekom procesa proizvodnje. Može uzrokovati fizikalne promjene na tretiranom materijalu kao i određene kemijske reakcije, povećanje brzine difuzije, dispergiranje agregata, ubrzavanje kemijskih reakcija, ali i uništenje enzima i mikroorganizama. U prehrambenoj industriji najčešće se koristi za inaktivaciju mikroorganizama, homogenizaciju, membranske procese itd. (Herceg i sur., 2009; Brnčić i sur., 2009b; Režek Jambrak i sur., 2009).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. UZORCI

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada ispitan je utjecaj kriomljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta na biodostupnost mineralnih tvari u uzorcima. Uzorci korišteni u ovom istraživanju su: posije prosa, pogača uljane repice, bučina pogača te ljuske heljde mljevene na ciklomlinu. Optimalni uvjeti za provođenje oba tretmana definirani su preliminarnim istraživanjima u sklopu ovog projekta (Čukelj Mustač i sur., 2019; Voučko, 2018; Mamilović, 2018; Buratović, 2019). U Tablici 2. prikazani su opisi naziva uzoraka s pripadajućim oznakama.

**Tablica 2.** Opis naziva uzoraka

OPIS	OZNAKA
Netretirani uzorak	0
Kriomljeveni uzorak	KM
Uzorak tretiran ultrazvukom visokog intenziteta	0+UVI

Uzorci ljuski heljde (prethodno mljevene na ciklomlinu) i posija prosa, kriomljeveni su na kriomlinu Retsch Cryomill (Njemačka) s velikom metalnom kuglicom pri frekvenciji 30 Hz u trajanju od 8 minuta uz primjenu hlađenja tekućim dušikom, nakon čega su prosijani na čestice manje od 50  $\mu\text{m}$ . Uzorak pogače uljane repice mljeven je na istom kriomlinu, ali s 12 malih metalnih kuglica pri frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 12 minuta bez prosijavanja, također uz hlađenje tekućim dušikom. Za masne uzorke korištene su male kuglice ( $n = 12$ ) radi većeg trenja, a za žitarice je korištena jedna velika kuglica.

Također, ispitan je i utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na biodostupnost mineralnih tvari. Uzorci su tretirani ultrazvučnim procesorom Hielscher UP400St snage 400 W, frekvencije titranja 24 kHz, sa sondom promjera 22 mm pri uvjetima navedenim u Tablici 3.

**Tablica 3.** Uvjeti tretmana ultrazvukom

Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme (min)
15 % suspenzija bučine pogače	63	20
10 % suspenzija ljuski heljde	100	15
15 % suspenzija posija prosa	100	9,20
10 % suspenzija pogače uljane repice	100	3

Nakon tretmana uzorci su liofilizirani i čuvani pri -18 °C do analize.

## 3.2. ODREĐIVANJE BIODOSTUPNOSTI

### 3.2.1. Princip metode

Ova metoda obuhvaća simuliranu gastrointestinalnu probavu uz pomoć pepsina u želučanoj fazi te pankreatina i žučnih soli za intestinalnu fazu. Količina mineralnih tvari koja difundira kroz polupropusnu membranu koristi se u mjerenju njihove dijalizabilnosti.

### 3.2.2. Kemikalije

- Dušična kiselina, 10 %-tna (iz dušične kiseline, 65 %, CARLO ERBA Reagents)
- Klorovodična kiselina, 0,1 M i 6 M (iz klorovodične kiseline, 37%, CARLO ERBA Reagents)
- Natrijev hidrogenkarbonat, 0,1 M (iz natrij hidrogenkarbonata, ACROS ORGANICS, 99% extra pure)
- Natrijev hidroksid, 0,5 M (iz natrij hidroksida, 98 %, Lach-Ner, s.r.o.)
- Pepsin Crystallin (Sigma)
- Pankreatin iz svinjske gušterače (Sigma)
- Svinjski žučni ekstrakt (Sigma)

### 3.2.3. Uređaji i ostala oprema

- Erlenmeyerova tikvica, 300 mL
- Menzura, 100 mL
- Magnet
- Pipeta, 1 mL
- Kapalica
- Plastične epruvete s čepom

- Automatske pipete, 5 mL i 1 mL
- Nastavci za automatske pipete
- Magnetska miješalica s termoregulacijom (IKA C-MAG HS-7)
- Parafilm
- Analitička vaga (ALS 220-4N, Kern)
- Tehnička vaga (Kern KB)
- pH-metar (3510 pH Meter, Jenway)
- Vodena kupelj s tresilicom (SBS40, Stuart)
- Plastične epruvete, 50 mL
- Čaša, 100 mL

#### 3.2.4. Priprema posuđa

Posuđe je preko noći natopljeno u 10 % dušičnoj kiselini i nakon toga isprano s vodom 3 puta.

#### 3.2.5. Priprema enzima

##### 3.2.5.1. Priprema otopine pepsina

Pepsin je odvagano u epruvetu s poklopcem na navoj te je zapisana točna odvaga. Nakon odvage dodano je 3 mL 0,1 M HCl automatskom pipetom te je epruveta promućkana.

##### 3.2.5.2. Priprema otopine pankreatina i žučnog ekstrakta

Pankreatin je odvagano direktno u epruvetu s poklopcem, a žučni ekstrakt na aluminijsku foliju nakon čega je prenesen u epruvetu. Dodano je 5 mL 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> te je epruveta promućkana.

#### 3.2.6. Postupak

Odvagana je Erlenmeyerova tikvica te je u njoj odvagano  $10 \pm 0,01$  g uzorka. Uzorku je menzutom dodano 70 mL vode, u tikvicu je stavljen magnet i stavljeno je na 5 minuta na magnetsku miješalicu na homogenizaciju.

Dodano je 6 M HCl do pH 2. Nakon prilagodbe pH temperaturna sonda i pH sonda isprane su u tikvici s malo vode. Otvorena tikvica stavljena je 15 minuta na magnetsku miješalicu na homogenizaciju te nakon isteka vremena ponovno je provjeren pH i po potrebi dodatno prilagođen.

U tikvicu je dodana pripremljena otopina pepsina i epruveta je dodatno isprana s malo vode kapalicom. Tikvica je odvagana, dopunjena vodom do 100 g te promućkana, zatvorena parafilmom i postavljena na inkubaciju (37 °C, 2 h) u vodenoj kupelji pri 120 o min<sup>-1</sup>. Po

završetku inkubacije, 20 g uzorka odvagano je u čašu od 100 mL s magnetom (za određivanje ukupne kiselosti), a tikvica s ostatkom uzorka stavljena u vodu s ledom na 1,5 h.

Za određivanje ukupne kiselosti, u 20 g odvagano uzorka dodana je pripremljena otopina pankreatina i žučnog ekstrakta, čaša je stavljena na magnetsku miješalicu te je u nju uronjena pH i temperaturna sonda. pH je prilagođen s 0,5 M NaOH do 7,5 te je očitani volumen. Nakon 30 minuta pH je po potrebi ponovno prilagođen na 7,5. Iz volumena utrošenog NaOH izračunata je masa NaHCO<sub>3</sub> koja je dodana u vrećicu za dijalizu prema jednadžbama 1 i 2.

$$n = V(\text{NaOH}) \times 0,5 \text{ mol/L} \quad [1]$$

$$m = n \times M(\text{NaHCO}_3) \quad [2]$$

Izračunata masa NaHCO<sub>3</sub> odvagana je na aluminijsku foliju. Komadi membrane za dijalizu dužine oko 30 cm stavljani su u čašu s vodom na nekoliko minuta. Jedan kraj membrane zavezan je gumicom, dodano je 25 mL vode i NaHCO<sub>3</sub> s folije, zavezan je i drugi kraj te je vrećica odvagana (dužina oko 25 cm od gumice do gumice).

Nakon 90 minuta držanja uzorka na ledu, 20 g homogeniziranog uzorka odvagano je u Erlenmeyerovu tikvicu sa širokim grlom. Tikvica s odvaganim uzorkom stavljena je u vodenu kupelj na 5 minuta, nakon čega je dodana membrana za dijalizu te je sve skupa odvagano. Tikvica pokrivena parafilmom je stavljena u kupelj na 30 minuta (37 °C, 120 o min<sup>-1</sup>). Nakon 30 minuta izmjeren je pH otopine i dodana je otopina pankreatina i žučnog ekstrakta, sve zajedno je promućkano, izvavano, pokriveno parafilmom i inkubirano u vodenoj kupelji (37 °C, 2 h, 120 o min<sup>-1</sup>). Nakon inkubacije izmjeren je pH otopine u tikvici, vrećica za dijalizu je odvagana te je sadržaj vrećice pohranjen u plastičnoj epruveti s čepom od 50 mL.

(Luten i sur., 1996 uz modifikacije).

### **3.3. PRIPREMA OTOPINE MINERALNOG OSTATKA (PEPELA)**

#### **3.3.1. Princip metode**

Uzorak se karbonizira na plameniku, a zatim mineralizira (suhim putem) u mufolnoj peći pri određenoj temperaturi do postizanja jednolično svijetlo sivog pepela ili pepela konstantne mase, nakon čega se otapa u 5 % dušičnoj kiselini.

#### **3.3.2. Kemikalije**

- Dušična kiselina, 5 M (iz dušične kiseline, 65 %, CARLO ERBA Reagents)

### 3.3.3. Uređaji i ostala oprema

- Porculanska zdjelica
- Eksikator
- Plamenik
- Analitička vaga (Chyo JK-180)
- Mufolna peć (Heraeus, KR-170)
- Pipeta, 5 mL
- Satno stakalce
- Običan filter papir
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić
- Odmjerna tikvica, 25 mL
- Plamenik
- Plastična epruveta s čepom, 50 mL

### 3.3.4. Postupak

Odvagano je  $5 \text{ g} \pm 0,0001$  dobro homogeniziranog uzorka u porculansku zdjelicu, prethodno izarenu, ohlađenu u eksikatoru i izvaganu odmah nakon što se ohladila na sobnu temperaturu. Uzorak u zdjelici zagrijan je lagano na plameniku dok potpuno ne pougljeni, a zatim je stavljen u mufolnu peć na  $550 \text{ }^\circ\text{C}$  te je ostavljen u peći dok se ne postigne jednolično svijetlo sivi pepeo bez crnih čestica. Nakon spaljivanja porculanska zdjelica s pepelom ohlađena je u eksikatoru i izvagana čim je postigla sobnu temperaturu.

U prethodno ohlađeni pepeo dodano je 5 mL dušične kiseline (5 M) ispirući gornje dijelove porculanske zdjelice, pokriveno je satnim stakalcem, zagrijano na plameniku do temperature vrenja i ostavljeno 30 minuta ispod temperature vrenja. Nakon toga je satno stakalce isprano destiliranom vodom u zdjelicu, a sadržaj zdjelice kvantitativno prenesen preko staklenog lijevka i filter papira, uz pomoć staklenog štapića, u odmjernu tikvicu od 25 mL koja je zatim nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina korištena je za kasnije određivanje pojedinačnih mineralnih tvari (Vahčić i sur., 2008 uz modifikacije).

### 3.4. ODREĐIVANJE UDJELA VODE/SUHE TVARI POSTUPKOM SUŠENJA

#### 3.4.1. Princip metode

Ovim fizikalnim postupkom određuje se udjel vode indirektno, pri čemu se mjeri ostatak koji zaostaje nakon sušenja, a iz razlike u masi prije i nakon sušenja namirnice izračunava se udjel vode.

