

Utjecaj kriomlina i ultrazvuka na antioksidacijsku aktivnost pogače uljane repice

Alilović, Vesna

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:814420>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Vesna Alilović, 941/ PI

**UTJECAJ KRIOMLINA I
ULTRAZVUKA NA
ANTIOKSIDACIJSKU
AKTIVNOST POGAČE ULJANE
REPICE**

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

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

Posebno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Marku Obranoviću na prihvaćanju mentorstva, uloženom trudu i vremenu, iznimnoj susretljivosti te nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.

Iskreno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Sandri Balbino na pruženoj pomoći i lijepoj riječi.

Hvala mojim sestrama Dajani i Moniki, bratu Marku, cimerici Vali te svim dragim prijateljima na ljubavi i razumijevanju.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima bez čije pomoći i podrške ovo ne bi bilo moguće. Mama i tata, hvala vam što ste vjerovali u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ KRIOMLINA I ULTRAZVUKA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST POGAČE ULJANE REPICE

Vesna Alilović, 941/PI

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj novih tehnologija, odnosno kriogenog mljevenja i ultrazvuka visokog intenziteta na udjel fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost pogače uljane repice. Nakon proizvodnje ulja, dobivena pogača usitnjena je na kriomlinu uz hlađenje pomoću tekućeg dušika kroz 12 minuta, a zatim tretirana ultrazvukom visokog intenziteta pri amplitudama od 60 %, 80 % i 100 % i vremenu od 3, 6 i 9 minuta. Samljevenoj pogači određen je sastav masnih kiselina, slobodni i vezani polifenolni spojevi te antioksidacijska aktivnost. Tretmani kriomljevenja i ultrazvuka pokazali su statistički značajan utjecaj na udio miristinske, palmitoleinske, heptadecenske, heptadekanske i eruka masne kiseline ($p \leq 0,05$). Vrijeme tretmana ultrazvukom značajno je utjecalo na koncentraciju *p*-kumarinske kiseline slobodnih polifenola ($p \leq 0,05$) dok je amplituda imala utjecaj na udio ružmarinske kiseline kod vezanih fenola ($p \leq 0,05$). Koncentracija sinapinske i *p*-kumarinske kiseline statistički značajno korelira s antioksidacijskom aktivnosti slobodnih polifenola, dok kod vezanih polifenola statistički značajnu korelaciju pokazuje koncentracija ferulinske i *p*-kumarinske kiseline ($r > 0,666$).

Ključne riječi: *pogača uljane repice, kriomlin, ultrazvuk, polifenoli, antioksidacijska aktivnost*

Rad sadrži: 53 stranice, 11 slika, 10 tablica, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *Doc.dr.sc. Marko Obranović*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 24. rujna, 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE EFFECT OF CRYOMILL AND ULTRASOUND ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF RAPESEED PRESS CAKE

Vesna Alilović, 941/PI

Abstract: The aim of this study was to determine impact of cryogenic grinding and high intensity ultrasound on the release of phenolic compounds and antioxidant activity of rapeseed cake. After the oil production the rapeseed cake was grounded on cryomill with liquid nitrogen cooling for 12 minutes and then treated with high intensity ultrasound at amplitude of 60 %, 80 % and 100 % while the extraction time was 3, 6 and 9 minutes. Free and bounded phenolic compounds, fatty acid composition and antioxidant activity of milled cake were determined. Cryogenic milling and ultrasound treatments showed statistically significant effect on the content of myristic, palmitoleic, heptadecenic, heptadecanic and erucic fatty acid ($p \leq 0,05$). Time of treatment with ultrasound showed significant impact on *p*-coumaric acid of free phenols ($p \leq 0,05$), while amplitude showed significant impact on rosmarinic acid bounded phenols ($p \leq 0,05$). Concentration of sinapic and *p*-coumaric acid had a statistically significant correlation with the antioxidant activity of free phenols while the same was for ferulic and *p*-coumaric acid for bounded phenols ($r > 0,666$).

Keywords: rapeseed press cake, cryogenic grinding, ultrasound, phenols, antioxidant activity

Thesis contains: 53 pages, 11 figures, 10 tables, 65 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Marko Obranović, Assistant Professor*

Reviewers:

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

Thesis defended: 24th of September, 2019.

Sadržaj:

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1.	ULJANA REPICA	2
2.2.	PROIZVODNJA I SASTAV ULJA	3
2.3.	POGAČA I SAČMA ULJANE REPICE.....	4
2.3.1.	Nutritivne i antinutritivne komponente pogače uljane repice	5
2.3.1.1.	Polifenoli	5
2.3.1.2.	Proteini	6
2.3.1.3.	Glukozinolati.....	6
2.4.	KRIOGENO MLJEVENJE	7
2.5.	ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA.....	8
2.6.	LIOFILIZACIJA	9
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1.	MATERIJALI.....	11
3.2.	METODE RADA	11
3.2.1.	Proizvodnja ulja prešanjem uz prethodno kondicioniranje	11
3.2.2.	Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u pogači	11
3.2.3.	Određivanje udjela masti u pogači.....	12
3.2.4.	Mljevenje pogače kriomlinom	13
3.2.5.	Određivanje veličine čestica	14
3.2.6.	Tretiranje uzorka ultrazvukom visokog intenziteta- UVI	16
3.2.7.	Liofilizacija.....	18
3.2.8.	Ekstrakcija nepolarnih komponenti	19
3.2.9.	Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva	20
3.2.10.	Ekstrakcija vezanih fenolnih spojeva	21
3.2.11.	Određivanje sastava masnih kiselina pomoću GC- a.....	22
3.2.12.	Određivanje koncentracije fenolnih spojeva pomoću HPLC- a.....	23
3.2.13.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti slobodnih i vezanih polifenola	25
3.2.13.1.	FRAP metoda	25
3.2.14.	Statistička obrada.....	28
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1.	KVALITETA POGAČE ULJANE REPICE.....	29
4.2.	VELIČINA ČESTICA.....	30
4.3.	SASTAV MASNIH KISELINA.....	32
4.4.	KONCENTRACIJA I SASTAV POLIFENOLNIH SPOJEVA.....	35
4.4.1.	Slobodni fenolni spojevi	35
4.4.2.	Vezani fenolni spojevi	39
4.5.	ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA POLIFENOLNIH SPOJEVA	41

4.6.	REZULTATI OPTIMIRANJA UVI TRETMANA.....	45
5.	ZAKLJUČAK.....	47
6.	LITERATURA.....	48

1. UVOD

Uljana repica (*Brassica napus*) jedna od pet najvažnijih uljarica pripada porodici kupusnjača. Po proizvodnji nalazi se na trećem mjestu odmah iza palminog i sojinog ulja (Kokić i Palić, 2012). Svjetska proizvodnja u 2012. godini iznosila je 64,8 milijuna tona (Yu i sur., 2016). Ova kultura se prvenstveno uzgaja radi sjemena koje sadrži 35- 45 % ulja. Ulje uljane repice koristi se za ljudsku prehranu, prehranu životinja te u tehničke svrhe (biodizel, proizvodnja sapuna itd.). Upotreba je bila ograničena zbog štetnih tvari koje se nalaze u sjemenu: glukozinolati, eruka masna kiselina, fitati i tanini. Međutim, danas su stvorene sorte koje sadrže ispod 30 $\mu\text{mol/g}$ glukozinolata i manje od 2 % eruka kiseline nazvane kanola sortama (**Canadian Oil Low Acid**) (Brlek Savić i sur., 2009).

Nakon dobivanja ulja kao nusproizvod ostaje pogača/sačma koja se smatra visokovrijednim krmivom koji sadrži 33-48 % bjelancevina, više od 20 % ugljikohidrata, 8 % ulja, vitamine, minerale i druge korisne sastojke. Danas se uglavnom koristi kao stočna hrana zbog sadržaja glukozinolata i eruka masne kiseline koji narušavaju senzorske karakteristike i zdravlje (Gadžo i sur., 2011).

Antioksidanse možemo definirati kao bilo koju tvar koja odgađa ili sprječava oksidaciju tvari podložnih oksidaciji. Njihova je zadaća neutralizirati slobodne radikale i tako spriječiti razna oštećenja organizma. Pogača i sačma uljane repice smatraju se vrlo dobrim izvorima antioksidansa kao što su fenolne kiseline i njihovi derivati, a glavni uzrok tome je visoki sadržaj polifenola koji ostaje u njima nakon dobivanja ulja.

Prehrambena industrija danas pokazuje veliko zanimanje za primjenu novih tehnika obrade hrane gdje se ubrajaju kriogeno mljevenje te obrada ultrazvukom visokog intenziteta. Kriogeno mljevenje našlo je primjenu u brojnim industrijama, odvija se pri niskim temperaturama te se dobije fini prah čije čestice imaju veću aktivnu površinu, a samim time ne utječe se na bioaktivni profil materijala koji se melje. Ultrazvuk se zadnjih nekoliko desetljeća koristi za pojačavanje ekstrakcije različitih prirodnih proizvoda kao što su antioksidansi, eterična ulja i boje. Svojim djelovanjem poboljšava bioraspoloživost mikronutrijenata pri čemu se zadržavaju njihova izvorna svojstva (Yu i sur., 2016). Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj kriomljevenja i ultrazvuka kao novih tehnologija na sastav masnih kiselina, oslobađanje fenolnih spojeva te antioksidacijsku aktivnost pogače uljane repice.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ULJANA REPICA

Uljana repica pripada porodici krstašica (*Brassicaceae*), rodu *Brassica*. Kao dvije najznačajnije vrste za proizvodnju ulja izdvajaju se kupusna uljana repica (*Brassica napus ssp. oleifera*) nastala ukrštavanjem kelja i ogrštice te ogrštica (*Brassica campestris ssp. oleifera*) nastala od divlje ogrštice. Ozime forme se uglavnom uzgajaju u umjerenom klimatskom pojasu, dok se jare sorte uzgajaju u hladnijim područjima. Vegetacija ozimih formi traje oko 9 - 10 mjeseci, a jarih 3 - 4 mjeseca. Uljana repica je zeljasta biljka čiji je plod komuška duga 5 – 10 cm unutar koje se nalazi 35 – 40 sjemenki pričvršćenih za središnju lamelu. Sjeme je okruglasto, kod kupusne uljane repice nešto krupnije, tamne boje sa plavosmeđom nijansom, dok je sjeme ogrštice sitnije i crvenkaste boje (Gadžo i sur., 2011).

Sadržaj ulja u suhom sjemenu uljane repice iznosi 40 – 47 %, a sadržaj proteina 19 – 29 %. Osim korisnih tvari, uljana repica sadrži i one štetne kao što su glukozinolati, eruka masna kiselina, tanini i fitati. Stare sorte su imale oko 50 % eruka masne kiseline u ulju, a u sačmi oko 400 $\mu\text{mola/g}$ glukozinolata. Upravo zbog tih štetnih tvari za koje je dokazano da narušavaju zdravlje, upotreba tradicionalnih vrsta uljane repice bila je dosta ograničena i to uglavnom u tehničke svrhe (Kokić i Palić, 2012).

Tradicionalne sorte nastojale su se zamijeniti novima koje bi sadržavale puno manje količine štetnih tvari. Tako je zero „0“ sorta, prvi put proizvedena u Kanadi 1968. godine, sadržavala sniženi udio eruka masne kiseline do 5 % (Shahidi, 1990). Iako je udio glukozinolata u zero „0“ sorti bio 150 $\mu\text{mola/g}$ i dalje je upotreba u ishrani domaćih životinja bila ograničena. Već 1974. godine u Kanadi je stvorena prva sorta tipa „00“ koja se zvala Tower, a sadržavala je niži udio eruka masne kiseline i glukozinolata (do 30 $\mu\text{mol/g}$). Sorte koje sadrže do 2 % eruka masne kiseline i 30 $\mu\text{mol/g}$ glukozinolata nazvane su Canola sortama, no kasnije su u Europi i Kanadi postroženi uvjeti te se sadržaj glukozinolata ograničio na 20 $\mu\text{mol/g}$ (Kokić i Palić, 2012). 1976. godine razvijena je i „000“ sorta koju karakterizira nizak udio eruka kiseline, glukozinolata i vlakana (Abrehdari i sur., 2015).

Uljana repica se nalazi na 3. mjestu u svjetskoj proizvodnji ulja, odmah iza palme i soje. Uzgaja se prvenstveno radi sjemena koje sadrži 40 - 47 % ulja, a koristi se u ljudskoj prehrani, u tehničke svrhe, u proizvodnji sapuna, u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, u proizvodnji boja i tekstila, plastičnih masa, a danas većinom za proizvodnju biodizela. U Antičkoj Grčkoj i Rimskom carstvu ulje se koristilo za osvjtljenje. Uljana repica je medonosna biljka koja se

koristi i kao siderat, dok se nusproizvodi proizvodnje ulja koriste kao stočna hrana (Gadžo i sur., 2011).

Uljana repica smatra se starom kulturom koja se u Kini spominje od prije 4000, u Italiji prije više od 3000 godina, dok je u Europi proizvodnja započela u Belgiji. Najveći proizvođači uljane repice u 2008. godini bile su: Kanada (12 642 900 t), Kina (12 102 010 t), Indija (5 834 000 t), Njemačka (5 154 700 t) i Francuska (4 719 053 t). U navedenim državama je proizvedeno oko 50 % od ukupne svjetske proizvodnje. Ukupnu proizvodnju po kontinentima vidimo u Tablici 1. (Gadžo i sur., 2011).

Tablica 1. Ukupna proizvodnja uljane repice po kontinentima (%) u 2008. godini (Gadžo i sur., 2011)

Kontinent	Tona	% od svjetske proizvodnje
Europa	23 351 566	40,2
Azija	19 114 983	32,9
Amerika	13 637 365	23,5
Australija	1 846 157	3,2
Afrika	111 021	0,2
Svijet	58 061 092	100

U Hrvatskoj se godišnje proizvede 75 – 80 tisuća tona ulja i 200 000 tona sačmi što ne zadovoljava potrebe za uljima (Pospišil i Mustapić, 1995).

2.2. PROIZVODNJA I SASTAV ULJA

Kako bi se sirovina, u ovom slučaju sjemenke uljane repice, pravilno skladištila potrebno ju je prethodno očistiti i osušiti. Neposredno prije početka prerade sjemenke se ljušte kako bi se uklonila tvrda ljuska i olakšalo dobivanje ulja iz jezgre. Sirovo repičino ulje, odnosno kanola ulje proizvodi se kombinacijom pretprešanja i ekstrakcije. Bez obzira koji tehnološki proces provodimo prethodi mu mljevenje. Mljevenjem se razaraju se stanice biljnog tkiva, povećava aktivna površina i samim time olakšava istjecanje ulja. Za pretprešanje meljava može biti gruba jer se ponovo melje prije drugog prešanja ili ekstrakcije (Rac, 1964).