#### 3.4.2. Uređaji i ostala oprema

- Aluminijska posudica
- Eksikator
- Analitička vaga (Chyo JK-180)
- Zračna sušnica (Instrumentaria ST-01/02)

#### 3.4.3. Postupak

2 g ± 0,0001 g dobro homogeniziranog uzorka odvagano je u prethodno osušenu, ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem. Nepokrivena posudica s uzorkom i poklopac sušeni su 1 sat u zračnoj sušnici pri 130 °C ± 3 °C (period sušenja počinje od trenutka kad je u sušnici postignuta temperatura točno 130 °C). Nakon isteka vremena sušenja, pokrivena aluminijska posudica s uzorkom ohlađena je u eksikatoru i izvagana (Vahčić i sur., 2008). Udio vode i udio suhe tvari izračunati su prema jednadžbama 3. i 4.

Račun:

$$Udio\ vode\ (\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad [3]$$

Gdje je:  $m_1$  – masa prazne aluminijske posudice (g)

$m_2$  – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

$m_3$  – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

$$Udio\ suhe\ tvari\ (\%) = 100 - \% \text{ vode} \quad [4]$$

### 3.5. ODREĐIVANJE UDJELA BAKRA, MAGNEZIJA I CINKA

Za određivanje udjela magnezija, bakra i cinka korišten je atomski apsorpcijski spektrofotometar Perkin Elmer model 2830. Pripremljene otopine pepela i otopine dobivene postupkom za određivanje biodostupnosti korištene su u određivanju udjela magnezija, bakra i

cinka odnosno u određivanju njihove biodostupnosti. Kako bi udio pojedinog analita u uzorku bio unutar linearnog područja metode, otopine su razrijeđene. Otopine pepela korištene za određivanje magnezija razrijeđene su 1000 puta, za određivanje cinka 100, 50 ili 10 puta, dok za određivanje bakra nije bilo potrebno razrjeđenje. Otopine za određivanje biodostupnosti analita razrijeđene su 100 i 200 puta za magnezij, dok za cink i bakar nije bilo potrebno razrjeđenje. Također, kako bi se spriječile interferencije fosfata s magnezijem, razrijeđenim otopinama, standardima i slijepoj probi dodan je lantan do konačnog udjela 1 %.

U Tablici 4. prikazani su uvjeti rada za plamenu atomsku apsorpcijsku i emisijsku spektrofotometriju. Mjerenja za svaki analit provedena su u pet uzastopnih ponavljanja, u vremenskom razmaku od 3 sekunde.

**Tablica 4.** Uvjeti rada za plamenu atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju

<b>Parametar</b>	<b>Mg</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>
Valna duljina (nm)	285,2	324,7	213,9
Otvor pukotine monokromatora (nm)	0,7	0,7	0,7
Energija lampe (mA)	15	15	15
Protok acetilena (L min <sup>-1</sup> )	2,2	2,2	2,2
Protok zraka (L min <sup>-1</sup> )	14,5	14,5	14,5

Baždarni dijagram za svaki analit posebno je izrađen pomoću otopina standarda u pet koncentracijskih razina, a mjerenja su provedena u minimalno pet uzastopnih ponavljanja.

### **3.6. ODREĐIVANJE FITATA I UKUPNOG FOSFORA**

#### **3.6.1. Princip metode**

Fitinska kiselina (fitati) i ukupni fosfor određeni su metodom koju je razvio Megazyme (K-PHYT 05/17). Ova metoda uključuje ekstrakciju inozitolnih fosfata pomoću kiseline, popraćenu tretmanom s fitazom specifičnom za fitinsku kiselinu (IP<sub>6</sub>) te niže mioinozitol fosfatne forme (npr. IP<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub>, IP<sub>5</sub>). Naknadno se provodi tretman alkalnom fosfatazom koji osigurava otpuštanje konačnog fosfata iz mioinozitol fosfata. Ukupni otpušteni fosfati mjere se kolorimetrijskom metodom te izražavaju kao grami fosfora na 100 g uzorka (Megazyme, 2017).

### 3.6.2. Kemikalije

- Klorovodična kiselina, 0,66 M (iz klorovodične kiseline, 37 %, CARLO ERBA Reagents)
- Natrijev hidroksid, 0,75 M (1,5 g granula natrijevog hidroksida dodati u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopuniti do oznake)
- Pufer (pH 5,5) s natrijevim azidom (0,02 % w/v), Megazyme kit
- Suspenzija fitaze, Megazyme kit
- Pufer (pH 10,4), plus MgCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> i natrijev azid (0,02 % w/v), Megazyme kit
- Suspenzija alkalne fosfataze (ALP), Megazyme kit
- Trikloroetena kiselina (50 % w/v), (iz TCA p.a. > 99%, T.T.T.)
- Askorbinska kiselina (10 % w/v)/ sumporna kiselina (1M), (5 g askorbinske kiseline (Merck-alkaloid) otopiti u destiliranoj vodi te dodati 2,68 mL sumporne kiseline (CARLO ERBA Reagents) u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuniti do oznake)
- Amonij molibdat (5 % w/v), (odvagati 0,5 g amonij molibdata (Riedel-de Haën) u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuniti destiliranom vodom do oznake)
- Standardna otopina fosfora (50 µg mL<sup>-1</sup>) i natrijevog azida (0,02% w/v), Megazyme kit

### 3.6.3. Uređaji i ostala oprema

- Analitička vaga (ALS 220-4N, Kern)
- Vodena kupelj s tresilicom (SBS40, Stuart)
- Staklene boce s čepom, 250 mL (Duran)
- Automatske pipete, 5 mL, 1 mL i 100 µL
- Nastavci za automatske pipete
- Plastične epruvete, 1,5 mL
- Centrifuga, MicroCL 21 (Thermo Scientific)
- Vorteks (IKA MS3 basic)
- Kivete, 1,5 mL
- Štoperica
- Vodena kupelj (IKA C-MAG HS 7)
- Spektrofotometar (Lambda 35, PerkinElmer)



#### 3.6.4. Postupak pripreme uzorka

Izvagano je  $0,5 - 3 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$  uzorka u staklene boce s čepom. U uzorke je dodano 10 – 20 mL klorovodične kiseline (0,66 M). Boce su stavljene u vodenu kupelj s tresilicom na sobnu temperaturu preko noći pri  $120 \text{ o min}^{-1}$ .

Otpipetirano je 1 mL ekstrakta u plastičnu epruvetu volumena 1,5 mL te centrifugirano na  $13\ 000 \text{ o min}^{-1}$  u trajanju od 10 minuta. Nakon toga je otpipetirano 0,5 mL supernatanta u novu epruvetu volumena 1,5 mL te neutralizirano dodatkom 0,5 mL otopine natrijevog hidroksida (0,75 M). Neutralizirani uzorak korišten je za reakciju enzimatske defosforilacije.

Za reakciju enzimatske defosforilacije kod određivanja slobodnog fosfora otpipetirano je 0,57 – 0,62 mL vode, 0,20 mL otopine 1 (pufera) i 0,05 - 0,1 mL ekstrakta uzorka. Za razliku od slobodnog fosfora, kod određivanja ukupnog fosfora za sve uzorke otpipetirano je 0,60 mL vode, 0,20 mL pufera, 0,05 mL ekstrakta uzorka i 0,02 mL otopine 2 (fitaza). Sve otopine homogenizirane su na vorteksu te inkubirane u vodenoj kupelji pri  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 10 minuta. Nakon isteka vremena započeta je sljedeća reakcija dodatkom 0,02 mL destilirane vode i 0,20 mL otopine 3 (pufer) za slobodni fosfor, odnosno 0,20 mL pufera i 0,02 mL otopine 4 (ALP) za ukupni fosfor. Otopine su ponovno homogenizirane vorteksom te inkubirane u vodenoj kupelji pri  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 15 min nakon čega je reakcija prekinuta dodatkom 0,30 mL trikloroctene kiseline. Uzorci su centrifugirani pri  $13\ 000 \text{ o min}^{-1}$  u trajanju od 10 minuta.

#### 3.6.5. Kolorimetrijsko određivanje fosfora

Za kolorimetrijsko određivanje fosfora u plastičnu epruvetu od 1,5 mL otpipetirano je 1,00 mL uzorka te 0,50 mL reagensa. Otopina je homogenizirana na vorteksu te inkubirana u vodenoj kupelji na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 1 h. Nakon 1 h ponovno je homogenizirana i prebačena u plastičnu kivetu od 1 mL te je očitana apsorbancija na 655 nm.

#### 3.6.6. Priprema baždarnog dijagrama

Priprema baždarnog dijagrama provedena je tako da su pripremljene otopine standarda s 0  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  i 7,5  $\mu\text{g}$  fosfora, ukupnog volumena 5 mL, u plastičnim epruvetama volumena 13 mL. Iz tih otopina ponovljena je prethodno opisana kolorimetrijska reakcija dodatkom 1 mL standarda i 0,5 mL reagensa (Megazyme, 2017).

### 3.6.7. Obrada rezultata mjerenja

Nagib kalibracijske krivulje potreban za daljnji izračun dobiven je prema jednadžbama 5. i 6.

$$M (\mu\text{g}/\Delta A_{\text{fosfor}}) = \frac{P (\mu\text{g})}{\Delta A_{\text{fosfor}}} \quad [5]$$

$$\text{nagib kalibracijske krivulje } \left( \frac{\mu\text{g}}{\Delta A_{\text{fosfor}}} \right) = \frac{M_{\text{STD1}} + M_{\text{STD2}} + M_{\text{STD3}} + M_{\text{STD4}}}{4} \quad [6]$$

Udio fosfora izračunat je prema jednadžbi 7.:

$$\text{Udio fosfora } \left( \frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{\text{nagib kalibracijske krivulje} \times v_e \times F}{10\,000 \times m \times v} \times \Delta A_{\text{fosfor}} \quad [7]$$

Gdje je:

srednja vrijednost - srednja vrijednost standarda fosfora ( $\mu\text{g}/\Delta A_{\text{fosfor}}$ )

$v_e$  – volumen za ekstrakciju uzorka

F – faktor razrjeđenja

$\Delta A$  – razlika u apsorbanciji uzorka

10 000 – konverzija iz  $\mu\text{g g}^{-1}$  u  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$

m – masa uzorka (g)

v – volumen uzorka

a za fite prema jednadžbi 8.:

$$\text{Fitati } \left( \frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{\text{Fosfor } \left( \frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right)}{0,282} \quad [8]$$

## 3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su obrađeni i grafički prikazani pomoću programa Excel 2016. Rezultati analiza obrađeni su pomoću jednosmjerne analize varijance, uz *post hoc* Tukey test. Statistička analiza i analiza korelacije provedene su pomoću programa Statistica 8 (Stat Soft Inc., USA).

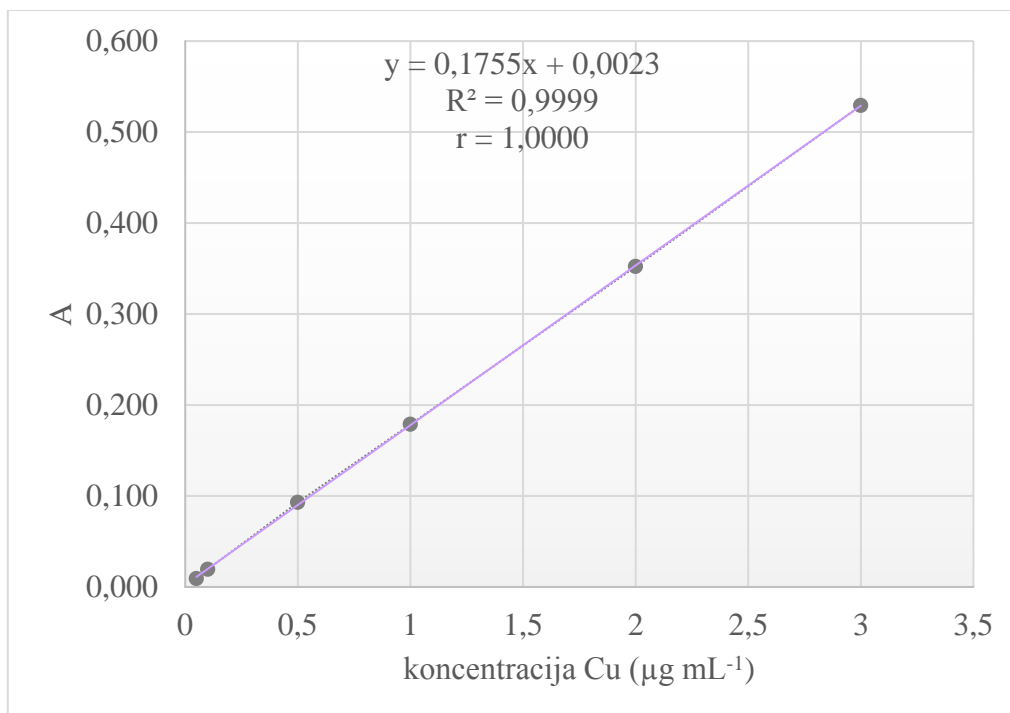
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Iako je djelovanje kriomljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta proučavano na više od stotinu biljnih vrsta, pregledom baza podataka znanstvenih radova uočeno je da učinak djelovanja kriomljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta na biodostupnost mineralnih tvari posija prosa, ljuski heljde, pogače uljane repice i bučine pogače do sada nije uopće ili je rijetko istraživano.

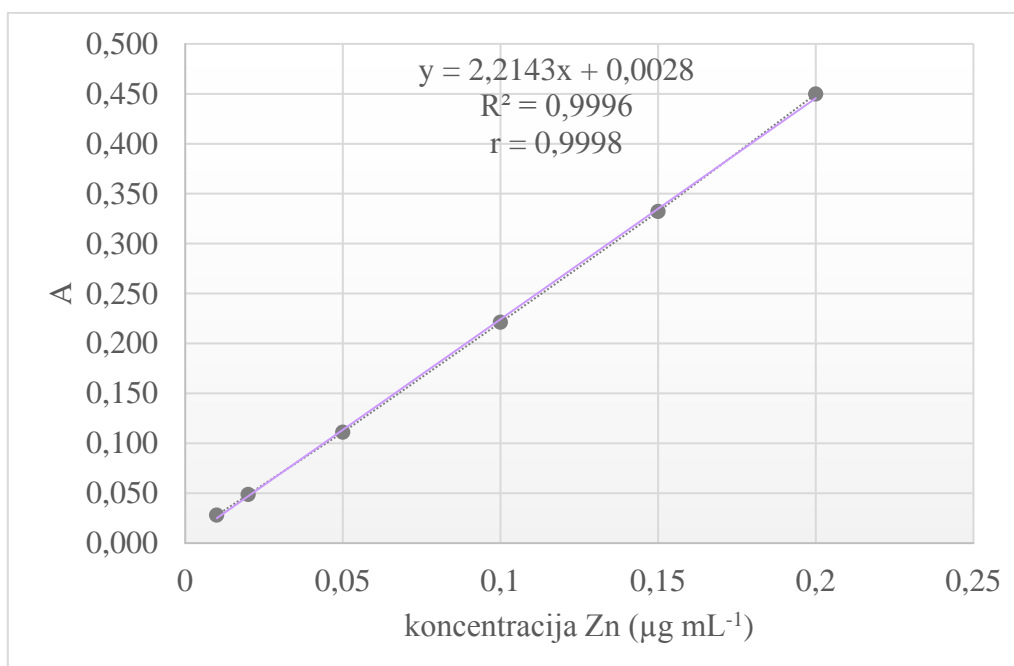
U ovome radu ispitan je utjecaj kriomljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta na biodostupnost bakra, cinka i magnezija nakon *in vitro* intestinalne probave. Također, u istim uzorcima određen je i udio fitata te je ispitan utjecaj kriomljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta na njen udio.

### **4.1. UTJECAJ KRIOMLJEVENJA I ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA BIODOSTUPNOST BAKRA, CINKA I MAGNEZIJA**

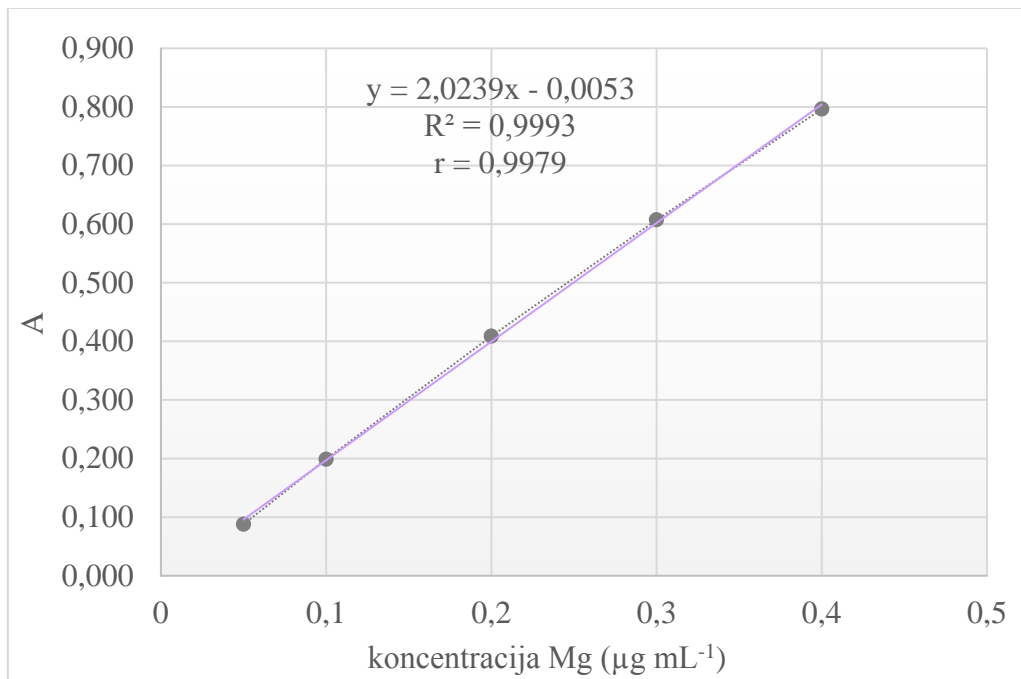
Svi uzorci tretirani su kriomljevenjem i ultrazvukom visokog intenziteta prema postupku i uvjetima opisanima u prethodnim poglavljima. Osim u tretiranim uzorcima, koncentracija analita određivana je i u netretiranim uzorcima. Kako bi se odredila koncentracija analita u uzorku za svaki ispitivani element pripremljeni su baždarni dijagrami s 5 ili više otopina poznatih koncentracija. Na Slikama 7., 8. i 9. grafički su prikazane ovisnosti apsorbancije o koncentracijama pojedinog analita uz istaknute jednadžbe regresijskog pravca i koeficijente korelacije. Pomoću navedenih jednadžbi određene su koncentracije analita u uzorku. Koeficijent korelacije u svim slučajevima je veći od 0,99 što potvrđuje da je mjereni parametar proporcionalan koncentraciji analita te da je metoda linearna u ispitanom području.



**Slika 7.** Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji bakra ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )



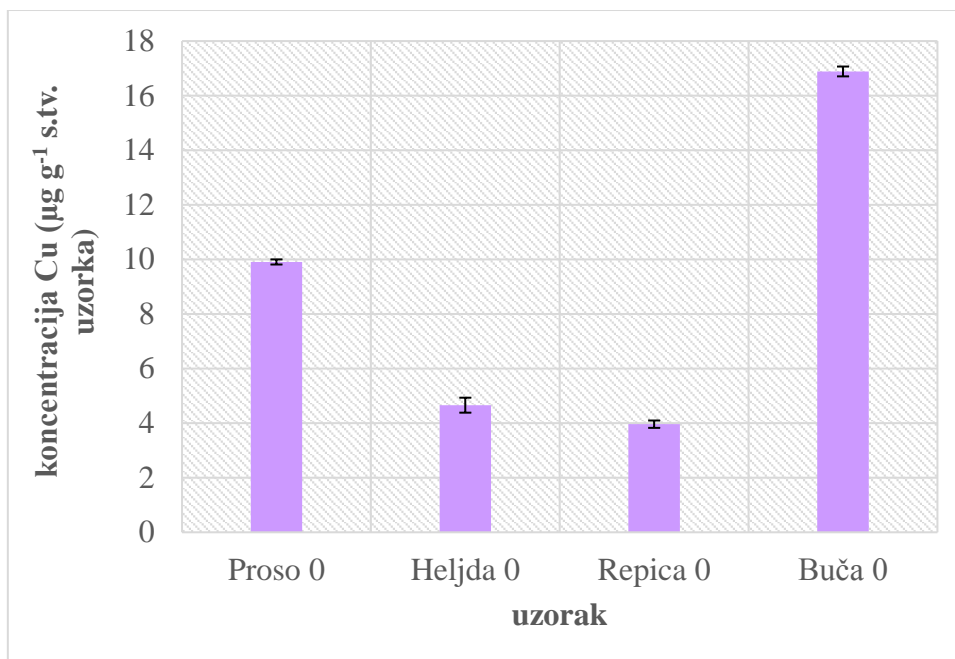
**Slika 8.** Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji cinka ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )



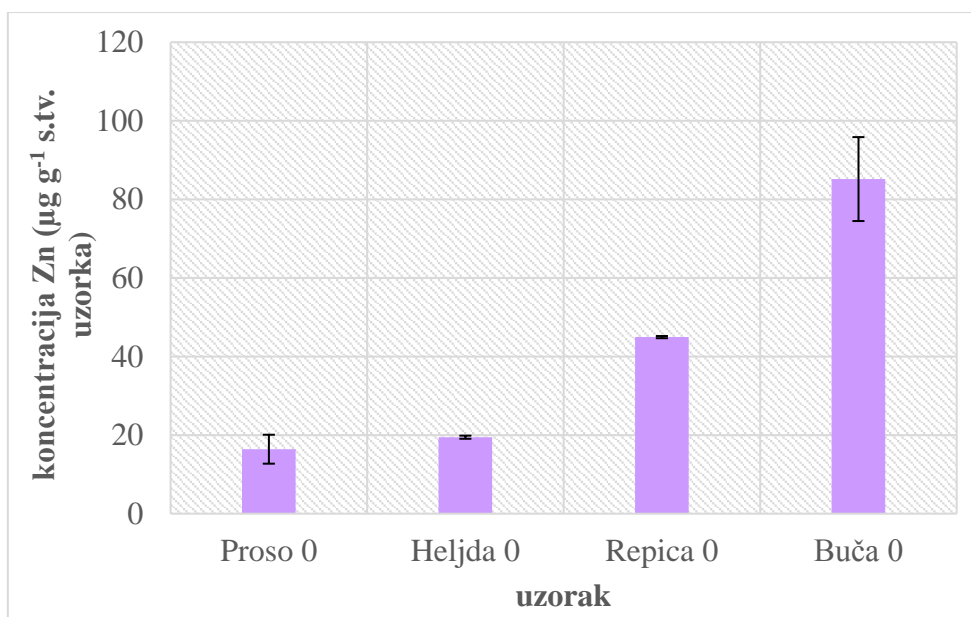
**Slika 9.** Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji magnezija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Nakon pripreme baždarnih dijagrama, otopine pepela za svaki tip uzorka pripremljene su prema postupku opisanom u poglavlju 3.3. te im je izmjerena apsorbancija na prethodno opisani način. Pomoću jednadžbi regresijskih pravaca iz izmjerenih apsorbancija određene su ukupne koncentracije pojedinog analita u uzorcima te su navedene u nastavku teksta.