Nakon mljevenja slijedi kondicioniranje koje se provodi u kondicioneru gdje uz dodatak vode vršimo zagrijavanje sjemena na temperaturu od minimalno 80 °C (Zacchi i Eggers, 2008). Zagrijavanjem se narušava gel struktura eleoplazme, smanjuje se viskoznost ulja, pucaju stanične

stjenke te dolazi do bubrenja i koagulacije proteina što vodi do boljeg iskorištenja prešanja (Rac, 1964). Kondicioniranje ima dobar učinak na bioaktivne komponente ulja, dolazi do povećanja udjela fenolnih spojeva te su količine polifenola kanolola bile za 55 puta veće nego kod ulja dobivenog hladnim prešanjem (Kraljić i sur., 2013).

Pretprešanjem iz preše izlazi pogača s 12 -20 % ulja (Rac, 1964). Pogača dalje ide na ekstrakciju heksanom gdje dolazi do iskorištenja procesa proizvodnje do 95 % (Mag, 1990). Nakon ekstrakcije iz ulja i sačme se uklanja otapalo koje se rekuperira, a takvo dobiveno ulje ide dalje na rafinaciju kako bismo dobili jestivo ulje (Unger, 1990).

Rafinacija se sastoji od dvije faze, predefinicije, odnosno degumiranja i rafinacije. Rafinacija podrazumijeva neutralizaciju kojom se dobije ulje s niskim sadržajem masnih kiselina, zatim bijeljenje kojim se uklanjaju fosfolipidi, pigmenti, teški metali, sapuni i druge nepoželjne komponente te deodorizaciju pod vakuumom kojom se uklanjaju hlapljive tvari, glavni uzročnici neugodnih mirisa i okusa (Unger, 1990; Rac, 1964).

Ulje uljane repice sadrži jako malo zasićenih masnih kiselina, 44 – 75 % mononezasićenih masnih kiselina, 22 – 35 % polinezasićenih masnih kiselina i to 18 – 22 % linolne te 9 – 13 % linolenske masne kiseline (Szydłowska-Czerniak, 2011).

2.3. POGAČA I SAČMA ULJANE REPICE

Nakon procesa proizvodnje ulja kao nusproizvodi ostaju pogača i sačma. Pogača je nusprodukt koji nastaje prešanjem sjemenja, a sačma ekstrakcijom sjemenja ili pogače. Da bi se pravilno skladištile udio vlage u pogači odnosno sačmi ne smije prelaziti 8 – 12 %, stoga se, zbog povećanog udjela vode nakon izlaska iz preše ili ekstraktora, podvrgavaju sušenju u sušarama. Kako u svom sastavu sadrže nutritivno vrijedne komponente koriste se, ovisno o vrsti uljarice, kao stočna hrana, u ljudskoj prehrani ili u industriji. Pogača uljane repice sadrži oko 30 - 34 % proteina, 6 - 11 % masti, 27 - 30 nedušične ekstraktivne tvari (NET), 10 - 13 % celuloze, a udio vlage joj je 10 - 13 % (Rac, 1949; Rac, 1964).

Kako je u svijetu sve veća potražnja za uljem uljane repice, raste i količina nusproizvoda odnosno pogače i sačme. Sukladno tome, vrše se istraživanja na njihovim proteinima s ciljem uvođenja pogače u ljudsku prehranu i povećanja tržišne vrijednosti. Pogača uljane repice sadrži sirove bjelančevine povoljnog aminokiselinskog sastava te minerale poput kalcija i fosfora pa je pogodna za korištenje kao izvor proteina u ishrani domaćih životinja (Tan i sur., 2011; Szydłowska- Czerniak i sur., 2011). Međutim, sadrži i nepoželjne komponente kao što su

glukoziolati, sirova vlakna, fenolne kiseline, tanini i fitati koji joj ograničavaju upotrebu, narušavaju senzorska svojstva i utječu na probavljivost (Tan i sur., 2011).

2.3.1. Nutritivne i antinutritivne komponente pogače uljane repice

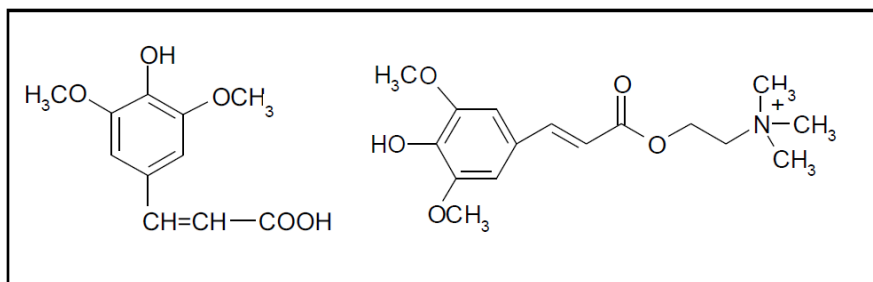
2.3.1.1. Polifenoli

Fenolni spojevi su aromatski sekundarni biljni metaboliti. Sadrže aromatski prsten na kojem se nalazi jedna ili više hidroksilnih skupina. Smatraju se dobrim antioksidansima jer zbog svoje građe stabiliziraju slobodne radikale. U fenole ubrajamo različite spojeve s obzirom na to da osim hidroksilnih grupa na osnovnoj aromatskoj strukturi mogu biti vezane i druge funkcionalne skupine, može ih biti i više na istom prstenu, a složeniji oblici fenola sadrže i veći broj aromatskih prstena. Fenoli su široko rasprostranjeni, nalaze se u voću i povrću, žitaricama, leguminozama, čokoladi i piću (Bravo, 1998).

Sjeme uljane repice sadrži najveću količinu polifenola u odnosu na sjeme drugih uljarica (Nacz i sur., 1998). Koncentracija fenolnih spojeva povećava se sazrijevanjem sjemena te uzrokuju tamnu boju, gorak okus i trpkost pogače. Oksidirani fenolni produkti tvore komplekse s esencijalnim aminokiselinama, enzimima i drugim tvarima umanjujući nutritivnu vrijednost (Kozłowska i sur., 1990). Međutim, fenolni spojevi kao antioksidansi štite stanice od oksidacijskog stresa te smanjuju rizik od nastanka raznih bolesti povezanih s njim. Istraživanja su pokazala da imaju važnu ulogu u sprječavanju nastajanja kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, tumora i osteoporoze (D'Archivio i sur., 2007).

Najzastupljeniji fenolni spojevi kod uljarica su kumarini, flavonoidi, lignini te derivati hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina. U uljanoj repici dominiraju esterificirane, vezane i slobodne fenolne kiseline. Kao najzastupljenija slobodna fenolna kiselina javlja se sinapinska, a zatim *p*- kumarinska i *trans*- ferulinska kiselina (Kozłowska i sur., 1990).

Od ukupnih fenolnih kiselina najveći dio zauzimaju esterificirane fenolne kiseline gdje dominira sinapin, kolin ester sinapinske kiseline prikazan na slici 1. Njegova koncentracija ovisi o načinu prerade, uvjetima uzgoja, parametrima ekstrakcije i zemlji podrijetla. Sinapin doprinosi gorkom okusu i nižoj probavljivosti, dok u nekim slučajevima formirajući trimetilamin uzrokuje miris po ribi. Novija su istraživanja pokazala da sinapin u kombinaciji s lijekom doksorubicinom djeluje sinergistički protiv tumora debelog crijeva (Kozłowska i sur., 1990; Yates i sur., 2018).



Slika 1. Kemijska struktura sinapinske kiseline i sinapina (Thiyam i sur., 2004)

2.3.1.2. Proteini

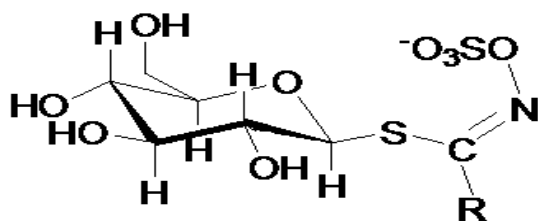
Sjeme uljane repice sadrži 17 – 26 % proteina dok pogača kao nusproizvod nakon proizvodnje ulja sadrži do 50 %. Proteine uljane repice dijelimo na albumine topljive u vodi, globuline topljive u otopinama soli, prolamine topljive u etanolu te gluteline koji nisu topljivi niti u jednom od navedenih otapala. Skladišni proteini zauzimaju 80 % od ukupnih proteina.

Glavni skladišni proteini su kruciferin i napin dok se u manjim koncentracijama javlja i strukturni protein oleosin. Napin je 2 S albumin, a kruciferin je 12 S globulin. Napin je protein male molekulske mase, posjeduje svojstvo pjenjenja te alkalni karakter. Kruciferin je, s druge strane, neutralni protein visoke molekulske mase sa svojstvom geliranja (Aider i Barbana, 2011). Oleosin je protein male molekulske mase i zauzima 2 – 8 % od ukupnih proteina (Huang, 1992).

Danas se pogača uljane repice zbog visokog udjela proteina uglavnom koristi kao kvalitetna hrana za životinje. Iako predstavlja ekonomičan i održiv izvor proteina s visokom biodostupnosti i probavljivosti još uvijek nema komercijalno dostupnih proizvoda za ljudsku prehranu (Campbell i sur., 2016).

2.3.1.3. Glukozinolati

Glukozinolati (Slika 2) su sekundarni biljni metaboliti čiji sadržaj i sastav variraju kod različitih biljnih vrsta zbog uvjeta uzgoja. Pogača uljane repice koja se uzgaja u tropskim područjima sadrži veću količinu glukozinolata. Danas je identificirano više od 120 različitih glukozinolata koji imaju zajedničku strukturu sastavljenu od β -D-tiogluoze, N-hidroksiaminsulfata i varijabilnog bočnog lanca (Tripathi i Mishra, 2007).



Slika 2. Opća formula glukozinolata (Fahey i sur., 2001)

Glukozinolati su prisutni u svim dijelovima biljke te obradom i konzumiranjem hrane koja ih sadrži dolazi do hidrolize pod utjecajem enzima mirozinaze prirodno prisutnog u biljci i mirozinaze prisutne u crijevnoj mikroflori. Hidrolizom nastaju antinutritivne komponente koje se sastoje od ekvimolarne količine glukoze, KHSO_4 te nestabilnog organskog aglukona iz kojeg se formiraju izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, epitionitrili ili oksazolidintioni (Tripathi i Mishra, 2007). Tiocijanati, tiourea i oksazolidintion mogu uzrokovati prekid dostupnosti joda te samim time utječu na funkciju štitne žlijezde, dok su izotiocijanati odgovorni za gorak okus (Kokić i Palić, 2012).

Enzimskom hidrolizom glukozinolata uljane repice nastaju goitrin i tiocijanatni ioni (Kokić i Palić, 2012). Pogača uljane repice sadrži tri glavna glukozinolata odnosno progoitrin ili epiprogoitrin te glukonapin i glukobrasikanapin. Progoitrin pod utjecajem toplinske obrade ili djelovanjem mirozinaze prelazi u izrazito gorak goitrin dok glukonapin ometa rast i razvoj (Tripathi i Mishra, 2007).

Različite vrste životinja imaju i različitu sposobnost tolerancije na glukozinolate. Stupanj štetnog djelovanja ovisi o sastavu i koncentraciji glukozinolata u hrani. Kod konzumiranja hrane s visokim udjelom glukozinolata može doći i do smrti naročito kod svinja, štakora i zečeva (Tripathi i Mishra, 2007).

2.4. KRIOGENO MLJEVENJE

Pojam kriogeno dolazi od grčke riječi „kryos“ što znači hladno. Kriogenija je grana fizike koja se bavi proučavanjem ponašanja materijala pri temperaturama od $-150\text{ }^\circ\text{C}$ ili manje (Kalia i Fu, 2013; Junghare i sur., 2017). Da bi se postigle tako niske temperature koriste se kriogenici kao tekući dušik, tekući helij, tekući neon, tekući vodik, tekući kisik te tekući argon (Junghare i sur., 2017). Obrada materijala na ovaj način prilično je jeftina, a poboljšava fizikalna i mehanička

svojstva materijala (Kalia i Fu, 2013). Kao sve tehnike tako i ova ima svoje prednosti i mane, međutim, razumnom primjenom prevladavaju prednosti (Goswami, 2017).

Kriogeno mljevenje je ultra fino mljevenje kojim dobivamo prah malih čestica bez utjecaja na bioaktivni profil materijala koji se usitnjava. Ovakav način mljevenja našao je primjenu u farmaceutskoj industriji, proizvodnji i obradi začina, ljekovitog bilja i žitarica (Benković i sur., 2018). Proces se odvija na temperaturama znatno nižim od 0 °C koje se postižu pomoću kriogena, najčešće upotrebom inertnog tekućeg dušika (Junghare i sur., 2017). Uzorak pri tako niskim temperaturama postaje lomljiviji te se lakše melje (Wilczek i sur., 2004). Tekući dušik cirkulira sustavom, a automatsko punjenje sprječava njegov direktan kontakt s uzorkom koji se melje te omogućuje održavanje temperature na – 196 °C (Junghare i sur., 2017). Neke od brojnih prednosti kriogenog mljevenja su: smanjeno trošenje opreme za mljevenje, povećanje produktivnosti kroz optimiziranu veličinu čestica i povećanu propusnost, niža potrošnja energije, veća stopa proizvodnje, veća aktivna površina čestica uzorka te se postiže fina veličina čestica od 50 µm što bi se pri običnom mljevenju postiglo kroz nekoliko ponavljanja (Junghare i sur., 2017; Mondragón i sur., 2013).