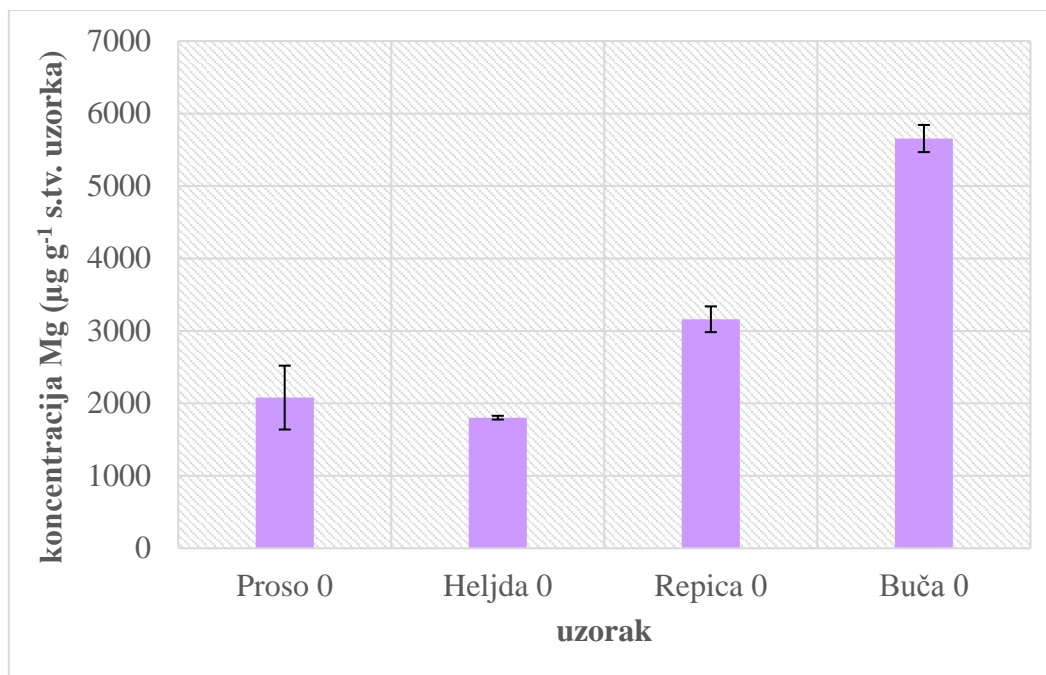
Na Slikama 10., 11., 12. prikazane su dobivene vrijednosti koncentracije bakra, cinka i magnezija izražene na suhu tvar u netretiranim uzorcima posija prosa, ljuski heljde, pogače uljane repice i bučine pogače.



**Slika 10.** Koncentracija Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$  s. tv.) u uzorcima posija prosa, ljuski heljde, pogače uljane repice i bučine pogače



**Slika 11.** Koncentracija Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$  s. tv.) u uzorcima posija prosa, ljuski heljde, pogače uljane repice i bučine pogače



**Slika 12.** Koncentracija Mg ( $\mu\text{g g}^{-1}$  s. tv.) u uzorcima posija prosa, ljuski heljde, pogače uljane repice i bučine pogače

Koncentracija bakra u uzorku posija prosa iznosila je  $9,9 \mu\text{g g}^{-1}$ , u uzorku ljuski heljde  $4,7 \mu\text{g g}^{-1}$ , u uzorku pogače uljane repice  $4,0 \mu\text{g g}^{-1}$  i u uzorku bučine pogače  $16,9 \mu\text{g g}^{-1}$  (Slika 10).

Koncentracija cinka u uzorku posija prosa iznosila je  $16,4 \mu\text{g g}^{-1}$ , u uzorku ljuski heljde  $19,5 \mu\text{g g}^{-1}$ , u uzorku pogače uljane repice  $44,9 \mu\text{g g}^{-1}$  i u uzorku bučine pogače  $85,2 \mu\text{g g}^{-1}$  (Slika 11).

Koncentracija magnezija u uzorku posija prosa iznosila je  $2080 \mu\text{g g}^{-1}$ , u uzorku ljuski heljde  $1802 \mu\text{g g}^{-1}$ , u uzorku pogače uljane repice  $3160 \mu\text{g g}^{-1}$  i u uzorku bučine pogače  $5655 \mu\text{g g}^{-1}$  (Slika 12).

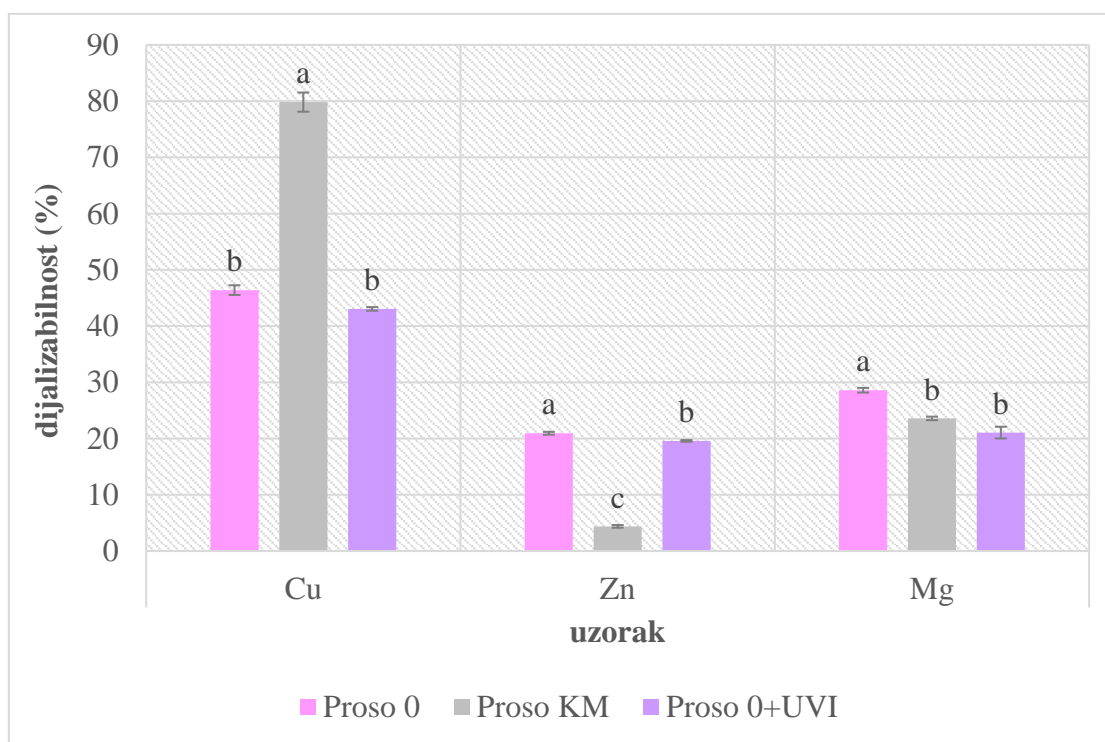
Nutritivna vrijednost hrane od velike je važnosti za ljudsko zdravlje zato što nutritivno bogata hrana osigurava pravilan razvoj i povećanje općenitog zdravlja čovjeka (Singh i Raghuvanshi, 2012). U radu Platel i sur. (2010) naveden je mineralni sastav zrna prosa. Koncentracija bakra bila je  $0,20 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , a koncentracija cinka  $1,44 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Vrijednosti za bakar niže su od vrijednosti dobivenih u ovom radu pod pretpostavkom da su posije prosa bogatije vitaminima i mineralima koji su većinom zastupljeni u aleuronskom sloju zrna (Latunde-Dada i sur., 2014). Ikeda i Yamashita (1994) određivali su koncentracije cinka i bakra u zrnu heljde i heljdinom

brašnu različitog podrijetla. Koncentracija cinka bila je u rasponu 1,37 – 2,73 mg 100 g<sup>-1</sup>, a koncentracija bakra u rasponu 0,41 – 0,68 mg 100 g<sup>-1</sup> ovisno o uzorku.

Glew i sur. (2006) ispitivali su koncentracije mineralnih tvari u bučnim sjemenkama. Dobivene vrijednosti su: 15,4 µg g<sup>-1</sup> bakra, 113 µg g<sup>-1</sup> cinka i 5690 µg g<sup>-1</sup> magnezija.

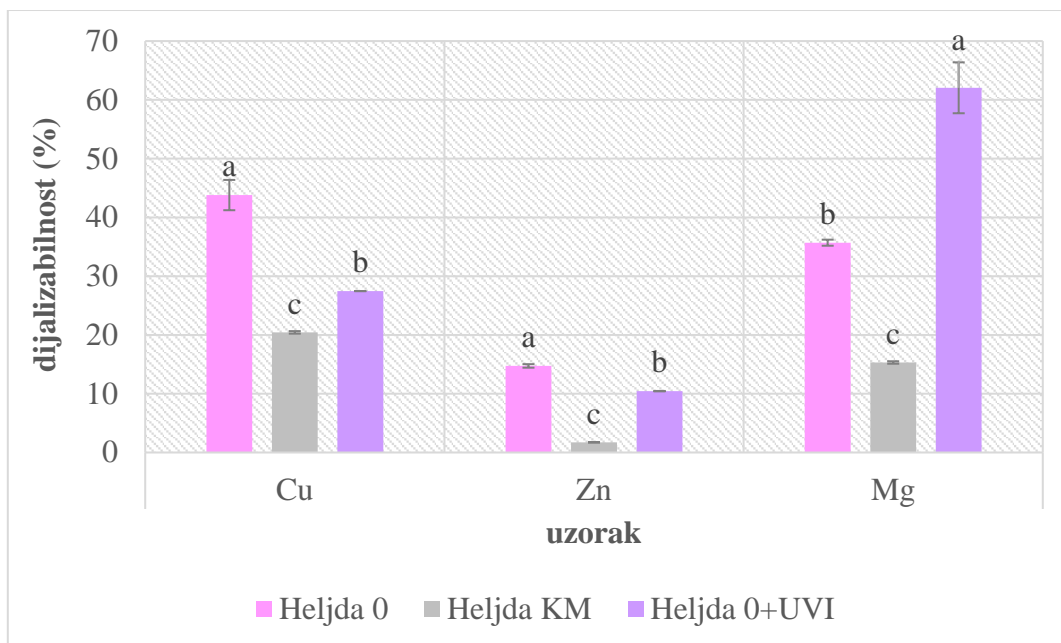
Biodostupnost mineralnih tvari određena je *in vitro* intestinalnom metodom za određivanje dijalizabilnosti opisanom u poglavlju 3.2. Tim postupkom dobiveni su dijalizati iz kojih su određene koncentracije analita na isti način kao i za otopine pepela. Postotak dijalizabilnosti (biodostupnost) izračunat je kao omjer koncentracije analita u dijalizatu i koncentracije analita u otopini pepela.