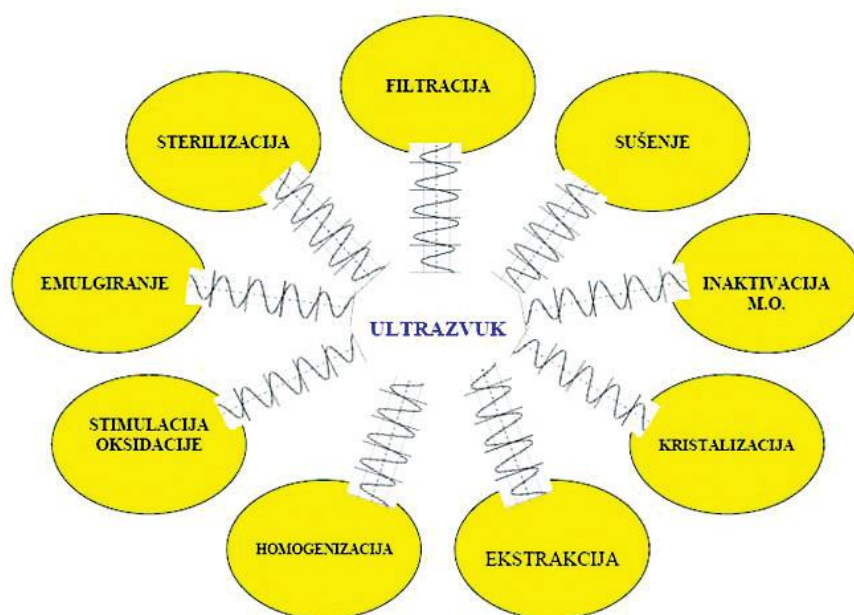
2.5. ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA

Ultrazvuk je zvuk frekvencije iznad 20 kHz koja je previsoka za ljudsko slušno područje (Herceg i sur., 2009). U posljednje vrijeme prehrambena industrija istražuje blaže tehnike obrade hrane kojima bi se sačuvali i poboljšali okus, miris, aroma, izgled, boja te teksturalna i nutritivna svojstva. Jedna od njih je i ultrazvuk koji prema primjeni dijelimo na ultrazvuk niskog intenziteta (niže od 1 W/cm²) i visokih frekvencija te ultrazvuk visokog intenziteta (više od 1 W/cm²) i niskih frekvencija (Brnčić i sur., 2009).

Ultrazvuk niskog intenziteta prostire se u frekvencijama od 2 MHz i više. S obzirom na to da ne uzrokuje fizikalne i kemijske promjene tretiranog uzorka, koristi se kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, određivanje razine kapljevine u tankovima, mjerenje teksture, viskoznosti, brzine protjecanja, kontrole pakiranja, koncentracije tvari u hrani, stimulaciju aktivnosti živih stanica, površinsko čišćenje hrane, utjecaj na enzime, ekstrakciju asistiranu ultrazvukom, kristalizaciju, emulgiranje, filtraciju te operacije sušenja i smrzavanja (Herceg i sur., 2009; Režek Jambrak i sur., 2010).

Ultrazvuk visokog intenziteta prostire se u frekvencijama od 20 do 100 kHz uz prošireno područje do 2 MHz. Uzrokuje kavitaciju te ima najučinkovitije djelovanje na frekvencijskom

području od 20 kHz do 40 kHz (Herceg i sur., 2009). Kavitacija, odnosno nastajanje mjehurića, javlja se kao posljedica izmjene tlakova do koje dolazi kada zvučni val dođe do tekuće sredine i pojave se longitudinalni valovi. Kao što vidimo na slici 3, ultrazvuk visokog intenziteta koristi se kod sterilizacije, filtracije, sušenja, inaktivacije mikroorganizama, kristalizacije, ekstrakcije, homogenizacije, stimulacije oksidacije te emulgiranja (Brnčić i sur., 2009).



Slika 3. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta u prehrambenoj tehnologiji i biotehnologiji (Brnčić i sur., 2009)

Dokazano je da je kombinacija ultrazvuka s toplinom učinkovita u inaktivaciji enzima otpornih na toplinu, zatim da skraćuje vrijeme između inicijacije kristalizacije i tvorbe leda te time smanjuje oštećenja stanica te potiče ekstrakciju proteina povećavajući topljivost (Režek Jambrak i sur., 2010).

2.6. LIOFILIZACIJA

Liofilizacija (eng. freeze-drying) je noviji postupak odstranjivanja vode iz materijala, kojim se proizvod prvo smrzne, a zatim suši pod vakuumom čime se onemogućuje migracija vode te koncentriranje topljivih sastojaka uzorka (šećer, kiseline, aminokiseline, mineralne soli itd.) na njegovom površinskom sloju. Proces se sastoji od primarnog sušenja iz zamrznutog stanja, odnosno sublimacije koja uklanja slobodnu vodu i traje dok u uzorku ne ostane 6 – 8 % vode te

sekundarnog sušenja iz tekućeg stanja, odnosno desorpcije kojom uklanjamo vezanu vodu. Liofilizacijom se dobije porozna struktura osušenog materijala uz minimalne promjene. Također, relativno niska temperatura desorpcije omogućuje maksimalno očuvanje termolabilnih komponenti uzorka (Mašović i sur., 2000; Lovrić, 2003).

Primjena ovakvog procesa sušenja zahtjeva poznavanje fizikalno – kemijskih svojstava sušenog materijala kao što su toplinska vodljivost, toplinski kapacitet, latentna toplina topljenja i isparavanja, svojstvo sorpcije i slično. Također, osim na vrstu materijala moramo obratiti pažnju i na njegovu temperaturu i vlažnost (Lovrić, 2003).

Liofilizacijom se uklanja voda iz osjetljivih materijala koji se nedovoljno ili se ne mogu nikako sušiti uobičajenim postupcima. Proces je vezan uz tekuće i polutekuće uzorke te pruža veću trajnost proizvoda, očuvanje vanjskog izgleda i strukture, minimalne promjene boje, arome i okusa te minimalni gubitak vitamina (Lovrić, 2003). Proces liofilizacije energetski je skup te su samim time i cijene proizvoda osušenih liofilizacijom veće (Ivančević i Mitrović 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao sirovina u ovom radu korištena je pogača uljane repice dobivena u laboratoriju iz 1 kg sjemena uzgojenog na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kondicioniranjem na 80 °C kroz 30 minuta te dvostrukim prešanjem na pužnoj preši (Komet, model CA/53, Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka) proizvedeno je nerafinirano repičino ulje dok je kruti ostatak, odnosno pogača nakon prešanja samljevena u mlinu s diskovima te skladištena na -20 °C.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Proizvodnja ulja prešanjem uz prethodno kondicioniranje

Izvaže se 1 kg sjemena uljane repice te grubo samelje u mlinu s diskovima. Stjenka kondicionera zagrije se na 60 °C, a zatim doda samljevena uljana repica i 70 ml vode. Zagrijavanje se vrši uz stalno miješanje dok temperatura ne dosegne 80 °C te se doda 50 ml vode i kondicionira još 30 minuta. Prije dvostrukog prešanja na pužnoj preši doda se još 50 ml vode. Nakon prešanja pogača se melje u mlinu s diskovima te skladišti na -20 °C.

3.2.2. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u pogači

Aparatura i pribor:

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

Za određivanje vode u pogači uljane repice korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 665:2004). Princip metode temelji se na sušenju do konstantne mase u sušioniku pri temperaturi od 103 ± 2 °C. Analiza pogače provela se prije mljevenja na kriomlinu.

U osušenu i izvaganu posudicu izvaže se 5 g sjemena ili pogače, s točnošću 0,0001 g. Posudica s uzorkom i podignutim poklopcem stavi se u sušionik, prethodno zagrijan na 103 ± 2

°C. Nakon 2 sata, uzorak se hladi u eksikatoru. Kada se ohladi do sobne temperature, izvaže se i ponovi se postupak sušenja uz smanjeno vrijeme od jednog sata, sve dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne bude najviše 0,005 g. Rezultat se prikazuje kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja.

Udio vode i hlapivih tvari računa se prema formuli [1]:

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

gdje je:

m_0 = masa prazne posudice (g)

m_1 = masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_2 = masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.3. Određivanje udjela masti u pogači

Aparatura i pribor:

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

Reagensi:

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

Za određivanje udjela masti u uzorcima sjemena i pogače korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 659:2010). U celuloznu čahuru s vatom na dnu odvažuje se 10 g samljevenog uzorka sjemena ili pogače s točnošću od 0,0001 g, čahura se zatvori vatom i postavi u ekstraktor. Ekstrakcija se provodi 8 h uz petroleter kao otapalo. Masna frakcija se izdvaja s kondenziranim otapalom u prethodno izvaganu tikvicu u koju se dodaju 2 – 3 kuglice za vrenje. Nakon završetka, otapalo se otpari. Uzorak se suši 60 minuta na 103 ± 2 °C, ohladi i važe. Sušenje se nastavlja po 30 minuta do postizanja konstantne mase.

Udio ekstrahirane masti računa se prema navedenoj formuli, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina dvaju paralelnih određivanja [2] :

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

gdje je:

m_0 = masa prazne epruvete (g)

m_1 = masa pune epruvete (g)

m_2 = masa uzorka (g)

3.2.4. Mljevenje pogače kriomlinom

Aparatura i pribor:

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

Pogača uljane repice samljevena je na vibracijskom kriomlinu (Retsch + Apollo, Han, Njemačka) sa spremnikom tekućeg dušika na -196 °C (Slika 4). Uređaj se sastoji od kućišta, cilindra za mljevenje s pripadajućim čepom za zatvaranje/otvaranje, cilindra za protutežu, posude za mljevenje, filter rešetke, ventila za dovod dušika i ventila za regulaciju tlaka.

U posudu za mljevenje izvaže se 8 g uzorka i doda 12 malih metalnih kuglica. Posuda se zatvori čepom, umetne u cilindar i dobro stegne odvijačem. Prije početka mljevenja otvori se ventil za dovod tekućeg dušika i namjeste parametri; prethlađenje, vrijeme mljevenja na 12 minuta, broj ciklusa (u ovom slučaju na 1) i frekvencija (30 Hz). Kad mljevenje završi, izvadi se posuda, a cilindar odmah zatvara kako bi se spriječio ulazak vlage. Samljeveno je 150 g uzorka koji se do daljnjih analiza čuvao u plastičnoj posudi s poklopcem na -20 °C.



Slika 4. Vibracijski kriomlin sa spremnikom tekućeg dušika (Vlastita fotografija)

3.2.5. Određivanje veličine čestica

Aparatura i pribor:

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

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

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



Slika 5. Uređaj za mjerenje veličine čestica (Kuraica, 2019)

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

Rezultati mjerenja se prikazuju kao percentili raspodjele veličine čestica:

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

$$\text{Raspon} = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad [3]$$

3.2.6. Tretiranje uzorka ultrazvukom visokog intenziteta- UVI

Aparatura i pribor:

- Ultrazvučni uređaj UP400S (Hielscher, Njemačka)
- Staklena laboratorijska čaša (250 mL)
- Metalna žlica
- Menzura (100 mL)
- Termometar
- Plastične čaše (urinarke)

Reagensi:

- Destilirana voda

Obrada je izvršena pomoću ultrazvučnog procesora (Slika 6) oznake UP400s (Hielscher, Njemačka) ukupne izlazne snage generatora 400 W, konstantne frekvencije 24 kHz, sa sondom promjera 22 mm.



Slika 6. Ultrazvučni uređaj UP400S (Mofardin, 2013)

U staklenu čašu od 250 ml izvažuje se 10 g uzorka (pogača uljane repice samljevena u kriomlinu) i ulije 100 ml destilirane vode. Termometrom se izmjeri temperatura prije tretmana te se čaša s uzorkom i otapalom postavi na predviđeni prostor na postolju u ultrazvučnom uređaju. Sonda se uroni 1 – 2 cm u uzorak. Na procesoru je postavljena određena amplituda (60 %, 80 % i 100 %) te štopericom mjereno vrijeme tretmana (3, 6 i 9 min). Na kraju tretmana ponovo se mjeri temperatura uzorka (Tablica 2).

Ukupno je tretirano 13 uzoraka te je svaki nakon tretmana podijeljen u tri plastične čaše (ukupno 39) u sloju debelom 1 – 2 cm radi što uspješnije liofilizacije. Uzorke nakon UVI tretmana čuvali na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do početka liofilizacije.

Tablica 2. Opis uzoraka s temperaturom prije i nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta

Uzorak	Vrijeme (min)	Amplituda (%)	Početna T (°C)	Završna T (°C)
A	6	80	18	64,5
B	3	60	19	41
C	3	100	19,4	53
D	6	100	20	72
E	3	80	20	48
F	6	80	20	65
G	9	80	20	75
H	6	80	20	65
I	6	80	20	67
J	6	80	20	66
K	6	60	20	58
L	9	100	20,5	79
M	9	60	20,5	68,5

3.2.7. Liofilizacija

Aparatura i pribor:

- Liofilizator (Alpha 1-4 LSC, Christ, Njemačka)
- Metalna špatula

Postupak liofilizacije prethodno zamrznutih uzoraka tretiranih ultrazvukom proveden je u uređaju za liofilizaciju Alpha 1-4 LSC (Christ, Njemačka) (Slika 7).

Uređaj se prije stavljanja uzoraka prethodno zagrije u dvije faze. Prva je faza smrzavanja koja traje 15 minuta, a potom slijedi faza zagrijavanja u trajanju od 20 minuta. Na tri police unutar liofilizatora postavi se po osam plastičnih čaša s uzorcima te uređaj ponovo ide na zagrijavanje, odnosno 3 minute smrzavanja, a zatim 7 minuta zagrijavanja. Unutar komore temperatura je – 55 °C kako bi se zamrznula para koja ispari iz uzoraka. Proces liofilizacije pod vakuumom traje 48 sati.

Nakon završetka procesa otpusti se vakuum te izvade uzorci, a uređaj postavi na odmrzavanje uz otvoren ventil za vodu. Uzorci se homogeniziraju špatulom i čuvaju u zamrzivaču na – 20 °C.



Slika 7. Liofilizator Alpha 1-4 LSC (Vlastita fotografija)

3.2.8. Ekstrakcija nepolarnih komponenti

Aparatura i pribor:

- Plastične kivete (50 mL)
- Menzura (50 mL)
- Metalna žlica
- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Tresilica (Environmental Shaker- Incubator ES20/60, Biosan)
- Centrifuga (Rotina 380, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Njemačka)
- Filter papir (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm)
- Bücherov lijevak
- Tikvica s okruglim dnom (50 mL)
- Rotacijski otparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka)

Reagensi:

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

Ekstrakcija nepolarnih komponenti provedena je prema modificiranoj metodi objavljenoj u radu Kraljić i sur. (2013). Odvažuje se 2 g uzorka u plastične kivete od 50 mL i doda 20 mL

heksana. Kivete s uzorcima polegnu se u posudu i stave se na vorteksiranje u trajanju od 30 min. Slijedi centrifugiranje na 10 min i 5000 min^{-1} (Rotina 380, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen). Supernatant se profiltrira pomoću Bücherovog lijevka, sakuplja u tikvicu i otpari na vakuumskom otparivaču (Heidolph, Schwabach, Njemačka) pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Postupak ekstrakcije nepolarnih komponenti ponavlja se 3 puta. Odmašćena pogača ide na sušenje u digestor. Dobivene masne frakcije koristile su se za određivanje sastava masnih kiselina, a odmašćene pogače za daljnje analize.