Na Slikama 13., 14., 15., 16. prikazane su dobivene vrijednosti postotka dijalizabilnosti bakra, cinka i magnezija u uzorcima posija prosa, ljuski heljde, pogače uljane repice i bučine pogače.

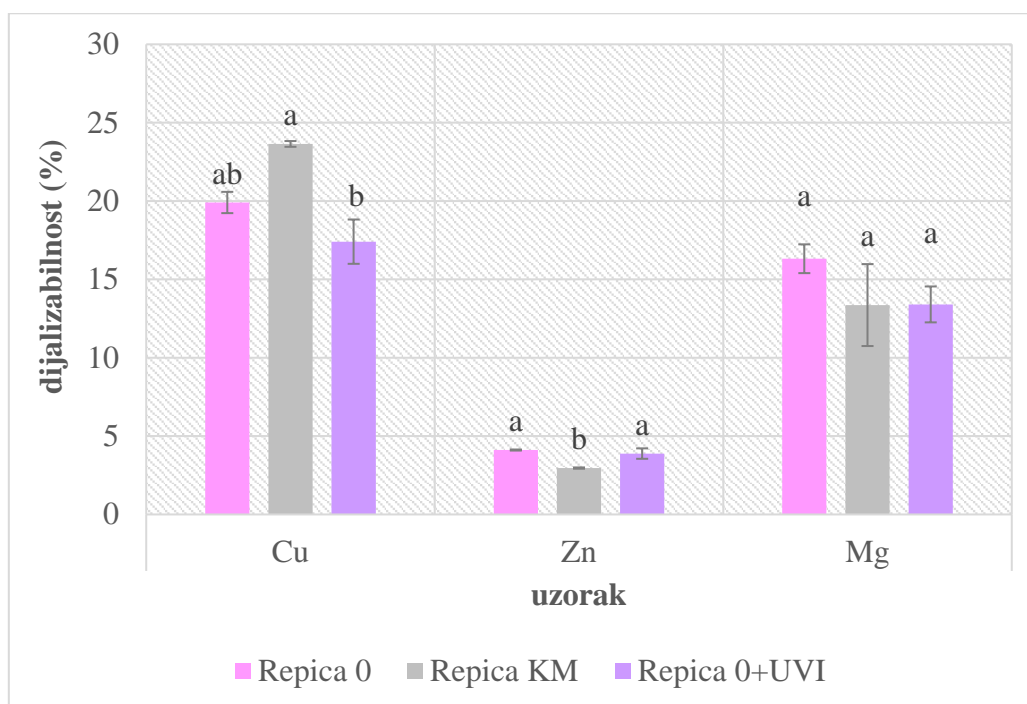


**Slika 13.** Dijalizabilnost Cu, Zn i Mg (%) u netretiranom, kriomljevenom i ultrazvučno tretiranom uzorku posija prosa (različitim slovima su označene značajne razlike između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ))

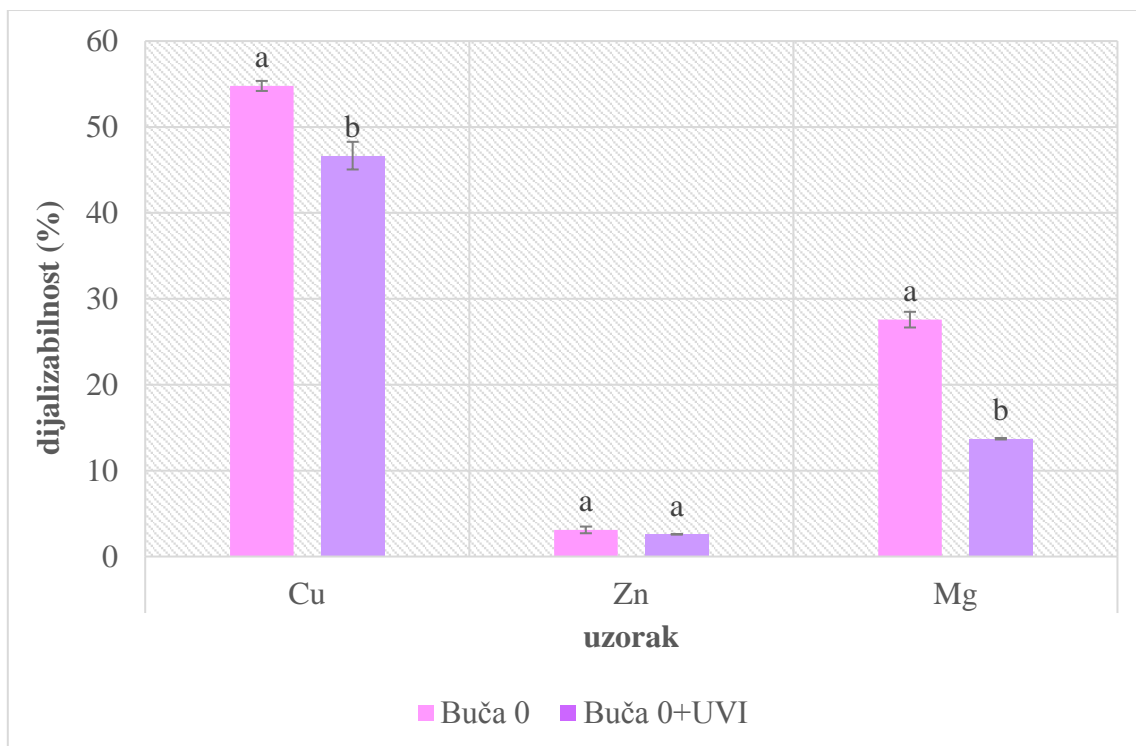




**Slika 14.** Dijalizabilnost Cu, Zn i Mg (%) u netretiranom, kriomljevenom i ultrazvučno tretiranom uzorku ljuski heljde (različitim slovima su označene značajne razlike između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ))



**Slika 15.** Dijalizabilnost Cu, Zn i Mg (%) u netretiranom, kriomljevenom i ultrazvučno tretiranom uzorku pogače uljane repice (različitim slovima su označene značajne razlike između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ))



**Slika 16.** Dijalizabilnost Cu, Zn i Mg (%) u netretiranom i ultrazvučno tretiranom uzorku bučine pogače (različitim slovima su označene značajne razlike između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ))

Iz navedenih rezultata vidljivo je da je kriomljevenjem došlo do povećanja dijalizabilnosti bakra u uzorku posija prosa za 73,9 % dok ultrazvuk nije pokazao značajan utjecaj na njegovu dijalizabilnost u odnosu na netretirani uzorak. Također je vidljivo da je kriomljevenjem došlo do smanjenja dijalizabilnosti cinka za 80,9 %, a kod tretmana ultrazvukom za 4,8 % u odnosu na netretirani uzorak. Kod magnezija je kriomljevenjem došlo do smanjenja dijalizabilnosti za 17,9 %, a kod tretmana ultrazvukom za 25,0 % u odnosu na netretirani uzorak (Slika 13).

Kriomljevenjem je došlo do smanjenja dijalizabilnosti bakra u uzorku ljuski heljde za 54,5 %, a kod tretmana ultrazvukom za 38,6 % u odnosu na netretirani uzorak. Također je vidljivo da je kriomljevenjem došlo do smanjenja dijalizabilnosti cinka za 86,7 %, a kod tretmana ultrazvukom za 33,3 % u odnosu na netretirani uzorak. Kod magnezija je kriomljevenjem došlo do smanjenja dijalizabilnosti za 58,3 %, a kod tretmana ultrazvukom do povećanja za 72,2 % u odnosu na netretirani uzorak (Slika 14).

Kriomljevenje i tretman ultrazvukom nisu pokazali značajan utjecaj na dijalizabilnost bakra u uzorku pogače uljane repice. Također je kriomljevenjem došlo do smanjenja dijalizabilnosti cinka za 25,0 %, dok kod tretmana ultrazvukom nije zamijećen značajan utjecaj na njegovu

dijalizabilnost. Dijalizabilnost magnezija se značajno ne mijenja niti kriomljevenjem niti ultrazvučnim tretmanom (Slika 15).

Vidljivo je smanjenje dijalizabilnosti bakra u ultrazvukom tretiranom uzorku bučine pogače za 14,5 % u odnosu na netretirani uzorak. Također je vidljivo da tretman ultrazvukom nije pokazao značajan utjecaj na dijalizabilnost cinka. Kod magnezija tretman ultrazvukom pokazuje manju dijalizabilnost za 50,0 % u odnosu na netretirani uzorak (Slika 16).

Biodostupnost mineralnih tvari definira se kao količina unesenih mineralnih tvari koje su potencijalno dostupne za apsorpciju te je ovisna o probavi i oslobađanju iz matriksa hrane (Fernandez-Garcia i sur., 2009). U radu Platel i sur. (2010) ispitivana je biodostupnost bakra i cinka u uzorcima zrna prosa. Biodostupnost bakra iznosila je 45,1 %, dok je biodostupnost cinka iznosila 11 %. Slični rezultati dobiveni su i u radu Hemalatha i sur. (2007) koji su određivali sadržaj i biodostupnost cinka i željeza u žitaricama i mahunarkama, među kojima se nalazi i zrno prosa. Biodostupnost cinka u zrnu prosa iznosila je 8,31 %.

Ikeda i sur. (2004) određivali su biodostupnost mineralnih tvari različitih uzoraka brašna heljde nakon *in vitro* intestinalne probave. Dobivene vrijednosti biodostupnosti su: 59,3 – 79,0 % bakra, 61,2 – 81,3 % cinka i 24,5 – 39,1 % magnezija.

Iz dobivenih rezultata utvrđena je značajno veća dijalizabilnost bakra u kriomljevenom uzorku posija prosa, manja dijalizabilnost u kriomljevenom uzorku ljuski heljde dok kod pogače uljane repice nije zamijećen značajan utjecaj. Utvrđena je manja dijalizabilnost cinka kod kriomljevenih uzoraka posija prosa, ljuski heljde i pogače uljane repice. Također utvrđena je manja dijalizabilnost magnezija kod kriomljevenih uzoraka posija prosa i uzorka ljuski heljde, dok kod pogače uljane repice nije bilo značajnog utjecaja.

Procesiranje hrane može poboljšati biodostupnost nutrijenata, uslijed utjecaja na razaranje stanične stijenke biljnih stanica, dislokacije nutrijenata ili transformacije u aktivnije molekulske strukture. Neki nutrijenti u biljkama nalaze se zaštićeni od degradacije u stanici, bilo da su vezani za membranu, prisutni u organelima ili vezani za staničnu stijenku te zbog toga njihova biodostupnost može biti smanjena. Fizičko razaranje stanice postupkom kao što je mljevenje razara staničnu stijenku i time dolazi do oslobađanja nutrijenata iz matriksa hrane čime oni postaju lakše dostupni za intestinalnu apsorpciju (Parada i Aguilera, 2007).