3.2.9. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva

Aparatura i pribor:

- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Metalna žlica
- Plastične kivete (15 mL)
- Pipete
- Mikropipete
- Tresilica (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Sonorex, Belin, Njemačka)
- Centrifuga (Rotina 380, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Njemačka)
- Odmjerne tikvice (10 mL)
- Šprice i PVDF filteri (Kromafil, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- Vijalice

Reagensi:

- 80 % etanol (V V^{-1}) (Kefo, Sisak, Hrvatska)
- Interni standard (3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina; 5 mg mL^{-1}), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

Ekstrakcija je rađena prema Martini i sur. (2014) s određenim izmjenama. Odvažuje se oko 0,5 g uzorka odmašćene pogače u plastične kivete od 15 mL, doda 3 mL 80 % (V V^{-1}) etanola i 100 μL otopine internog standarda (3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina koncentracije 5 mg mL^{-1}). Uzorak se snažno protrese 15 sekundi na vortexu. Ekstrakcija se provodi 10 min na

ultrazvučnoj kupelji. Centrifugiranjem pri 5000 min^{-1} na 12 min, izdvoji se supernatant od čvrste faze. Etanolni ekstrakt se otpipetira u odmjernu tikvicu od 10 mL, a proces ekstrakcije se ponovi još 2 puta sa po 3 mL 80 % (v/v) etanola. Nakon 3 ciklusa ekstrakcije, tikvica se nadopuni 80 % (v/v) etanolom do oznake. Sakupljeni ekstrakti se profiltriraju kroz PVDF filter veličine pora $0,20 \mu\text{m}$ u označene vijalice i do daljnjih analiza čuvaju se u zamrzivaču na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.10. Ekstrakcija vezanih fenolnih spojeva

Aparatura i pribor:

- Plastične kivete (15 mL)
- Pipete
- pH metar (3410 pH meter, Yenway, London, England)
- Vijalice
- Centrifuga (Rotina 380, Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen)
- Uparivač s dušikom (Reacti-Therm Dry Block + Reacti-Vap Evaporator, Pierce, SAD)
- Šprice i PVDF filteri (Kromafil, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)

Reagensi:

- Interni standard (3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina; 5 mg mL^{-1}), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- 0,1 M natrijeva lužina (NaOH)
- Klorovodična kiselina (HCl), Carlo Erba Reactifis- SDS (Francuska)
- Etil acetat, Carlo Erba (Val de Reuil Cedex, Francuska)

Korištena je modificirana metoda prema Martini i sur. (2014). U plastičnu kivetu s krutim ostatkom dobivenim od ekstrakcije slobodnih fenola odpipetira se $100 \mu\text{L}$ internog standarda (3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina; 5 mg mL^{-1}) i 4 mL natrijeve lužine (0,1 M) koja hidrolizom tijekom 4 sata oslobađa vezane fenole. Nakon procesa hidrolize, pH smjese namješta se na oko 2 pomoću pH metra (Jenway, London, England) koristeći koncentriranu HCl kako bi se fenoli oslobodili i bili dostupni kao fenolne kiseline umjesto ionskih formi i kao takvi bili pogodni za ekstrakciju etil-acetatom.

Ekstrakcija se provodi 3 puta; 1. put s 4 mL, a preostala 2 puta s 2 mL etil acetata. Nakon dodavanja otapala, uzorak se promućka 30 puta, centrifugira 10 minuta na 2000 min^{-1} , a dobivena etil acetatna frakcija se odvoji u vijalicu i upari dušikom do suhog. U konačnici, suhi ekstrakt se otopi u 10 mL metanola i profiltrira kroz PVDF filter veličine pora $0,20 \mu\text{m}$. Do daljnjih analiza, uzorci su čuvani u zamrzivaču na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Svaka ekstrakcija provedena je u 3 paralelna određivanja.

3.2.11. Određivanje sastava masnih kiselina pomoću GC- a

Aparatura i pribor:

- Plinski kromatograf (Agilent Technologies 6890N Network Gas Chromatograph, Santa Clara, SAD)
- Tresilica (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka)
- Pipete
- Mikropipete
- Metalna žlica
- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Staklene epruvete
- Vijalice

Reagensi:

- Izooktan, Kefo (Sisak, Hrvatska)
- 2 M metanolna otopina KOH, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijevog klorida (NaCl)
- Bezvodni natrijev hidrogensulfat (NaHSO_4), (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

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

Otopljeno je 0,1 g uzorka nepolarnog suhog ekstrakta pogače u 2 mL izooktana. Nakon što je epruveta protresena, dodano je 0,1 mL 2 M metanolne otopine KOH te je opet protresena 60 sekundi. Nakon bistrenja reakcijske smjese i odvajanja glicerolnog sloja na dnu u epruvetu je

dodano 2 mL zasićene otopine natrijevog klorida te je sve promiješano. Gornji, izooktanski sloj izdvojen je u drugu epruvetu te mu je dodano 1 g bezvodnog natrijevog hidrogensulfata. Dobiveni supernatant prebačen je u vijalicu i analiziran na plinskom kromatografu, 1 μ L svakih 25 minuta.

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

Kvalitativno određivanje masnih kiselina provedeno je usporedbom retencijskih vremena njihovih metilnih estera s retencijskim vremenima komercijalnih, sastavom poznatih standarda. Metodom normizacije površine ispod pikova, računa se pojedinačni udio masne kiseline i izražava kao % od ukupnih masnih kiselina.

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

3.2.12. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva pomoću HPLC- a

Aparatura i pribor:

- Uređaj za plinsku kromatografiju, Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD)
 - Maseni detektor tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector
 - Kapilarna kolona Agilent DB-17MS (30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μ m)
 - Računalo

Reagensi:

- Metanol (Kefo, Sisak, Hrvatska)
- Mravlja kiselina (Kefo, Sisak, Hrvatska)

Sastav i koncentracija slobodnih i vezanih fenola u samljevenoj pogači uljane repice određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) Agilent Technologies serije 1200 s binarnom pumpom, autosamplerom i DAD detektorom (Santa Clara, SAD). Spojevi su razdvojeni na nepolarnoj koloni Phenomenex C18 (Kinetex 150 mm x 4,6 mm, 2,6 μm , 100 Å), a uvjeti analize razvijeni su u diplomskom radu Cvitanić (2016). Korištene su dvije mobilne faze s promijenjenim volumnim udjelom tijekom eluiranja (mobilna faza A - 0,1 %-vodena otopina mravlje kiseline (v/v) i mobilna faza B – 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (v v⁻¹)). Protok mobilnih faza iznosio je 0,9 mL min⁻¹ kroz cijelo vrijeme trajanja analize, a primjenjeni gradijent prikazan je u tablici 3. Kolona je termostatorirana na 30 °C, a količina injektiranog uzorka iznosila je 5 μm . Kromatogrami su snimani na valnim duljinama od 280 i 320 nm, a tijekom cijelog vremena analize snimani su i spektri u ultraljubičastom području (200 – 400 nm).

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

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26,1	90	10
28	90	10

Kvantifikacija fenolnih spojeva provedena je pomoću internog standarda (formula [3]), tj. dikloro-4-hidroksibenzojeve kiseline, a koncentracija fenolnih spojeva u odmašćenoj pogači prema formuli [4], iz koncentracije (x) dobivene formulom [3]:

$$x = \frac{A \times c_{i.s.}}{A_{i.s.}} \quad [3]$$

gdje je:

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

$c_{i.s.}$ – koncentracija razrijeđenog internog standarda (mg mL^{-1})

A – površina ispod pika spoja

$A_{i.s.}$ - površina ispod pika internog standarda

$$c(\text{spoja}) = \frac{x \times V}{m} \times 100 \quad [4]$$

gdje je:

c – koncentracija spoja u odvaganoj uzorku ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)

x – koncentracija spoja u ekstraktu (mg mL^{-1})

V – volumen ekstrakta (mL)

m – masa uzorka korišten za ekstrakciju (g)

3.2.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti slobodnih i vezanih polifenola

3.2.13.1. FRAP metoda

Aparatura i pribor:

- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Mikropipete, volumena 100 μL i 1000 μL
- Staklene čaše, volumena 50 mL
- Magnetna miješalica s keramičkom grijaćom pločom (C – MAG HS 7, IKA, Njemačka) i termometar (ETS – D5, IKA, Njemačka)
- Mikrokivete
- Spektrofotometar Specord 50 PLUS UV/VIS (Analytik Jena, Jena, Njemačka)

Reagensi:

- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), (Sigma Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- 20 mM željezovog klorida heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), (Gram-mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska) - 0,541 g $\text{FeCl}_3 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ otopi se u 100 mL destilirane vode
- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline HCl (Carlo Erba, Val de Reuil Cedex, Francuska) - 343 μL 12 M HCl (konc. HCl = 37 %), razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.
- 10 mM otopina TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazin) u 40 mM HCl-u - 0,312 g TPTZ-a, (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Njemačka) se otopi u odmjernoj tikvici od 100 mL s 40 mM HCl-om, te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake.
- 300 mM acetatni pufer, pH 3,6-3,1 g natrijevog acetata trihidrata (Iach- Ner, Neratovice, Češka) otopi se u 16 mL ledene octene kiseline (Macron, Center Valley, USA) u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- 100 % - tni metanol (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

Uz modifikacije, primijenjena je metoda prema Benzie i Strain (1996). Mehanizam se zasniva na redukciji kompleksa željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom ($\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$) u Fe (II) pomoću antioksidanasa iz ekstrakta, pri čemu dolazi do promjene boje iz žute u plavu. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm. FRAP reagens priprema se miješanjem određenih volumena 20 mM željezovog klorida heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 10 mM TPTZ-a (2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazin) i 300 mM acetatnog pufera. Otopina se neposredno prije upotrebe mora zagrijati i održavati na 37 °C.

Za svaki uzorak rađene su 2 paralele. 10 μL uzorka i 1 mL FRAP reagensa otpipetira se u mikrokivete. Slijepu probu čini samo FRAP reagens. Apsorbancija se mjeri nakon 4 minute reakcije pri 593 nm. Za određivanje udjela fenola u ekstraktu izrađen je baždarni pravac od svježe Trolox otopine u metanolu određenog raspona koncentracija (Slika 8). Za izračun koncentracija su korištene formule [5] i [6], a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta Troloxa po 100 g odmašćene pogače.

$$x = \frac{y-b}{a} \quad [5]$$

gdje je:

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

y - apsorbancija uzorka

a – nagib pravca iz baždarnog dijagrama

$$c(\text{spoja}) = \left(\frac{x \times V}{m}\right) \times 100 \quad [6]$$

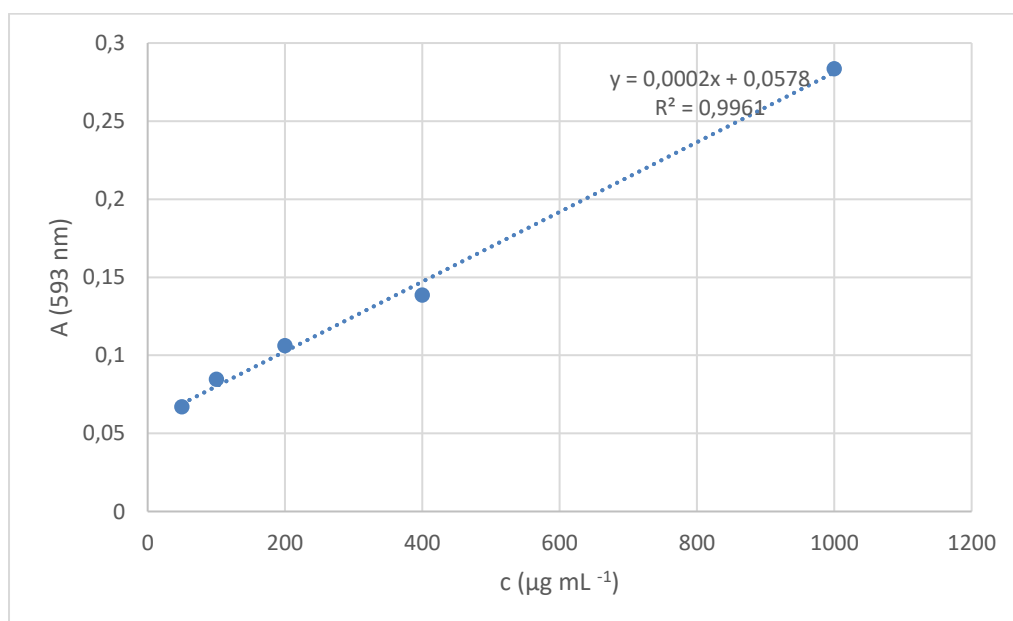
gdje je:

c - koncentracija spoja u odvaganoj uzorku ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)

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

m – masa uzorka korištenog za ekstrakciju (g)

V – volumen ekstrakta (mL)



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

3.2.14. Statistička obrada

Za statističku obradu dobivenih rezultata analize korišteni su programi Design Expert (Stat-Ease Inc., Suite, Minneapolis, SAD) i Microsoft Excel 2013. Analiza varijance (ANOVA) provedena je kako bi se odredio utjecaj nezavisnih varijabla, odnosno načina i vremena mljevenja te načina i vremena tretiranja ultrazvukom na sastav masnih kiselina, koncentraciju polifenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost. Također je određena korelacija koncentracije polifenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnosti ekstrakata koristeći Microsoft Excel 2013. Optimalni uvjeti tretmana – poželjnost određeni su pomoću programa Design Expert.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Uljana repica je jedna od najvažnijih uljarica na svijetu koja se prvenstveno uzgaja radi sjemena bogatog uljem. Ulje uljane repice koristi se u prehrani ali i u tehničke svrhe kao biogorivo, u industriji sapuna, proizvodnji maziva, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji i slično. Nakon dobivanja ulja, ovisno o načinu proizvodnje, kao nusproizvod ostaje pogača, odnosno sačma čija je upotreba u ljudskoj prehrani ograničena zbog prisutnosti antinutritivnih komponenti od koji su najistaknutiji glukozinolati, eruka masna kiselina, tanini i fitati te se stoga se uglavnom koriste kao stočna hrana (Gadžo i sur., 2011). Pogača i sačma uljane repice bogate su proteinima te sirovim bjelančevinama povoljnog aminokiselinskog sastava, dok sjeme sadrži više polifenolnih spojeva od sjemena bilo koje druge uljarice. Zbog svog polarnog karaktera polifenolni spojevi (fenolne kiseline i derivati od kojih je najdominantniji sinapin) zaostaju u pogači i sačmi što ih čini vrlo dobrim izvorima antioksidansa. Danas se vrše istraživanja, odnosno pogača i sačma se podvrgavaju raznim tretmanima s ciljem povećanja ili smanjenja koncentracije polifenola čime bi se omogućilo njihovo uvođenje u ljudsku prehranu.

Djelovanjem ultrazvuka visokog intenziteta ultrazvučni valovi prolaze otapalom te nastaje akustična kavitacija i stvaraju se kavitacijski mjehurići koji se komprimiraju. Uslijed negativnog tlaka i povećanja temperature nastaje kolaps nastalih mjehurića koji uzrokuje „šok-val“ koji prolazi kroz otapalo i pri tome dolazi do miješanja. Ekstremno visoka temperatura i tlak nastali kolapsom mjehurića mogu voditi do disocijacije vodene pare u H^* i OH^* radikale (Herceg i sur., 2009). Ultrazvuk visokog intenziteta također djeluje mehanički, omogućujući veći prodor otapala u uzorak, povećavajući kontaktnu površinu između krute tvari i tekuće faze (Rostagno i sur., 2003). Ukoliko su u otopini prisutni odgovarajući antioksidansi potencijal sonokemijske hidroksilacije fenolnih komponenti može se koristiti kao učinkovit način poboljšavanja antioksidacijskih svojstava određenog materijala (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

U ovom radu određeni su parametri kvalitete pogače uljane repice. Primarni cilj bio je utvrditi utjecaj kriogenog mljevenja, tretiranja ultrazvukom te liofilizacije pogače na sastav i koncentraciju polifenolnih spojeva i masnih kiselina te na antioksidacijski potencijal iste. Antioksidacijski kapacitet tvari uobičajeno se određuje iz njihovih ekstrakata.

4.1. KVALITETA POGAČE ULJANE REPICE

U laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu iz sjemena uljane repice procesom prešanja uz prethodno kondicioniranje

na 80 °C u trajanju od 30 minuta proizvedeno je nerafinirano ulje te je kao nusproizvod dobivena pogača koja se koristila za daljnja istraživanja. Dobivena pogača je samljevena na mlinu s diskovima te je predstavljala kontrolni uzorak.

Pogači uljane repice određeni su osnovni parametri kvalitete (udio vode i ulja), a rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Osnovni parametri kvalitete pogače uljane repice

Uzorak	Udio vode (%)	Udio ulja (%)
POGAČA	7	14

Uspoređujući s literaturom gdje su Leming i Lember (2005) ustanovili da je prosječni udio vode u pogači 4,7 %, dobiveni rezultati su nešto viši. Udio vode u ispitivanoj pogači iznosi 7 %, većem udjelu vlage uzrok je dodatak vode prilikom kondicioniranja kako bi se postigla optimalna vlažnost te samim time omogućilo bolje iskorištenje procesa proizvodnje ulja. Udio ulja od 14 % je također viši u odnosu na ustanovljeni prosječni udio od 10 – 12 % (Kaczmarek i sur., 2016) Razlog tome može biti niže iskorištenje procesa zbog nemogućnosti zagrijavanja glave preše čime bi se smanjila viskoznost ulja i olakšalo njegovo izdvajanje (Pryzbylski i sur., 2005). Isto tako u drugoj literaturi Leming i Lember (2005) navode da u pogači zaostaje 10 – 15 % ulja što je u skladu s rezultatima istraživanja.

Možemo zaključiti da je prilikom proizvodnje ulja iz sjemena uljane repice kao nusprodukt nastala pogača zadovoljavajućih parametara kvalitete.

4.2. VELIČINA ČESTICA

Mjerenje veličine čestica u suhoj disperziji provedeno je metodom laserske difrakcije na uređaju Malvern Mastersizer 2000. Rezultati su prikazani kao percentili raspodjele veličine čestica: d (0,1), d (0,5), d (0,9), D [3,2] te je definiran raspon, što je opisano u diplomskom radu „Utjecaj kriomljevenja na udio sterola i prehrambenih vlakana pogače uljane repice“, Mamilović 2018.

Prilikom analize proučavane su razlike u veličini čestica kontrolnog uzorka pogače uljane repice mljevene na mlinu s diskovima i čestica pogače uljane repice mljevene na kugličnom mlinu uz primjenu kriogenog hlađenja pomoću tekućeg dušika, pri temperaturi od -196°C u vremenu od 12 minuta. Provedena su tri paralelna mjerenja te je izračunata srednja vrijednost (Tablica 5).

Parametar $D [3,2]$ predstavlja Sauterov promjer. To je površinski ekvivalentni promjer. Parametar $d (0,5)$ je promjer čestice za koji vrijedi da 50 % ukupnog broja čestica ima promjer veći od $d (0,5)$ i 50 % čestica ima promjer manji od $d (0,5)$. Span odnosno raspon predstavlja širinu raspodjele čestica (Mamilović, 2018).

Tablica 5. Parametri raspodjele veličine čestica (μm) uzorka mljevenog uz primjenu kriogenog hlađenja (H) kroz 12 minuta u odnosu na kontrolni uzorak pogače

Uzorak	Parametri raspodjele veličine čestica				
	$d (0,1)$	$d (0,5)$	$d (0,9)$	$D [3,2]$	Raspon
P (kontrolni)	128,22	393,63	881,57	238,82	1,91
12H	8,09	55,95	143,30	19,42	2,42

Kriogeno mljevenje je inovativni proces koji se sve više koristi u istraživanjima kako bi se povećala raspoloživost bioaktivnih komponenti jer se povećava bioaktivna površina za ekstrakciju. Kriogenim mljevenjem dobiju se veličine čestica manje od $50 \mu\text{m}$ što je mnogo učinkovitije u usporedbi s mljevenjem pri sobnoj temperaturi (Hemery i sur., 2011).

Iz ovih podataka u tablici 5 vidimo da su se parametri veličine čestica uzorka 12 H, odnosno $d (0,1)$, $d (0,5)$, $d (0,9)$ i $D [3,2]$ smanjili, a raspon povećao u odnosu na kontrolni uzorak. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Rosa i sur. (2013) koji su mljevenjem pšeničnih posija na kriomlinu pri sobnoj temperaturi i temperaturi od -196°C na istom uređaju zaključili kako kriogeno mljevenje pogoduje bržem i lakšem lomljenju čestica, ali istovremeno utječe na povećanje raspona.

Dobiveni rezultati u skladu su s očekivanim jer smanjenje temperature pogoduje lomljivosti čestica pogače uljane repice pri čemu se ona lakše i brže usitnjava primjenom mehaničke energije u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi. Može se zaključiti da kriogeno mljevenje pri temperaturi od -196°C pozitivno utječe na smanjenje veličine čestica pogače uljane repice.

4.3. SASTAV MASNIH KISELINA

Sastav masnih kiselina karakterističan je za svako ulje, utječe na oksidacijsku stabilnost, a samim time na način i duljinu skladištenja. Sastav masnih kiselina kao i omjer između nezasićene i zasićene masne kiseline važan su parametar za određivanje nutritivne vrijednosti određenog ulja, pa tako i korištene pogače.

Tablica 6 prikazuje sastav masnih kiselina u ekstrahiranim masnim frakcijama pogače dodatno usitnjene u kriomlinu s hlađenjem, zatim tretirane ultrazvukom te osušene u liofilizatoru. Analiza masnih kiselina provedena je metodom plinske kromatografije, gdje su udjeli pojedinih masnih kiselina izraženi kao postotak od ukupnog udjela. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja za svaki uzorak.

Analizom je utvrđeno da u svim uzorcima pogače uljane repice dominira mononezasićena oleinska masna kiselina (C18:1). U odnosu na kontrolni uzorak gdje je udio oleinske masne kiseline 64,4 %, došlo je do povećanja udjela u većini uzoraka gdje se vrijednosti kreću od 64,6 % do 65,7 %. Uzorci A (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta), L (ultrazvuk pri amplitudi 100 % u vremenu od 9 minuta) i M (ultrazvuk pri amplitudi 60 % u vremenu od 9 minuta) pokazuju smanjeni udio oleinske masne kiseline u odnosu na kontrolni uzorak (63,2 – 64,2 %). Dobivene vrijednosti su u skladu s vrijednostima u literaturi gdje udio oleinske kiseline u ulju uljane repice zauzima 55 – 66 % ukupnog udjela masnih kiselina (Bockisch, 1998).

Također su detektirane dvije esencijalne masne kiseline, a to su linolna $\omega 6$ (C18:2) i α -linolenska $\omega 3$ (C18:3). U odnosu na kontrolni uzorak (19,1 %), došlo je do smanjenja udjela linolne masne kiseline u većini uzoraka kod kojih se vrijednosti kreću u rasponu od 17,7 % do 18,8%, osim u uzorcima K (ultrazvuk pri amplitudi 60 % u vremenu od 6 minuta), L (ultrazvuk pri amplitudi 100 % u vremenu od 9 minuta) i M (ultrazvuk pri amplitudi 60 % u vremenu od 9 minuta), gdje je došlo do povećanja udjela u vrijednostima od 19,4 % do 19,7 %. Dobivene vrijednosti u skladu su s literaturom gdje se udio linolne kiseline kreće od 15 % - 30 % (Bockisch, 1998). Udio α -linolenske masne kiseline u literaturi se navodi u rasponu od 10% do 15% (Bockisch, 1998), s prosjekom od 9,6 % (Przybylski, 2005), dok je u analiziranim uzorcima udio nešto manji (6,3 % - 9%). U odnosu na kontrolni (6,8 %), kod uzoraka A (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) i B (ultrazvuk pri amplitudi 60 % u vremenu od 3 minuta) došlo je do povećanja udjela α -linolenske kiseline, a vrijednosti se kreću u rasponu od 8,1 % do 9 % dok se kod ostalih vrijednosti kreću od 6,3 % do 6,6 %. Bitno je napomenuti da omjer linolne i α - linolenske kiseline od 3:1 zadovoljava preporučeni omjer važan za održavanje i poboljšanje ljudskog zdravlja.

U kontrolnom uzorku udio palmitinske kiseline (C16:0) iznosi 5,1 %. U odnosu na kontrolni, u uzorku L (ultrazvuk pri amplitudi 100 % u vremenu od 9 minuta) udio palmitinske kiseline je 5,2 %, dok je kod ostalih udio ostao isti ili se smanjio i kreće se u vrijednostima od 4,4 % do 5,1 %. Dobivene vrijednosti slažu se s literaturom gdje palmitinska kiselina zauzima 4 - 7 % ukupnog udjela masnih kiselina (Bockisch, 1998). U analiziranoj pogači prisutna je i stearinska masna kiselina (C18:0) u udjelu od 1,9 %, važno je uočiti da uzorci A (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) i K (ultrazvuk pri amplitudi 60 % u vremenu od 6 minuta) imaju veće vrijednosti od 1,9 %, odnosno 2,1 % i 2 %. U literaturnim navodima udio stearinske kiseline je od 1 % do 3 % (Bockisch, 1998) s prosjekom od 1,5 % (Przybylski, 2005). Miristinska (C14:0) i heptadecenska kiselina (C17:1) prisutne su u svim uzorcima osim u B (ultrazvuk pri amplitudi 60 % u vremenu od 3 minuta) uzorku u udjelu od 0,1 %. Detektirana je i palmitoleinska kiselina (C16:1) koja u kontrolnom i A (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) uzorku ima udio od 0,4 %, a u svim ostalima 0,5 %. Udio arahinske kiseline (C20:0) u uzorku A se smanjio na 0,5 %, u uzorku D (ultrazvuk pri amplitudi 100 % u vremenu od 6 minuta) povećao na 0,7 %, dok se ostali uzorci poklapaju s kontrolnim s udjelom od 0,6 %. Udio gadoleinske masne kiseline (C20:1) u uzorcima F (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) i J (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) poklapa se s udjelom u kontrolnom uzorku od 1,1 %. Ostali uzorci imaju manje vrijednosti od 0,9 % do 1 %. Od masnih kiselina detektirana je još i behenska (C22:0) masna kiselina kod koje se B uzorak poklapa s kontrolnim uzorkom (0,3 %), ostali imaju manji udio od 0,1 % i 0,2 %. Dobivene vrijednosti gore navedenih masnih kiselina poklapaju se s prosječnim vrijednostima navedenima u literaturi 0,1% miristinske, 0,2% palmitoleinske, 0,6% arahinske, 1,4% gadoleinske, te 0,3% behenske masne kiseline (Przybylski, 2005).

Tablica 6. Sastav masnih kiselina kontrolnog uzorka pogače te pogače mljevene 12 minuta uz hlađenje, a potom tretirane ultrazvukom uz različite amplitude i vrijeme

Masna kiselina (% od ukupnih)	UZORAK							Masna kiselina (% od ukupnih)	UZORAK						
	P	A	B	C	D	E	F		G	H	I	J	K	L	M
C14:0[¥]	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	nd*	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	C14:0[¥]	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C16:0	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1	4,4 ± 0,5	4,9 ± 0,1	4,9 ± 0,0	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,1	C16:0	4,8 ± 0,1	4,9 ± 0,1	4,9 ± 0,1	4,9 ± 0,0	5,0 ± 0,1	5,2 ± 0,3	5,1 ± 0,2
C16:1^{¥¥}	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	C16:1^{¥¥}	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
C17:0^{¥¥}	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	nd*	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	C17:0^{¥¥}	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	nd*	0,1 ± 0,0
C17:1^{¥¥}	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	nd*	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	C17:1^{¥¥}	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C18:0	1,9 ± 0,0	2,1 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	C18:0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0
C18:1n9	64,4 ± 0,2	63,2 ± 0,2	65,6 ± 0,3	65,7 ± 0,1	65,7 ± 0,2	65,2 ± 0,1	65,6 ± 0,3	C18:1n9	65,7 ± 0,3	65,4 ± 0,1	65,7 ± 0,1	65,6 ± 0,0	64,6 ± 0,1	64,1 ± 1,0	64,2 ± 1,2
C18:2n6	19,1 ± 0,0	18,5 ± 0,0	17,7 ± 0,2	18,6 ± 0,0	18,5 ± 0,1	18,8 ± 0,2	18,5 ± 0,2	C18:2n6	18,4 ± 0,1	18,5 ± 0,1	18,5 ± 0,1	18,5 ± 0,1	19,4 ± 0,1	19,7 ± 1,1	19,6 ± 0,9
C18:3n3	6,8 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,1 ± 0,1	6,5 ± 0,0	6,6 ± 0,0	6,5 ± 0,1	6,5 ± 0,0	C18:3n3	6,5 ± 0,0	6,5 ± 0,0	6,5 ± 0,0	6,5 ± 0,0	6,3 ± 0,0	6,3 ± 0,1	6,3 ± 0,2
C20:0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	C20:0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0
C20:1	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	C20:1	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
C22:0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	C22:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C22:1[¥]	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	C22:1[¥]	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Σ n.i.**	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	Σ n.i.**	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,2

Opis uzoraka nalazi se u tablici 2.