Latunde-Dada i sur. (2014) istraživali su utjecaj usitnjavanja pšeničnog brašna do veličine čestica 10 – 20  $\mu\text{m}$  na biodostupnost željeza. Mljevenje do veličine čestica 10 – 20  $\mu\text{m}$  rezultiralo je razaranjem aleuronskog sloja, no nije došlo do gubitka mineralnih tvari u

dobivenom brašnu u odnosu na brašno dobiveno standardnim mljevenjem. Također, biodostupnost željeza (određena *in vitro* metodom) iz tako proizvedenog brašna se povećala za oko 30 %.

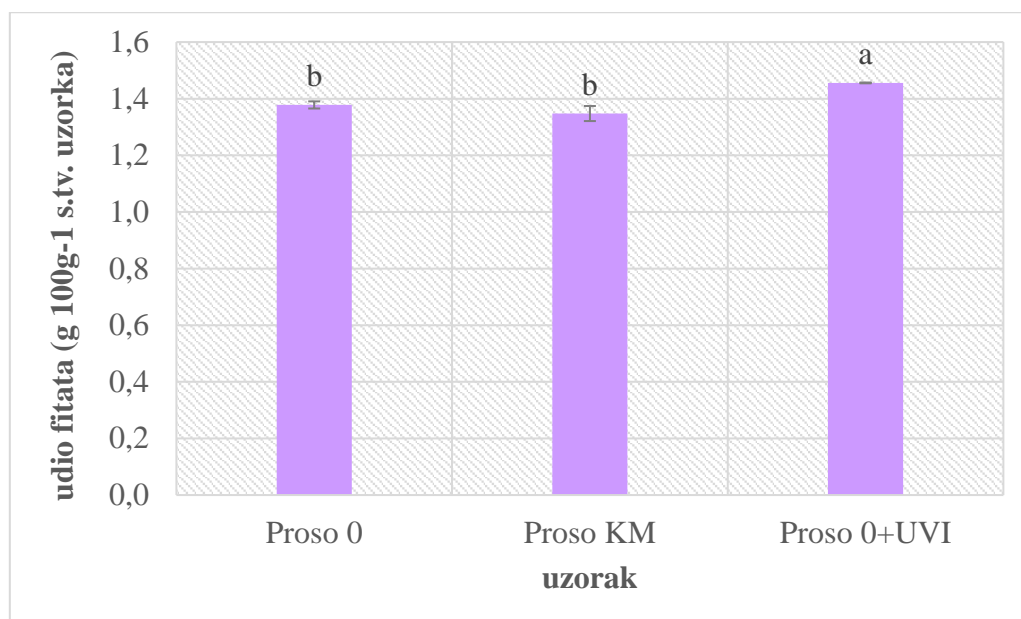
Iz dobivenih rezultata utvrđena je manja dijalizabilnost bakra u ultrazvučno tretiranim uzorcima ljuski heljde i bučine pogače dok kod posija prosa i pogače uljane repice nije utvrđen značajan utjecaj. Utvrđeno je smanjenje dijalizabilnosti cinka kod ultrazvučno tretiranih uzoraka posija prosa i ljuski heljde dok kod pogače uljane repice i bučine pogače nije zamijećen značajan utjecaj. Također je utvrđeno smanjenje dijalizabilnosti magnezija kod ultrazvučno tretiranih uzoraka posija prosa i bučine pogače, povećanje kod uzorka ljuski heljde, dok kod uzorka pogače uljane repice nije zamijećen značajan utjecaj.

Ultrazvuk je široko proučavan u svrhu povećanja ekstrakcije različitih sastojaka. Pretpostavljeno je kako ultrazvuk povećava brzinu prijenosa mase na dva načina. S jedne strane, proizvodi mikro pare koje imaju mehanički efekt na površinu sirovog materijala te uništavaju površinu i smanjuju veličinu čestica. Dok s druge strane, visoka temperatura i tlak olakšavaju uništenje površine materijala što rezultira povećanjem ukupne površine i povećanjem količine otpuštenih sastojaka (Tao i Sun, 2015; Kaya i sur., 2017). No unatoč već brojnim provedenim istraživanjima, još uvijek nema istraživanja koja bi ispitivala njegov utjecaj na biodostupnost mineralnih tvari.

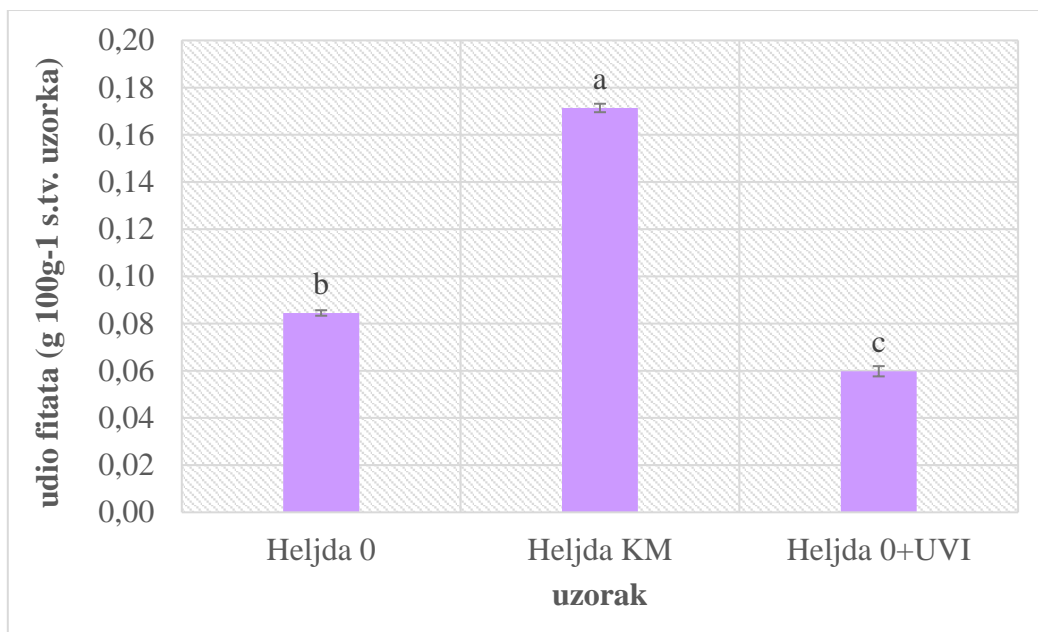
## 4.2. UTJECAJ KRIOMLJEVENJA I ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA UDIO FITATA

Fitati se oni akumuliraju u različitim dijelovima žitarica i mahunarki kao npr. u aleuronskom sloju i perikarpu nekih žitarica (Gupta i sur. 2015; Steadman i sur., 2001). Prisutni su u obliku netopljivih mineralnih kompleksa i njihov udio može varirati ovisno o vrsti, ekološkim uvjetima, tipu tla, uvjetima navodnjavanja te godini i mjestu kultivacije (Urbano i sur., 2000). Dobili su naziv "anti-nutrijenti" zbog njihovog afiniteta da vežu viševalentne metalne ione, posebice cink, željezo i kalcij te utječu na njihovu topljivost, probavljivost, funkcionalnost i apsorpciju. Visoki udio fitata u ljudskoj prehrani može značajno smanjiti apsorpciju mineralnih tvari zbog toga što su takvi kompleksi netopljivi pri fiziološkoj pH vrijednosti (Ertas, 2013).

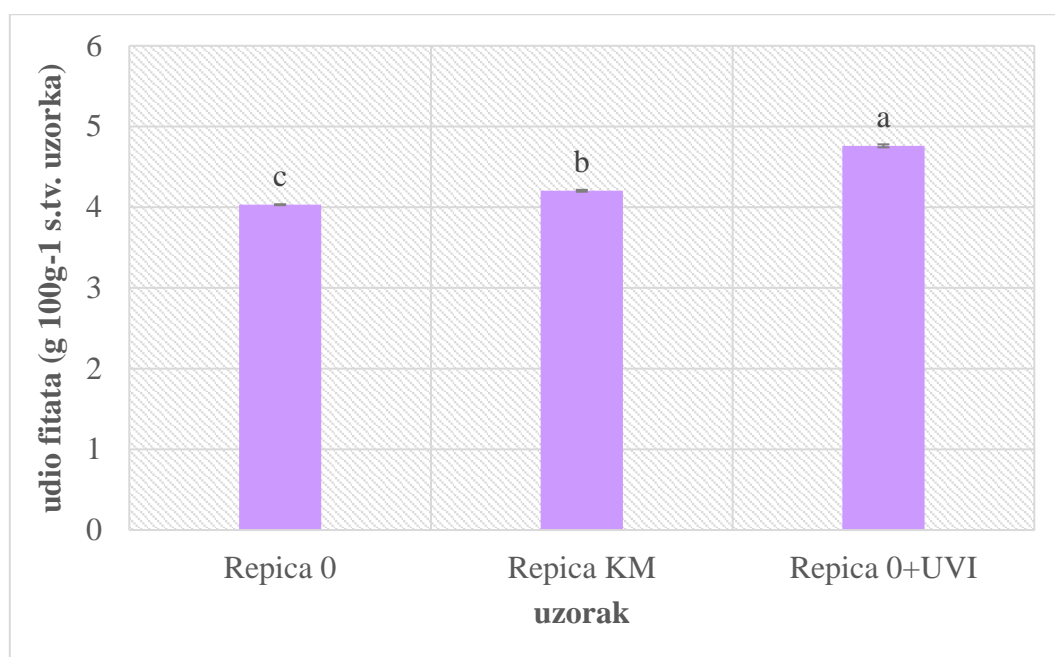
Udio fitata u uzorcima posija prosa, ljuski heljde, pogače uljane repice i bučine pogače određen je prema postupku opisanom u poglavlju 3.6. Dobiveni rezultati grafički su prikazani na Slikama 17., 18., 19. i 20. te opisani u nastavku teksta.



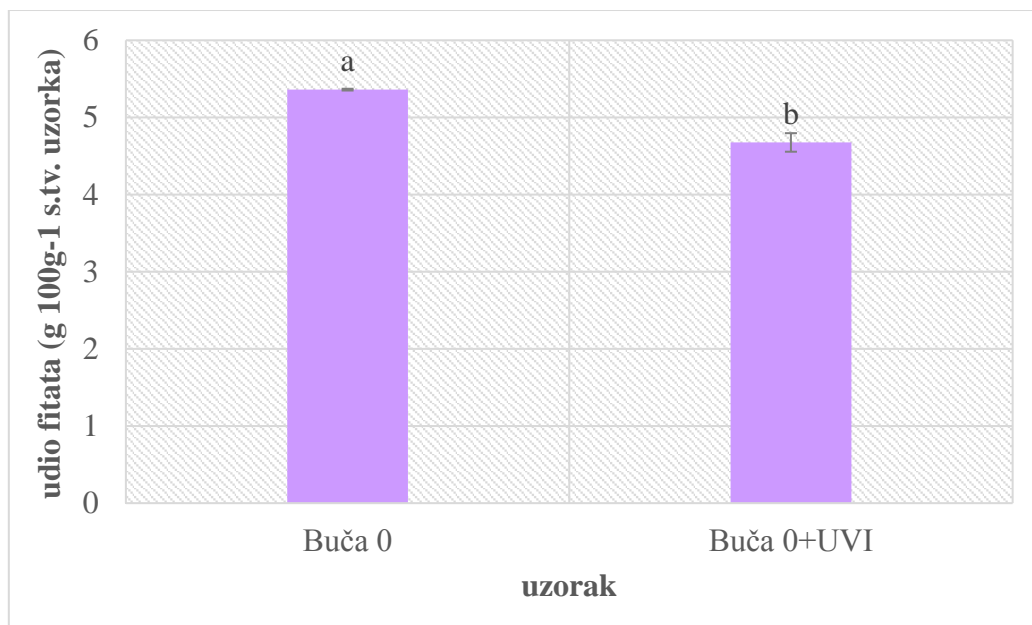
**Slika 17.** Udio fitata (g 100 g<sup>-1</sup> s. tv.) u netretiranom, kriomljevenom i ultrazvučno tretiranom uzorku posija prosa (različitim slovima su označene značajne razlike između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ))