* nije detektirano

** suma neidentificiranih masnih kiselina

‡ vrijeme tretiranja ultrazvukom ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

‡ interakcija vremena tretiranja ultrazvukom i amplitude ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

Važno je napomenuti da eruka masna kiselina (C22:1) ni u jednom uzorku ne prelazi 2 % od ukupnog udjela masnih kiselina što dokazuje da se radi o kanola sorti uljane repice. Sastav masnih kiselina u uzorcima pogače uljane repice u skladu je s propisanim vrijednostima Pravilnika o jestivim uljima i mastima (Pravilnik, 2019).

Vrijeme tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta pokazalo je statistički značajan utjecaj na povećanje udjela miristinske i eruka (C22:1) masne kiseline (C14:0), dok je interakcija vremena tretiranja i amplitude imala značajan utjecaj na povećanje udjela palmitoleinske (C16:1), heptadekanske (C17:0) i heptadecenske masne kiseline (C17:1).

4.4. KONCENTRACIJA I SASTAV POLIFENOLNIH SPOJEVA

Polifenolni spojevi djeluju kao snažni antioksidansi, odnosno štite stanice od oksidativnog stresa neutralizacijom slobodnih radikala. Uljana repica bogata je polifenolima koji, kao što je već napomenuto, gotovo u potpunosti zaostaju u pogači nakon proizvodnje ulja (D'Archivio i sur., 2007). Kao antioksidansi mogu naći primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Nowak i sur. (1992) otkrili su da polifenolni spojevi uljane repice, naročito sinapinska kiselina sudjeluju u inhibiciji oksidacije emulzija.

4.4.1. Slobodni fenolni spojevi

Sastav slobodnih polifenola u uzorcima pogača određen je HPLC metodom. Rezultati su prikazani u tablici 7, a polifenolni spojevi podijeljeni u tri skupine: slobodne fenolne kiseline, derivate fenolnih kiselina i ostale spojeve.

Udio slobodnih fenolnih kiselina iznosi 11 % od ukupnih polifenolnih spojeva, dok prema navodima u literaturi zauzimaju 15 % (Naczki i Shahidi, 1989). Od slobodnih fenolnih kiselina prisutne su sinapinska, galna, *p*-kumarinska, klorogenska i ferulinska. Prema literaturnim navodima najdominantnija je sinapinska kiselina čiji je udio većim dijelom vezan u glukozide i estere (Clandinin, 1961; Krygier i sur., 1982; Kozłowska i sur., 1983; Koski i sur., 2003). U slobodnoj formi nalazi se u niskim koncentracijama što se podudara s istraživanjem (47,32 mg 100 g⁻¹) dok se u obliku sinapina i drugih derivata nalazi u puno većim koncentracijama. U odnosu na kontrolni uzorak, udio sinapinske kiseline u slobodnoj formi povećao se u svim uzorcima osim u uzorku A gdje je koncentracija ostala ista. Najveći porast koncentracije od 21 % vidljiv je u uzorku G mljevenom 12 minuta uz hlađenje te tretiranom ultrazvukom pri amplitudi od 80 % i vremenu od 9 minuta. Udio galne kiseline bilježi pad koncentracije u uzorcima H (8 %) i K (3 %) tretiranih ultrazvukom pri amplitudama od 80 % i 60 % u vremenu od 6 minuta, a najveći porast u uzorku M (73 %) koji se tretirao pri amplitudi od 60 % u vremenu od 9 minuta. Udjeli klorogenske i ferulinske kiseline kod svih uzoraka imaju porast koncentracije. U usporedbi s kontrolnim, uzorak G (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 9 minuta) kod obje kiseline ima najveći porast koncentracije i to klorogenske kiseline za 66 %, a ferulinske za 24 %.

Što se tiče *p*-kumarinske kiseline uzorci A (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) i H (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) imaju pad koncentracije, dok najveći porast od 33 % ima uzorak M (ultrazvuk pri amplitudi 60 % u vremenu od 9 minuta). Bitno je napomenuti da je vrijeme tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta imalo statistički značajan utjecaj samo na koncentraciju *p*-kumarinske kiseline.

Dominantan spoj u svim uzorcima pogače uljane repice bio je sinapin, kolin ester sinapinske kiseline (380,39 mg SAE 100 g⁻¹). Najveći porast koncentracije sinapina (36 %) vidi se kod uzorka G (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 9 minuta), a pad kod uzoraka A (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) za 1 % i K (ultrazvuk pri amplitudi 60 % u vremenu od 6 minuta) za 0,4 %. Udio sinapina ovisi o kultivaru uljane repice, uvjetima uzgoja, korištenom otapalu za ekstrakciju i odabiru metode za identifikaciju (Naczki i sur., 1998; Zago i sur., 2015).

Od ostalih spojeva detektirani su siringaldehid i kanolol. Koncentracija siringaldehida, u odnosu na kontrolni uzorak (10,88 mg 100 g⁻¹), smanjila se u svim uzorcima osim u uzorku G (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 9 minuta) gdje se povećala za 4 %. Kanolol kao jedan od najsnažniji antioksidansa i antimutagena nastaje dekarboksilacijom sinapinske kiseline prilikom termičke obrade sjemenja. Kod ispitivanih uzoraka pogače nalazi se u nešto nižim

koncentracijama zbog manje polarnosti u odnosu na sinapin i sinapinsku kiselinu. Kanolol se većinom koncentrira u nerafiniranom ulju gdje predstavlja dominantni spoj (Kraljić i sur., 2013; Kuwahara i sur., 2004; Koski i sur., 2003). Koncentracija kanolola naspram kontrolnog uzorka povećala se u uzorcima A, E, F, J, K i M, najviše u F (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) uzorku pogače i to za 20 %. Kod uzoraka B, C, D, G, H, I i L došlo je do smanjenja koncentracije najveći pad je kod uzorka I (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) gdje je koncentracija u odnosu na kontrolni uzorak smanjena za 83 %.

Tablica 7. Sastav i koncentracija (mg 100 g⁻¹) slobodnih polifenola i njihovih derivata u pogači mljevenoj s hlađenjem i tretiranom ultrazvukom određen HPLC metodom

Polifenolni spoj	Uzorak													
	P	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Slobodne fenolne kiseline (mg 100g ⁻¹)														
galna kiselina	70,24 ± 0,84	73,93 ± 3,08	71,64 ± 0,77	73,51 ± 0,24	76,07 ± 0,79	96,09 ± 8,45	104,35 ± 4,90	81,42 ± 0,65	64,96 ± 3,91	93,14 ± 0,55	75,63 ± 7,41	68,48 ± 0,01	71,12 ± 0,20	121,53 ± 0,85
klorogenska kiselina	16,01 ± 0,24	17,29 ± 0,73	16,40 ± 0,14	17,93 ± 0,29	20,06 ± 0,08	19,57 ± 1,26	22,04 ± 0,52	26,64 ± 0,15	18,72 ± 1,34	20,66 ± 0,28	20,35 ± 1,39	18,49 ± 0,04	23,04 ± 0,14	22,20 ± 0,03
ferulinska kiselina	67,44 ± 0,72	68,32 ± 2,53	68,75 ± 0,91	72,32 ± 0,38	71,86 ± 0,51	77,67 ± 6,01	79,25 ± 3,17	83,95 ± 0,50	67,62 ± 2,82	74,83 ± 0,18	75,26 ± 6,14	73,60 ± 0,31	71,95 ± 1,87	79,20 ± 0,18
sinapinska kiselina	47,32 ± 0,56	47,28 ± 1,70	48,56 ± 0,19	51,22 ± 0,34	48,14 ± 0,08	54,38 ± 3,79	56,34 ± 2,27	57,36 ± 0,46	48,57 ± 1,84	53,74 ± 0,40	52,63 ± 3,65	51,87 ± 0,40	47,78 ± 0,28	56,34 ± 0,00
<i>p</i> -kumarinska kiselina [‡]	9,24 ± 0,98	9,09 ± 2,00	9,70 ± 0,51	9,85 ± 0,09	8,96 ± 0,01	11,20 ± 0,31	11,79 ± 0,39	9,47 ± 0,05	8,89 ± 0,22	11,00 ± 0,08	11,01 ± 0,12	11,17 ± 0,28	10,60 ± 0,36	12,25 ± 0,08
Derivati fenolnih kiselina (mg 100g ⁻¹)														
sinapin	380,39 ± 1,64	376,64 ± 18,65	391,51 ± 1,75	396,04 ± 6,51	402,77 ± 2,82	470,72 ± 43,37	484,73 ± 19,39	517,99 ± 4,27	386,95 ± 25,25	439,19 ± 1,65	441,66 ± 38,10	378,89 ± 3,31	406,76 ± 2,33	459,73 ± 1,57
ostali derivati	479,4 ± 2,36	481,36 ± 21,15	424,23 ± 10,36	488,97 ± 6,95	464,81 ± 1,88	560,79 ± 48,51	574,56 ± 20,48	631,64 ± 4,01	445,57 ± 25,08	582,16 ± 6,04	540,58 ± 50,88	515,40 ± 11,33	485,55 ± 8,24	561,88 ± 4,77
Ostali spojevi (mg 100g ⁻¹)														
siringaldehid	10,88 ± 0,57	9,00 ± 0,22	9,43 ± 0,20	9,60 ± 0,08	8,54 ± 0,13	9,82 ± 0,87	9,71 ± 0,38	11,28 ± 0,01	8,95 ± 0,34	5,35 ± 0,07	9,16 ± 0,70	8,88 ± 0,01	9,10 ± 0,07	9,62 ± 0,06
kanolol	68,98 ± 1,59	70,26 ± 0,77	67,43 ± 4,68	66,29 ± 2,17	58,65 ± 0,79	77,91 ± 2,53	82,68 ± 3,01	22,86 ± 0,32	63,19 ± 1,70	11,58 ± 0,08	72,33 ± 2,67	76,48 ± 0,21	58,05 ± 0,30	82,41 ± 0,02
n.i.*	705,32 ± 2,87	706,06 ± 30,59	728,94 ± 11,24	719,54 ± 8,40	704,59 ± 7,60	804,25 ± 56,06	798,67 ± 39,46	731,87 ± 10,32	665,72 ± 37,27	793,75 ± 3,65	771,12 ± 52,88	769,87 ± 8,25	626,94 ± 5,73	851,43 ± 4,05
Σ	1855,2	1859,24	1836,59	1905,26	1864,46	2182,40	2224,13	2174,48	1721,14	2085,41	2069,72	1973,14	1810,89	2256,59

* neidentificirani spojevi

‡ vrijeme tretiranja ultrazvukom ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

Većina polifenolnih spojeva, osim kanolola, u istraživanim uzorcima ima povećanje koncentracije pri tretmanu ultrazvukom od 9 minuta te amplitudama od 60 % i 80 %. Tretman ultrazvukom imao je značajan utjecaj na povećanje ukupne koncentracije fenolnih spojeva u većini uzoraka, osim u uzorcima B, H i L.

Utvrđen je statistički značajan utjecaj vremena tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta na povećanje koncentracije *p*-kumarinske kiseline kod slobodnih fenolnih spojeva ($p \leq 0,05$).

4.4.2. Vezani fenolni spojevi

Sastav i koncentracije vezanih fenolnih spojeva određeni HPLC metodom prikazani su u tablici 8. Ekstrakcija se provela samo za fenolne spojeve vezane za staničnu stjenku.

Ukupan udio vezanih fenolnih spojeva prema Naczki i Shahidi (1989) iznosi $100 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, što je znatno manje u odnosu na rezultate ovog istraživanja gdje dobivena koncentracija iznosi $1009,4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Osim dominantne sinapinske kiseline (Kozłowska i sur., 1983), prisutne su još *p*-kumarinska, ferulinska i ružmarinska kiselina. Koncentracija sinapinske kiseline u kontrolnom uzorku pogače iznosi $628,33 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a uzorak A (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) ima najveće povećanje koncentracije (6,5 %). Koncentracija oslobođene *p*-kumarinske kiseline u kontrolnom uzorku znatno je niža i iznosi $5,98 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Bitno je napomenuti da u E, F, I, J, K i M uzorcima nije detektirana, a u ostalim uzorcima uočavamo pad koncentracije. U nižim koncentracijama detektirane su i ferulinska ($12,76 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) te ružmarinska kiselina ($15,01 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Koncentracija ferulinske kiseline povećala se u uzorcima B (1,2 %) i C (2 %), a ružmarinske u uzorcima C (0,6 %), D (4,4 %) i G (0,7 %).

Koncentracija ukupnih vezanih fenola oscilirala je bez utvrđenog trenda. Utjecaj kriomljevenja i tretmana ultrazvukom najuočljiviji je kod C uzorka ($1102,36 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) gdje se udio ukupnih vezanih fenola, u odnosu na kontrolni uzorak pogače ($1009,4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), povećao za 9 %. Nasuprot tome, u uzorku M došlo je do značajnog pada koncentracije (25 %). Utvrđen je statistički značajan utjecaj amplitude tijekom tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta na povećanje koncentracije ružmarinske kiseline kod vezanih fenolnih spojeva ($p \leq 0,05$).