**Slika 18.** Udio fitata (g 100 g<sup>-1</sup> s. tv.) u netretiranom, kriomljevenom i ultrazvučno tretiranom uzorku ljuski heljde (razliĉitim slovima su oznaĉene znaĉajne razlike izmeĊu dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ))



**Slika 19.** Udio fitata (g 100 g<sup>-1</sup> s. tv.) u netretiranom, kriomljevenom i ultrazvuĉno tretiranom uzorku pogaĉe uljane repice (razliĉitim slovima su oznaĉene znaĉajne razlike izmeĊu dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ))



**Slika 20.** Udio fitata (g 100 g<sup>-1</sup> s. tv.) u netretiranom i ultrazvučno tretiranom uzorku bučine pogače (različitim slovima su označene značajne razlike između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ))

Udio fitata u uzorku netretiranih posija prosa iznosio je 1,38 g 100 g<sup>-1</sup> suhe tvari. uzorka, za kriomljevene 1,35 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka, a za posije tretirane ultrazvukom 1,46 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka (Slika 17). Statističkom obradom podataka nije utvrđen značajan utjecaj tretmana kriomljevenjem, no utvrđeno je značajno povećanje udjela fitata za 5,7 % kod tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na netretirani uzorak.

Udio fitata u netretiranom uzorku ljuski heljde iznosio je 0,08 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka, u kriomljevenom 0,17 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka, a u uzorku heljde tretirane ultrazvukom 0,06 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka (Slika 18). Statističkom obradom podataka utvrđeno je značajno povećanje udjela fitata za 103,6 % kod kriomljevenja te značajno smanjenje njihovog udjela za 28,6 % kod tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na netretirani uzorak.

Udio fitata u netretiranom uzorku pogače uljane repice iznosio je 4,03 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka, u kriomljevenom 4,20 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka, a u uzorku pogače uljane repice tretiranu ultrazvukom 4,76 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka (Slika 19). Statističkom obradom podataka utvrđeno je značajno povećanje udjela fitata za 4,3 % kod kriomljevenja i 18,1 % kod tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na netretirani uzorak.

Udio fitata u netretiranom uzorku bučine pogače iznosio je 5,36 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka, a u uzorku pogače tretirane ultrazvukom 4,68 g 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka (Slika 20). Statističkom

obradom rezultata utvrđeno je značajno smanjenje udjela fitata za 12,8 % kod uzorka tretiranog ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na netretirani uzorak.

Iz dobivenih rezultata utvrđeno je povećanje udjela fitata kod kriomljevenih uzoraka ljuski heljde i pogače uljane repice, dok kod posija prosa nema značajnog utjecaja na njihov udio u odnosu na netretirani uzorak. Također je vidljivo da smanjenje udjela fitata kod ultrazvukom tretiranih uzoraka ljuski heljde i bučine pogače, dok je kod posija prosa i pogače uljane repice utvrđeno povećanje udjela u odnosu na netretirani uzorak.

Suma i Urooj (2011) ispitivali su udio nutrijenata, antinutrijenata i biodostupnost mineralnih tvari u različitim frakcijama prosa mljevenih u cjelovito brašno, polu rafinirano brašno i frakciju bogatu prosenim posijama. U rezultatima je prikazano kako je udio fitata značajno niži u polu rafiniranom brašnu, dok frakcija bogata posijama sadrži značajno veći udio fitata. Isti rezultati dobiveni su i u radu Steadman i sur. (2001) gdje je ispitivan udio fitata u različitim mljevenim frakcijama heljde te je zaključeno kako heljdine posije sadrže najveći udio fitata.

U radu Antoine i sur. (2004) ispitivan je utjecaj veličine čestica na udio fitata u posijama pšenice. U njihovom istraživanju pokazalo se kako kod mljevenja 4 do 16 min udio fitata raste proporcionalno sa smanjenjem veličine čestica ( $< 60 \mu\text{m}$ ), pod pretpostavkom da je zbog veće površine manjih čestica i veća dostupnost fitata.

U radu Ertas (2013) ispitivan je utjecaj ultrazvuka na udio fitata u uzorcima graha, slanutka, soje, pšenice i kukuruza. Tretman uzoraka ultrazvukom pri 25 °C i 40 °C smanjio je udio fitata za 18,2 % odnosno 30,7 %. Dobiveni rezultati poklapaju se s dobivenim mjerenjima u ovom radu za uzorke ljuski heljde i bučine pogače, dok kod prosa i pogače uljane repice nije utvrđen isti utjecaj. U radu Kaya i sur. (2017) također je ispitivan utjecaj ultrazvuka na udio fitata u mahunarkama te se pokazalo kako ultrazvuk nema značajnog utjecaja na udio fitata.

U Tablici 5. prikazani su koeficijenti korelacije dijalizabilnosti bakra, cinka i magnezija s udjelom fitata u uzorcima.

**Tablica 5.** Koeficijenti korelacije za dijalizabilnost mineralnih tvari s udjelom fitata u uzorcima

	% fitata
% dijalizabilnog bakra	-0,1053
% dijalizabilnog cinka	-0,5276*
% dijalizabilnog magnezija	-0,5526*

\* zvjezdicom su označene statistički značajne korelacije ( $p < 0,05$ )



Prema podacima u tablici vidljivo je da je koncentracija fitata u negativnoj korelaciji s dijalizabilnosti cinka i magnezija, tj. dijalizabilnost se smanjuje s povećanje koncentracije fitata. Hemalatha i sur. (2007) su također utvrdili negativnu korelaciju dijalizabilnosti cinka i udjela fitata u prosu, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu.

## 5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata, rasprave i pregleda literature može se zaključiti:

1. U kriomljevenim uzorcima posija prosa utvrđena je veća biodostupnost bakra, manja biodostupnost utvrđena je u uzorcima ljuški heljde dok kod pogače uljane repice nije zamijećen statistički značajan utjecaj u odnosu na netretirani uzorak. U kriomljevenim uzorcima posija prosa, ljuški heljde i pogače uljane repice utvrđena je manja biodostupnost cinka. Također utvrđena je manja biodostupnosti magnezija u kriomljevenim uzorcima posija prosa i ljuški heljde, dok kod pogače uljane repice nije zamijećen značajan utjecaj.
2. U uzorcima ljuški heljde i bučine pogače tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta utvrđena je manja biodostupnost bakra dok kod posija prosa i pogače uljane repice nije utvrđen značajan utjecaj u odnosu na netretirani uzorak. Utvrđeno je smanjenje biodostupnosti cinka u uzorcima posija prosa i ljuški heljde dok kod pogače uljane repice i bučine pogače nije zamijećen značajan utjecaj. Također je utvrđeno smanjenje biodostupnosti magnezija u uzorcima posija prosa i bučine pogače, povećanje kod uzorka ljuški heljde, dok kod uzorka pogače uljane repice nije utvrđen značajan utjecaj.
3. U kriomljevenim uzorcima ljuški heljde i pogače uljane repice utvrđeno je povećanje udjela fitata, dok kod posija prosa nije utvrđen značajan utjecaj na njihov udio u odnosu na netretirani uzorak. Utvrđen je manji udio fitata u uzorcima ljuški heljde i bučine pogače tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta dok kod posija prosa i pogače uljane repice nije utvrđen značajan utjecaj.
4. Primjena inovativnih tehnika kriomljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta različito djeluje na biodostupnost mineralnih tvari i udio fitata ovisno o primijenjenom tretmanu i korištenom nusproizvodu mlinske ili uljarske industrije.

## 6. LITERATURA

- Abdelrahman, A., Hosney, R. C., Varriano-Marston, E. (1984) The Proportions and Chemical Compositions of Hand-Dissected Anatomical Parts of Pearl Millet. *J. Cereal Sci.* **2**, 127-133.
- Anonymous 1 (2019) CryoMill, <<https://www.retsch.com/products/milling/ball-mills/mixer-mill-cryomill/function-features/>>. Pristupljeno 10. lipnja 2019.
- Antoine, C., Lullien-Pellerin, V., Abecassis, J., Rouau, X. (2004) Effect of wheat bran ball-milling on fragmentation and marker extractability of the aleurone layer. *J. Cereal Sci.* **40**, 275-282.
- Balasubramanian, S., Gupta, M. K., Singh, K. K. (2012) Cryogenics and its Application with Reference to Spice Grinding: A Review. *Crc. Cr. Rev. Food Sci.* **52**(9), 781-794.
- Bonafaccia, G., Fabjan, N. (2003) Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. *Zbiornik Biotehniške Fakultet Univerze v Ljubljani* **81**(2), 349-355.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović S., Bosiljkov, T. (2009a) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**(1-2), 32-37.
- Brnčić, M., Markučić, D., Omelić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2009b) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri otkrivanju stranih tijela u prehrambenim sustavima. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**(1-2), 18-22.
- Buratović, A. (2019) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na bioaktivne spojeve heljdinih ljuskica. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Caili, F., Huan, S., Quanhong, L. (2006) A Review on Pharmacological Activities and Utilization Technologies of Pumpkin. *Plant Food Hum. Nutr.* **61**(2), 70-77.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., Frigola, A. (2014) Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **13**, 155-171.

- Culcuoglu, E., Unay, E., Karaosmanoglu, F. (2002) Rapeseed Cake as a Biomass Source. *Energ. Source* **24**(4), 329-336.
- Čukelj Mustač, N., Voučko, B., Novotni, D., Drakula, S., Gudelj, A., Dujmić, F., Čurić, D. (2019) Optimization of High Intensity Ultrasound Treatment of Proso Millet Bran to Improve Physical and Nutritional Quality. *Food Technology and Biotechnology*, **57**(2), 183-190.
- Desai, V., Kaler, S. G. (2008) Role of copper in human neurological disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* **88** (3), 855-858.
- Devittori, C., Gumy, D., Kusy, A., Colarow, L., Bertoli, C., Lambelet, P. (2000) Supercritical Fluid Extraction of Oil from Millet Bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **77**(6), 573-579.
- Egli, I., Davidsson, L., Juillerat, M. A., Barclay, D., Hurrell, R. (2002) The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. *J. Food Sci.* **67**, 3484-3488.
- Erdman, J. W., Pneros-Schneier, A. G. (1994) Factors affecting nutritive value in processed foods. U: Modern nutrition in health and disease (Shils, M. E., Olson, J. A., Shile, M., ured.), Lea & Febiger, Philadelphia, 1569-1578.
- Ertas, N. (2013) Dephytinization processes of some legume seeds and cereal grains with ultrasound and microwave applications. *Legume Res.* **36**, 414-421.
- Etcheverry, P., Grusak, M. A., Fleige, L. E. (2012) Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc and vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D, and E. *Front. Physiol.* **3**, 317.
- Fabris, N., Mocchegiani, E. (1995) Zinc, human diseases and aging. *Aging Clin. Exp. Res.* **7** (2), 77-93.
- Fairweather-Tait, S. J., Hurrell, R. F. (1996) Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutr. Res. Rev.* **9**, 295-324.
- Fairweather-Tait, S. J., Southon, S. (2003) Bioavailability of nutrients. U: Encyclopedia of food sciences, food technology and nutrition, 2. izd. (Caballero, B., ured.), Academic Press, London, str. 478-484.
- Fernandez-Garcia, E., Carvajal-Lerida, I., Perez-Galvez, A. (2009) In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res.* **29**, 751-760.