Tablica 8. Sastav i koncentracija (mg 100 g⁻¹) vezanih polifenola i njihovih derivata u pogači mljevenoj s hlađenjem i tretiranom ultrazvukom određen HPLC metodom

Polifenolni spoj	Uzorak													
	P	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
<i>p</i> -kumarinska kiselina	5,98 ± 0,02	5,51 ± 0,03	5,82 ± 0,10	5,75 ± 0,07	5,51 ± 0,03	nd**	nd**	4,88 ± 0,00	5,17 ± 0,08	nd**	nd**	nd**	5,52 ± 0,06	nd**
ferulinska kiselina	12,76 ± 0,06	12,05 ± 0,56	12,92 ± 0,04	13,02 ± 0,01	12,60 ± 0,04	9,88 ± 0,01	8,08 ± 0,05	10,84 ± 0,18	12,18 ± 0,01	9,21 ± 0,04	8,28 ± 0,01	8,55 ± 0,07	12,28 ± 0,09	8,35 ± 0,03
sinapinska kiselina	628,33 ± 0,03	629,75 ± 2,19	637,35 ± 0,11	669,38 ± 0,01	628,51 ± 0,04	539,75 ± 1,06	477,12 ± 0,34	520,88 ± 0,12	614,83 ± 0,23	480,55 ± 0,18	495,89 ± 0,50	506,99 ± 0,14	624,21 ± 0,78	477,51 ± 0,44
ružmarinska kiselina [‡]	15,01 ± 0,04	14,85 ± 0,08	14,97 ± 0,03	15,10 ± 0,01	15,67 ± 0,01	12,49 ± 0,10	13,65 ± 0,02	15,12 ± 0,04	13,89 ± 0,03	12,33 ± 0,01	11,47 ± 0,00	10,66 ± 0,06	14,66 ± 0,09	10,50 ± 0,05
n.i.*	347,33 ± 0,92	351,29 ± 4,78	408,12 ± 1,15	399,11 ± 0,73	416,7 ± 0,43	308,78 ± 0,78	299,38 ± 0,76	385,00 ± 0,39	337,42 ± 0,81	308,78 ± 0,38	287,67 ± 0,67	268,86 ± 0,31	355,03 ± 1,15	258,77 ± 1,08
Σ	1009,4	1013,45	1079,17	1102,36	1078,99	870,90	798,23	936,71	983,49	810,87	803,31	795,07	1011,71	755,13

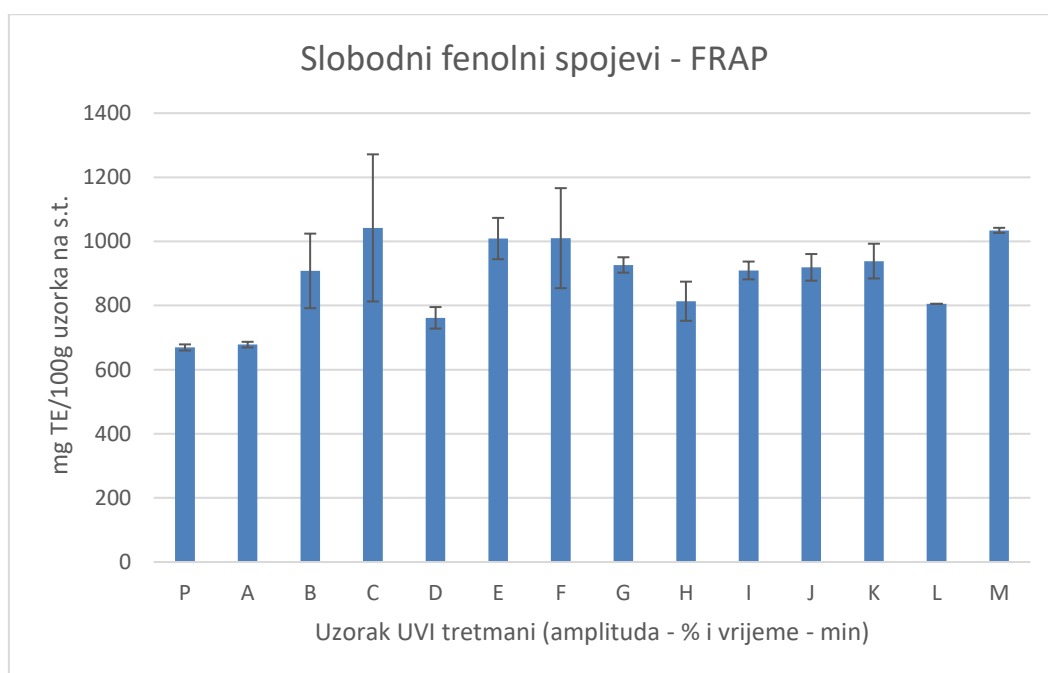
*neidentificirani spojevi

**nije detektirano

[‡] amplituda tijekom tretmana ultrazvukom ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju spoja ($p \leq 0,05$)

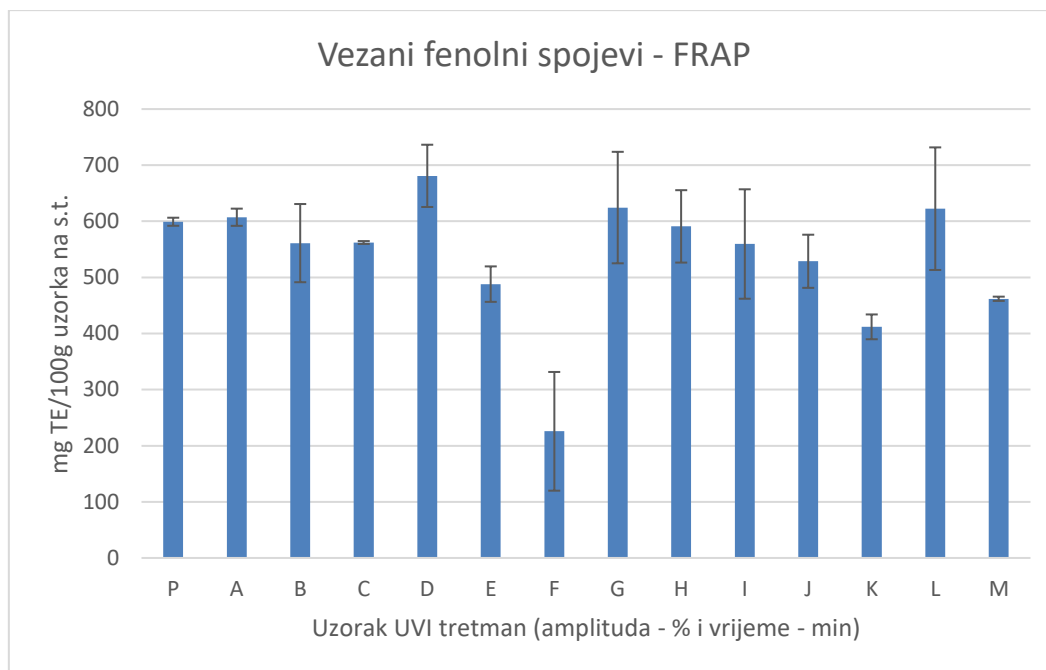
4.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA POLIFENOLNIH SPOJEVA

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata polifenolnih spojeva određena je pomoći FRAP metode. Koncentracija ukupnih polifenola određuje se pomoću pripadajućeg baždarnog dijagrama pripremljenog od svježe Trolox otopine određenog raspona koncentracija (Slika 7). Rezultati FRAP metode prikazani su na slikama 9 i 10 te je antioksidacijska aktivnost izražena kao mg Trolox ekvivalenta 100 g⁻¹ uzorka.



Slika 9. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata slobodnih polifenola određena FRAP metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja ± standardna devijacija)

Prema rezultatima antioksidacijska aktivnost slobodnih polifenolnih spojeva mijenja se oscilacijski, međutim u odnosu na kontrolni uzorak (669,3 mg TE 100 g⁻¹) uočavamo povećanje antioksidacijske aktivnosti u svim uzorcima. Tako najveće povećanje antioksidacijske aktivnosti pokazuje uzorak C (1042,1 mg TE 100 g⁻¹) tretiran ultrazvukom 3 minute pri amplitudi od 100 %, a najmanje povećanje uzorak A (678,1 mg TE 100 g⁻¹) tretiran 6 minuta pri amplitudi od 60 %.



Slika 10. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vezanih polifenola određena FRAP metodom (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija)

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vezanih fenolnih spojeva određena FRAP metodom također je oscilirala, no za razliku od rezultata za ekstrakte slobodnih polifenola, povećanje uočavamo samo u A, D, G i L uzorcima. U odnosu na kontrolni uzorak ($599,2 \text{ mg TE } 100 \text{ g}^{-1}$), najveću antioksidacijsku aktivnost ima uzorak D ($681 \text{ mg TE } 100 \text{ g}^{-1}$) tretiran ultrazvukom 6 minuta pri amplitudi od 100 %, a najmanju uzorak F ($225,7 \text{ mg TE } 100 \text{ g}^{-1}$) čemu uzrok može biti greška pri izvođenju eksperimenta.

Iz ovih rezultata vidimo da se antioksidacijska aktivnost slobodnih fenola povećala u svim uzorcima, dok se ista kod vezanih fenola povećala u 4 uzorka, a u ostalih 9 se smanjila. Do toga je moglo doći zbog povećanja temperature uzorka prilikom tretmana ultrazvukom. Iako povećanje temperature pogoduje procesu ekstrakcije, jer dolazi do povećanja topljivosti spoja u otapalu te povećanja koeficijenta difuzije, fenolni spojevi podložni su hidrolizi i oksidaciji pri temperaturama višim od 60°C (Spigno i De Faveri, 2007). Kod FRAP metode, rezultati se mogu znatno razlikovati ovisno o vremenu trajanja analize. Neki polifenoli reagiraju puno sporije pa im umjesto predviđene 4 minute treba 30 minuta za reakciju aktivnosti (Prior i sur., 2005).

Statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost kod slobodnih fenola imale su sinapinska i p-kumarinska kiselina, dok kod vezanih fenola značajan utjecaj imaju ferulinska i p-kumarinska kiselina. Iako je bilo za očekivati još fenolnih kiselina koje bi značajno utjecale na

antioksidacijsku aktivnost, rezultati se slažu s literaturom gdje je dokazano da hidroksicimetne kiseline pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s hidroksibenzojevim kiselinama čemu je razlog CH=CH-COOH skupina koja doprinosi većoj mogućnosti doniranja atoma vodika i time stabilizacije radikala, nego li -COOH skupina kod hidroksibenzojevih kiselina (Balasundram i sur., 2005).

Rezultati dobiveni FRAP metodom pokazuju da koncentracija sinapinske i *p*-kumarinske kiseline ima statistički značajnu korelaciju ($r > 0,666$) s antioksidacijskom aktivnosti slobodnih fenola, dok kod vezanih fenola statistički značajnu korelaciju pokazuje koncentracija ferulinske i *p*-kumarinske kiseline (Tablice 9 i 10).

Tablica 9. Koeficijenti korelacije (r) antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom i koncentracije (mg 100 g⁻¹) slobodnih polifenola (podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti r > 0,666)

Uzorak	galna kiselina	klorogenska kiselina	ferulinska kiselina	sinapinska kiselina	<i>p</i> -kumarinska kiselina	sinapin	ostali derivati	sirinaldehid	kanolol	n.i.	Σ	FRAP
P	70,24	16,01	67,44	47,32	9,24	380,39	479,4	10,88	68,98	705,32	1855,22	669,3
A	73,93	17,29	68,32	47,28	9,09	376,64	481,36	9,00	70,26	706,06	1768,02	678,1
B	71,64	16,40	68,75	48,56	9,70	391,51	424,23	9,43	67,43	728,94	1748,55	908,0
C	73,51	17,93	72,32	51,22	9,85	396,04	488,97	9,60	66,29	719,54	1813,82	1042,1
D	76,07	20,06	71,86	48,14	8,96	402,77	464,81	8,54	58,65	704,59	1768,34	761,6
E	96,09	19,57	77,67	54,38	11,20	470,72	560,79	9,82	77,91	824,44	2086,93	1008,9
F	104,35	22,04	79,25	56,34	11,79	484,73	574,56	9,71	82,68	798,67	2097,74	1010,2
G	81,42	26,64	83,95	57,36	9,47	517,99	631,64	11,28	22,86	737,68	2072,23	926,6
H	64,96	18,72	67,62	48,57	8,89	386,95	445,57	8,95	63,19	665,72	1695,44	813,4
I	93,14	20,66	74,83	53,74	11,00	439,19	582,16	5,35	11,58	793,75	1971,60	909,5
J	75,63	20,35	75,26	52,63	11,01	441,66	540,58	9,16	72,33	771,12	1973,75	919,1
K	68,48	18,49	73,60	51,87	11,17	378,89	515,40	8,88	76,48	769,87	1886,17	938,6
L	71,12	23,04	71,95	47,78	10,60	406,76	485,55	9,10	58,05	626,94	1716,74	805,3
M	121,53	22,20	79,20	56,34	12,25	459,73	561,88	9,62	82,41	851,43	2112,86	1034,4
	galna kiselina	klorogenska kiselina	ferulinska kiselina	sinapinska kiselina	<i>p</i> -kumarinska kiselina	sinapin	ostali derivati	sirinaldehid	kanolol	n.i.	Σ	FRAP
FRAP	0,58	0,35	0,67	0,78	0,71	0,57	0,51	0,01	0,12	0,68	0,63	1,00

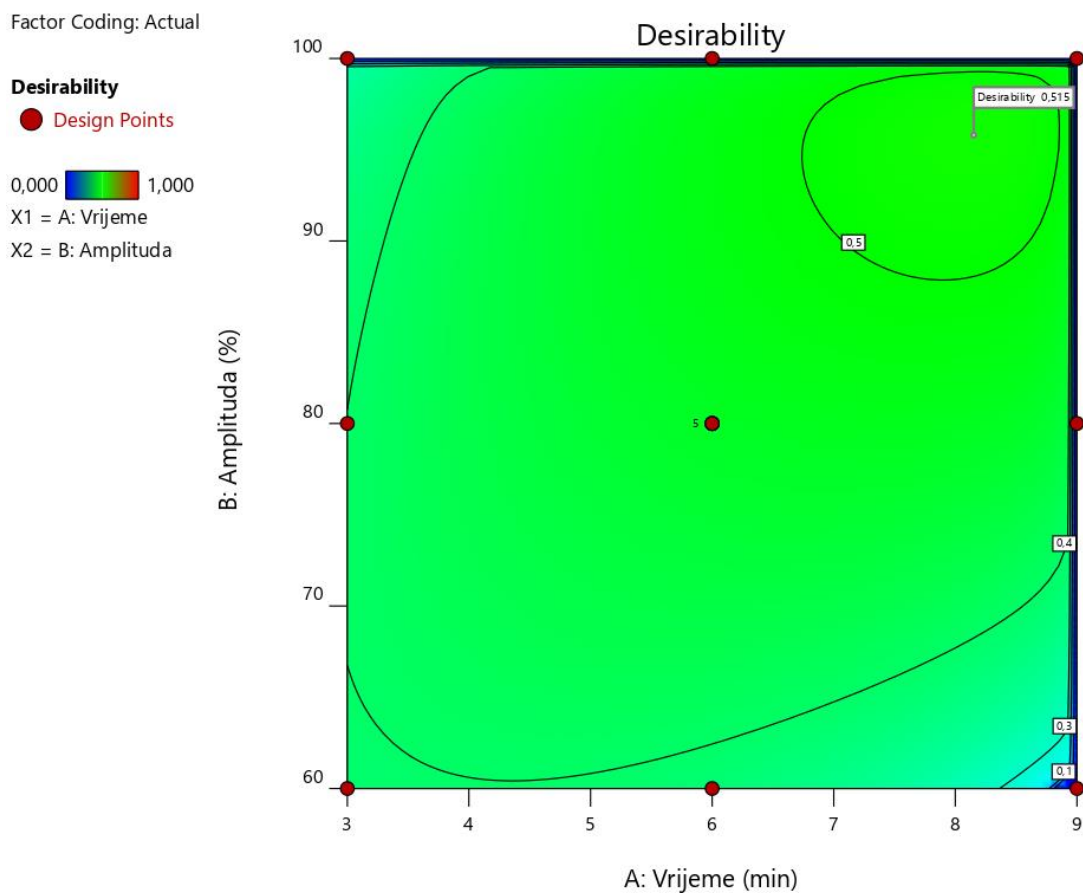
Tablica 10. Koeficijenti korelacije (r) antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom i koncentracije (mg 100 g⁻¹) vezanih polifenola (podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $r > 0,666$)

Uzorak	<i>p</i> -kumarinska kiselina	ferulinska kiselina	sinapinska kiselina	ružmarinska kiselina	n.i.	Σ	FRAP
P	5,98	12,76	628,33	15,01	347,33	1009,41	599,2
A	5,51	12,05	629,75	14,85	351,29	1013,45	607,2
B	5,82	12,92	637,35	14,97	408,12	1079,17	561,1
C	5,75	13,02	669,38	15,10	399,11	1102,36	562,2
D	5,51	12,60	628,51	15,67	416,70	1078,99	681,0
E	0,00	9,88	539,75	12,49	308,78	870,90	488,0
F	0,00	8,08	477,12	13,65	299,38	798,23	225,7
G	4,88	10,84	520,88	15,12	385,00	936,71	624,5
H	5,17	12,18	614,83	13,89	337,42	983,49	590,9
I	0,00	9,21	480,55	12,33	308,78	810,87	559,5
J	0,00	8,28	495,89	11,47	287,67	803,31	528,7
K	0,00	8,55	506,99	10,66	268,86	795,07	411,9
L	5,52	12,28	624,21	14,66	355,03	1011,71	622,5
M	0,00	8,35	477,51	10,50	258,77	755,13	461,9
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	ferulinska kiselina	sinapinska kiselina	ružmarinska kiselina	n.i.	Σ	FRAP
FRAP	0,71	0,73	0,63	0,53	0,65	0,67	1,00

4.6.REZULTATI OPTIMIRANJA UVI TRETMANA

Za optimizaciju tretmana pogače uljane repice na udjele esencijalnih masnih kiselina i glavnih fenolnih spojeva, korištena je metoda poželjnosti. Numerička funkcija optimizacije upotrijebljena je za pronalaženje udjela navedenih komponenti koji daje istodobno maksimalnu poželjnost za 13 parametara: minimalne vrijednosti vremenskog trajanja tretmana i amplitude i maksimalne vrijednosti za linolnu i α -linolensku masnu kiselinu te slobodne fenolne spojeve – ferulinsku, i sinapinsku kiselinu, sinapin i njegove derivate, ukupne neidentificirane i ukupne fenole i vezane fenolne spojeve – sinapinsku kiselinu i ukupne neidentificirane i ukupne fenole. Svi odabrani

parametri obilježeni su faktorom važnosti 3. Rezultati optimizacije su dali rješenje od 8 min trajanja tretmana uz amplitudu od 96% uz poželjnost 0.515.



Slika 11. Poželjnost optimiranog tretmana UVI

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja utjecaja kriomljevenja uz primjenu kriogenog hlađenja u vremenskom intervalu od 12 minuta te tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta na antioksidacijsku aktivnost pogače uljane repice može se zaključiti sljedeće:

1. Mljevenje pogače uljane repice na kriomlinu uz hlađenje uzrokuje veće i brže smanjenje veličine čestica te uniformiraniju raspodjelu čestica.
2. Vrijeme tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta pokazalo je statistički značajan utjecaj na povećanje udjela miristinske (C14:0) i eruka (C22:1) masne kiseline, dok je interakcija vremena tretiranja i amplitude imala značajan utjecaj na povećanje udjela palmitoleinske (C16:1), heptadekanske (C17:0) i heptadecenske (C17:1) masne kiseline ($p \leq 0,05$).
3. Utvrđen je statistički značajan utjecaj vremena tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta na povećanje koncentracije *p*-kumarinske kiseline kod slobodnih fenolnih spojeva i utjecaj amplitude na povećanje koncentracije ružmarinske kiseline kod vezanih fenolnih spojeva ($p \leq 0,05$).
4. Koncentracija sinapinske i *p*-kumarinske kiseline ima statistički značajnu korelaciju s antioksidacijskom aktivnosti slobodnih fenola, dok kod vezanih fenola statistički značajnu korelaciju pokazuje koncentracija ferulinske i *p*-kumarinske kiseline ($r > 0,666$).
5. Vrijeme tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta od 8 minuta i amplituda od 96 % pokazali su se optimalnima za povećanje udjela ferulinske kiseline, sinapinske kiseline, sinapina, ostalih derivata, neidentificiranih spojeva te ukupnih fenola kod slobodnih polifenolnih spojeva te sinapinske kiseline, neidentificiranih spojeva i ukupnih fenola kod vezanih polifenolnih spojeva uz povećanje antioksidacijske aktivnosti (poželjnost 0.515).

6. LITERATURA

Abrehdari, S., Ghavami, A., Gharachorloo, M., Delkhosh, B. (2015) Evaluation and chemical comparison of triple-zero canola cultivars. *Biol. Forum Int. J.* **7**, 1037-1044.

Aider, M., Barbana, C. (2011) Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. *Trends Food Sci. Tech.* **22**(1), 21-39.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2005) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**(1), 191-203.

Benković, M., Novotni, D., Voučko, B., Čurić, D., Ježek, D., Čukelj, N. (2018) Influence of Cryo-Grinding on Particle Size Distribution of Proso Millet Bran Fraction. The 20th international conference on food science and nutrition, Pariz.

Bockisch, M. (1998). Fats and oils handbook. AOCS Press. Illionois.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **56**(11), 317-333.

Brlak Savić, T., Krička, T., Voća, N., Jurišić, V., Martin, A. (2009) Effect of Storage Temperature on Rapeseed Quality. *Agric. conspec. sci.* **74**(3), 143-147.

Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvat. Cas. Prehrambenu Tehnol. Biotehnol. Nutr.* **4**(1-2), 32-37.

Campbell, L., Rempel, C., Wanasundara, J. (2016) Canola/Rapeseed Protein: Future Opportunities and Directions—Workshop Proceedings of IRC 2015. *Plants*, **5**(2), 17.

Clandinin, D. (1961). Effect of sinapine, the bitter substance in rapeseed oil meal on the growth of chickens. *Poultry Sci.* **40**, 484-487.

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

- D' Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **43**(4), 348-361.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**(2), 22-33.
- Fahey, J., Zalcmann, A., Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**(1), 5-51.
- Gadžo, D., Đikić, M., Mijić, A. (2011) *Industrijsko bilje*, 1. izd., Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, str. 32-34.
- Goswami, T. (2017) Recent Trends of Application of Cryogenics in Food Processing and Preservation. *J. Food Nutr. Popul. Health*, **1**(3:27).
- Hemery, Y., Chaurand, M., Holopainen, U., Lampi, A.M., Lehtinen, P., Piironen, V., Sadoudi, A., Rouau, X. (2011) Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part I: Influence of ultra-fine grinding. *J. Cereal Sci.* **53**, 1-8.
- Herceg, Z. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo*, **59**(1), 65-69.
- Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Krešić, G. (2009) Procesiranje hrane ultrazvukom. U: *Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci*, Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-67.
- HRN EN ISO 12966-2:2017, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom - 2. dio: Priprava metilnih estera masnih kiselina (osnovna referentna metoda).
- HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (osnovna referentna metoda).
- HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari, (osnovna referentna metoda).
- Huang, A. H. C. (1992) Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant. Phys.* **43**, 177-200.
- Ivančević, S., Mitrović, D. (2012) Specifičnosti sušenja proizvoda liofilizacijom. *Cont. Agr. Engng.* **38**(2), 71-188.
- Junghare, H., Hamjade, M., Patil, C., Girase, S., M. Lele, M. (2017) A Review on Cryogenic Grinding. *Int. J. Curr. Eng. Technol.* Special issue-7, 420-423.

- Kalia, S., Fu, S. (2013) *Cryogenic Processing: State of the Art, Advantages and Applications*. U: *Polymers at cryogenic temperatures*, Springer, Berlin, str.1-7.
- Kokić, B., Palić, D. (2012) Glukozinolati uljane repice kao antinutritivni faktori u ishrani životinja. *Ratar. Povrt.* **49**, 113-118.
- Koski, A., Pekkarinen, S., Hopia, A., Wahala, K., Heinonen, M. (2003) Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *Eur. Food. Res. Technol.* **217**(2), 110-114.
- Kozłowska, H., Naczka, M., Shahidi, F., Zadernowski, R. (1990) Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. U: *Canola and rapeseed production: chemistry, nutrition and processing technology*, (Shahidi, F., ured.), Van Nostrand Reinhold, New York, str. 193-210.
- Kozłowska, H., Rotkiewicz, D.A., Zadernowski, R. (1983) Phenolic Acids in Rapeseed and Mustard. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60**(6), 1119-1123.
- Kraljić, K., Škevin, D., Pospišil, M., Obranović, M., Neđeral, S., Bosolt, T. (2013) Quality of rapeseed oil produced by conditioning seeds at modest temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 589-599.
- Kryger, K., Sosulski, F., Hogge, L. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 2. Composition of phenolic acids in rapeseed flour and hulls. *J. Agric. Food.* **30**, 334-336.
- Kuraica, I. (2019) Utjecaj kriomljevenja na sastav fenola, sterola i antioksidacijsku aktivnost pogače lana. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Kuwahara, H., Kanazawa, A., Wakamatsu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, T., Maeda, H. (2004) Antioxidative and Antimutagenic Activities of 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (Canolol) Isolated from Canola Oil. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4380-4387.
- Leming, R., Lember, A. (2006). Chemical composition of expeller-extracted and cold-pressed rapeseed cake. *Agraarteadus.* **16**, 103-109.
- Lovrić, T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb.
- Mašović, S., A. Janković, M., P. Radulović, E. (2000) Ispitivanje promena kvaliteta jabuka konzervisanih sušenjem, sušenjem - smrzavanjem i liofilizacijom. *Acta Period. Technol.* **31**, 213-219.

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

Mamilović, K. (2018) Utjecaj kriomljevenja na udio sterola i prehrambenih vlakana pogače uljane repice. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Mofardin, I. (2013) Utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta na izolaciju ukupnih fenola i antocijana iz taloga vina. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Mondragón, R., Juliá, J., Barba, A., Jarque, J. (2013) Influence of the particle size on the microstructure and mechanical properties of grains containing mixtures of nanoparticles and microparticles: Levitator tests and pilot-scaled validation. *J. Eur. Ceram. Soc.* **33**(7), 1271-1280.

Naczk, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., Shahidi, F. (1998) Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.* **62**(4), 489-502.

Naczk, M., Shahidi, F. (1989) The effect of methanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chem.* **31**, 159-164.

Nowak, H., Kujava, R., Zadernowski, R., Rocznik, B., Kozłowska, H. (1992) Antioxidative and bactericidal properties of phenolic compounds in rapeseeds. *Fat. Sci. Technol.* **94**, 149-152.

Pospišil, M., Mustapić, Z. (1995) Evaluacija novih 00-kultivara uljane repice. *Sjemenarstvo*, **12**(4-5), 273-282.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2019) *Narodne novine* **11**, Zagreb.

Prior, R.L., Xianli, W., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290–4302.

Przybylski, R., Mag, T., Eskin, N., McDonald, B. (2005). Canola oil. U: Bailey's industrial oil and fat products, Vol. 2., Edible oil and fat products: Edible Oils, 6.izd., (Shahidi, F., ured.), Wiley, Hoboken, str. 6-121.

Rac, M. (1949) *Tehnologija biljnih ulja*. Industrijska knjiga, Beograd.

Rac, M. (1964) *Ulja i masti*. Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd.

- Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Werner, Z. (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kem. Ind.* **59**(4), 169-177.
- Rosa, N.N., Barron, C., Gaiani, C., Dufour, C., Micard, V. (2013) Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *J. Cereal Sci.* **57**, 84-90.
- Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G. (2003) Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A.* **1012**, 119–128.
- Shahidi, F. (1990) Rapeseed and canola: Global production and distribution. U: Canola and rapeseed. Production, chemistry and processing technology, (Shahidi, F., ured.), Springer, New York, str. 3-15.
- Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007) Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.* **78**, 793–801.
- Szydłowska-Czerniak, A., Bartkowiak-Broda, I., Karlović, I., Karlovits, G., Szlyk, E. (2011) Antioxidant capacity, total phenolics, glucosinolates and colour parameters of rapeseed cultivars. *Food Chem.* **127**(2), 556-563.
- Tan, S., Mailer, R.J., Blanchard, C.L., Agboola, S.O. (2011) Canola Proteins for Human Consumption: Extraction, Profile, and Functional Properties. *J. Food Sci.* **76**, 16- 28.
- Thiyam, U., Kuhlmann, A., Stöckmann, H., Schwarz, K. (2004) Prospects of rapeseed oil by-products with respect to antioxidative potential. *Compt. Rend. Chim.* **7**, 611-616.
- Tripathi, M., Mishra, A. (2007) Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Tech.* **132**(1-2), 1-27.
- Unger, E. (1990) Commercial processing of canola and rapeseed: Crushing and oil extraction. U: Canola and rapeseed: Production, chemistry, nutrition and processing technology, (Shahidi, F., ured.), Van Nostrand Reinhold, New York, str. 235-251.
- Wilczek, M., Bertling, J., Hintemann, D. (2004) Optimised technologies for cryogenic grinding. *Int. J. Miner. Process.* **74**, 425-434.
- Yates, K., Pohl, F., Busch, M., Mozer, A., Watters, L., Shiryaev, A., Kong Thoo Lin, P. (2019) Determination of sinapine in rapeseed pomace extract: Its antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties. *Food Chem.* **276**, 768-775.

Yu, X., Gouyo, T., Grimi, N., Bals, O., Vorobiev, E. (2016) Ultrasound enhanced aqueous extraction from rapeseed green biomass for polyphenol and protein valorization. *Cr. Chim.* **19**(6), 766-777.

Zacchi, P. and Eggers, R. (2008) High-temperature pre-conditioning of rapeseed: A polyphenol-enriched oil and the effect of refining. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**(2), 111-119.

Zago, E., Lecomte, J., Barouh, N., Aouf, C., Carré, P., Fine, F., Villeneuve, P. (2015) Influence of rapeseed meal treatments on its total phenolic content and composition in sinapine, sinapic acid and canolol. *Ind. Crop. Prod.* **76**, 1161-1170.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vesna Alilović