- Ferreira, S. I. C., Bezerra, M. A., Santos, A. S., Santos, W. N. I., Novaes, C. G., Oliveira, O. M. C., Oliviera, M. I., Garcia, R. L. (2018) Atomic absorption spectrometry – A multi element technique. *Trend. Anal. Chem.* **100**, 1-6.
- Frossard, E., Bucher, M., Machler, F., Mozafar, A., Hurrell, R. (2000) Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 861-879.
- Gao, J., Kreft, I., Chao, G., Wang, Y., Liu, X., Wang, L., Wang, P., Gao, X., Feng, B. (2016) Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) starch, a side product in functional food production, as a potential source of retrograded starch. *Food Chem.* **190**, 552-558.
- Gharibzahedi, S. M. T., Jafari, S. M. (2017) The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends Food Sci. Tech.* **62**, 119-132.
- Gibson, R. S., Yeudall, F., Drost, N., Mitimuni, B. M., Cullinan, T. R. (2003) Experiences of a community-based dietary intervention to enhance micronutrient adequacy of diets low in animal source foods and high in phytate: a case study in rural Malawian children. *J. Nutr.* **133**(11), 3992-3999.
- Glew, R. H., Glew, R. S., Chuang, L. T., Huang, Y. S. Millson, M., Constans, D., Vanderjagt, D. J. (2006) Amino Acid, Mineral and Fatty Acid Content of Pumpkin Seeds (*Cucurbita spp*) and *Cyperus esculentus* Nuts in the Republic of Niger. *Plant Food Hum. Nutr.* **61**, 51-56.
- Greiner, R., Konietzny, U. (2006) Phytase for Food Application. *Food Technol. Biotech.* **44**(2), 125-140.
- Gupta, R. K., Gangoliya, S. S., Singh, N. K. (2013) Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *J. Food Sci. Tech.* **52**(2), 676-684.
- Gupta, R., K., Gangoliya, S. S., Singh, N. K. (2015) Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 676-684.
- Hemalatha, S., Platel, K., Srinivasan, K. (2007) Zinc and iron contents and their bioaccessibility in cereals and pulses consumed in India. *Food Chem.* **102**, 1328-1336.

- Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* **59**(1), 65-69.
- Hotz, C., Gibson, R. S. (2007) Traditional Food-Processing and Preparation Practices to Enhance the Bioavailability of Micronutrients in Plant-Based Diets. *The Journal of Nutrition* **137**(4), 1097-1100.
- Ikeda, S., Yamashita, Y. (1994) Buckwheat as a dietary source of zinc, copper and manganese. *Fagopyrum* **14**, 29-34.
- Ikeda, S., Tomura, K., Lin, L., Kreft, I. (2004) Nutritional characteristics of minerals in Tartary buckwheat. *Fagopyrum* **21**, 79-84.
- Jodral-Segado, A. M., Navarro-Alarcon, M., Lopez-G de la Serrana, H., Lopez-Martinez, M. (2003) Magnesium and calcium contents in foods from SE Spain: influencing factors and estimation of daily dietary intakes. *The Science of the Total Environment* **312**, 47-58.
- Kaya, E., Tuncel, N. B., Tuncel, N. Y. (2017) The effect of ultrasound on some properties of pulse hulls. *J. Food Sci. Technol.* **54**(9), 2779-2788.
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2010) Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* **120**, 945-959.
- Latunde-Dada, G. O., Li, X., Parodi, A., Edwards, C. H., Ellis, P. R., Sharp, P. A. (2014) Micromilling Enhances Iron Bioaccessibility from Wholegrain Wheat. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 11222-11227.
- Lavernia, E. J., Schoenung, J. M. (2008) Cryomilled nanostructured materials: Processing and properties. *Mater. Sci. Eng.* **493**, 207-214.
- Lei, X. G., Porres, J. M. (2003) Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1787-1794.
- Leming, R., Lember, A. (2005) Chemical Composition of Expeller-extracted and Cold-pressed Rapeseed Cake. *Agraarteadus* **16**, 103-109.
- Leopold, K., Philippe, A., Worle, K., Schaumann, G. E. (2016) Analytical strategies to the determination of metal-containing nanoparticles in environmental waters. *Trend. Anal. Chem.* **84**, 107-120.
- Li, A. R. (2003) *Fagopyrum*. U: Flora of China, (Zhengyi, W., Raven, P. H., ured.), Missouri Botanical Garden Press, Beijing, China.

- Lowe, N., Jackson, M. (2001) Advances in isotope methods for the analysis of trace elements in man, CRC Press, London.
- Lucke, F. K., Fritz, V., Tannhauser, K., Arya, A. (2018) Controlled fermentation of rapeseed presscake by *Rhizopus*, and its effect on some components with relevance to human nutrition. *Food Res. Int.* 726-732.
- Luten, J., Crews, H., Flynn, A., Van Dael, P., Kastenmayer, P., Hurrell, R., Deelstra, H., Shen, L. H., Fairweather-Tait, S., Hickson, K., Farre, R., Schlemmer, U., Frohlich, W. (1996) Interlaboratory Trial on the Determination of the *In Vitro* Iron Dialysability from Food. *J. Sci. Food Agric.* **72**, 415-424.
- Luterotti, S. (2013) Atomsko-apsorpcijska spektroskopija (s osnovama drugih atomskih spektroskopija), I. dio. U: Odabrane teme iz bioanalitike, 4. izd. (Čepelak, I., Nigović, B., ured.). Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 1-23.
- Mahan, L. K., Escott-Stump, S., Raymond, J. L., Krause, M. V. (2012) Krause's food & the nutrition care process, 13. izd. Elsevier Saunders, Missouri.
- Mamilović, K. (2018) Utjecaj kriomljevenja na udio sterola i prehrambenih vlakana pogače uljane repice. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Martins, Z. E., Pinho, O., Ferreira, I. M. P. I. V. O. (2017) Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. *Trends Food Sci. Tech.* **67**, 106-128.
- Megazyme (2017) Phytic acid (phytate)/ total phosphorus measured as phosphorus released by phytase and alkaline phosphatase. Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, A98 YV29, Ireland.
- Meghwal, M., Goswami, T. K. (2014) Comparative study on ambient and cryogenic grinding of fenugreek and black pepper seeds using rotor, ball, hammer and Pin mill. *Powder Technol.* **267**, 245-255.
- Miller, D. D. (2007) Minerals. U: Fennema's Food Chemistry, 4. izd. (Damodaran, S., Parkin, K. L., Fennema, O. R., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 523-571.
- Nosratpour, M., Jafari, S. M. (2018) Bioavailability of Minerals (Ca, Mg, Zn, K, Mn, Se) in Food Products. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
- Oatway, L., Vasanthan, T., Helm, J. H. (2001) Phytic acid. *Food Rev. Int.* **17**(4), 419-431.

- Parada, J., Aguilera, J. M. (2007) Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *J. Food Sci.* **72**(2), 21-32.
- Perčin, D., Radulović-Popović, Lj., Vaštag, Ž., Mađarev-Popović, S., Trivić, S. (2008) Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chem.* **115**, 753-757.
- Perkin-Elmer Corporation (1964) Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry.
- Perlas, L., Gibson, R. S. (2002) Use of soaking to enhance the bioavailability of iron and zinc from rice-based complementary foods used in the Philippines. *J. Sci. Food Agr.* **82**, 1115-1121.
- Platel, K., Eipeson, S. W., Srinivasan, K. (2010) Bioaccessible Mineral Content of Malted Finger Millet (*Eleusine coracana*), Wheat (*Triticum aestivum*), and Barley (*Hordeum vulgare*). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8100-8103.
- Pouzar, M., Krejčova, A., Černohorsky, T., Peškova, K. (2008) Study of contamination sources in the process of cryogenic grinding. *Talanta* **76**, 254-258.
- Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Batur, V., Muža, M. (2009) Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* **59**(4), 267-281.
- Režek Jambrak, A., Herceg, Z., Grbavac, J. (2014) Mogućnosti primjene ultrazvuka visoke snage u mesnoj industriji. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* **16**(4), 336-341.
- Rickard, S. E., Thompson, L. U. (1997) Interactions and Biological Effects of Phytic Acid. U: Antinutrients and Phytochemicals in Food (Shahidi, F., ured.). American Chemical Society, Washington, DC, str. 294-312.
- Sandberg, A. S., Brune, M., Carlsson, N. G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthen, L. (1999) Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 240-246.
- Singh, R. B., Khan, S., Chauhan, A. K., Singh, M., Jaglan, P., Yadav, P., Takahashi, T., Juneja, L. R. (2019) Millets as Functional Food, a Gift From Asia to Western World. *The Role of Functional Food Security in Global Health*, 457-468.
- Singh, P., Raghuvanshi, R. S. (2012) Finger millet for food and nutritional security. *Afr. J. Food Sci.* **6**(4), 77-84.



- Steadman, K. J., Burgoon, M. S., Lewis, B. A., Edwardson, S. E., Obendorf, R. L. (2001) Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions. *J. Sci. Food Agr.* **81**, 1094-1100.
- Suma, P. F., Urooj, A. (2011) Nutrients, antinutrients & bioaccessible mineral content (*in vitro*) of pearl millet as influenced by milling. *J. Food Sci. Technol.* **51**(4), 756-761.
- Tao, Y., Sun, D. W. (2015) Enhancement of food processes by ultrasound: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**, 921-932.
- Urbano, G., Juarado-Lopez, M., Aranda P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E., Porres, J. (2000) The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial fuction? *J. Physiol. Biochem.* **56**, 283-294.
- Vahčić, N., Hruškar, M., Marković, K. (2008) Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane, praktikum. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Voučko, B. (2018) Primjena nusproizvoda prehrambene industrije i inovativnih tehnologija u razvoju pekarskih proizvoda za oboljele od celijakije i šećerne bolesti. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Vranešić Bender, D., Krstev, S. (2008) Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. *Medicus* **17** (1), 19-25.
- Watzke, H. J. (1998) Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Trends Food Sci. Tech.* **9**, 320-327.
- Wilczek, M., Bertling, J., Hintemann, D. (2004) Optimised technologies for cryogenic grinding. *Int. J. Miner. Process.* **74**, 425-434.
- Yang, J., Gu, Z., Zhu, L., Cheng, L., Li, Z., Li, C., Hong, Y. (2019) Buckwheat digestibility affected by the chemical and structural features of its main components. *Food Hydrocolloid.*
- Zdunczyk, Z., Minakowski, D., Frejnagel, S., Flis, M. (1999) Comparative study of the chemical composition and nutritional value of pumpkin seed cake, soybean meal and casein. *Nahrung.* **43**, 392-395.
- Zhu, F. (2016) Buckwheat starch: structures, properties and applications. *Trends Food Sci. Tech.* **49**, 121-135.
- Zhu, Y., Chu, J., Lu, Z., Lv, F., Bie, X., Zhang, C., Zhao, H. (2018) Physicochemical and functional properties of dietary fiber from foxtail millet (*Setaria italic*) bran. *J. Cereal Sci.* **79**, 456-461.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Klara Poljanec

