

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 30. rujna, 2021.

Alma Marevci

1233/PI

ENZIMSKI TRETMAN POGAČE

LANA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju masti i ulja na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Marko Obranović, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Melise Trputec, tehnički suradnik.

Ovaj 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).

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentoru doc.dr.sc. Marku Obranoviću na ukazanom povjerenju, suradnji i susretljivosti. Najljepša hvala tehničkoj suradnici Melisi Trputec na velikom trudu, pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada te prijateljskom pristupu.

Veliko hvala mojoj obitelji i najbližima na pružanoj podršci, strpljenju i motivaciji tijekom svih godina. Također, hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi godine studiranja učinili ljepšima, a najveće hvala mom Luki koji je vjerovao u mene i moj uspjeh kada ni sama nisam, na svakoj lijepoj riječi i strpljenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ENZIMSKI TRETMAN POGAČE LANA

Alma Marevci, 1233/PI

Sažetak:

Pogača lana je nusproizvod prilikom proizvodnje lanenog ulja te sadrži značajan udio bioaktivnih spojeva. Kako bi se povećala iskoristivost nusproizvoda, povećava se i broj istraživanja vezanih za proizvodnju funkcionalno obogaćenih proizvoda uz upotrebu nusproizvoda prehrambene industrije. Cilj ovoga rada bio je provesti enzimsku hidrolizu pogače lana prethodno mljevenu uz kriogeno hlađenje dušikom te dobivenim hidrolizatima ispitati stupanj hidrolize, antioksidacijsku aktivnost FRAP metodom te odrediti in vitro probavljivost. Statističkom obradom nije pokazan značajan utjecaj temperature hidrolize, koncentracije enzima i vremena na stupanj hidrolize ($p=0,137$). Značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ima temperatura hidrolize ($p=0,002$). Koncentracija i vrijeme nisu pokazali značajan utjecaj na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ($p>0,05$). Također, nije dobiven značajan utjecaj vremena, koncentracije enzima ili temperature na koncentraciju primarnih amina ($p>0,005$). Za definiranje optimalnih uvjeta hidrolize pogače lana potrebno je provesti daljnja istraživanja.

Ključne riječi: *antioksidacijska aktivnost, hidroliza, in vitro probavljivost, kriomljevenje, lanena pogača*

Rad sadrži: 40 stranica, 10 slika, 4 tablice, 43 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc.dr.sc. Marko Obranović*

Pomoć pri izradi: *Melisa Trpudec, tehnički suradnik*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Sandra Balbino* (predsjednik)
2. Doc.dr.sc. *Marko Obranović*
3. Izv.prof.dr.sc. *Dubravka Novotni*
4. Prof.dr.sc. *Ksenija Marković* (zamjena)

Datum obrane: dan, 30. rujna 2021.

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

ENZYMATIC TREATMENT OF FLAXSEED CAKE

Alma Marevci, 1233/PI

Abstract:

Flaxseed cake is a by-product of flaxseed oil production and contains a significant proportion of bioactive compounds. In order to increase the usability of by-products, studies related to the production of functionally enriched products with the use of by-products of the food industry are also being carried out more often. The aim of this study was to perform enzymatic hydrolysis of flaxseed cake previously ground by cryogenic cooling and the obtained hydrolysates to examine the degree of hydrolysis, antioxidant activity by FRAP method and to determine in vitro digestion. Statistical analysis did not show a significant influence of temperature of hydrolysis, enzyme concentration and time on the degree of hydrolysis ($p=0.137$). The temperature of hydrolysis has a significant effect on antioxidant activity ($p=0.002$). Concentration and time did not show a significant effect on the values of antioxidant activity ($p>0.05$). Also, there was not obtained significant effect of time, enzyme concentration or temperature on the concentration of primary amines ($p>0.005$). Further research is needed to define the optimal conditions for the hydrolysis of flax cake.

Keywords: *antioxidant activity, cryomilling, flaxseed cake, hydrolysis, in vitro digestion*

Thesis contains: 40 pages, 10 figures, 4 tables, 43 references, 0 supplements

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: *Marko Obranović, PhD*

Technical support and assistance: *Melisa Trputec, Technical Associate*

Reviewers:

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

Thesis defended: 30th, Septmeber 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SJEME LANA	2
2.1.1. Biološka kvalifikacija i sastav	2
2.2. PROIZVODNJA I UPOTREBA LANENOG ULJA	2
2.3. LANENA POGAČA	3
2.3.1. Kemijski sastav i upotreba lanene pogače	3
2.3.2. Nutritivne komponente pogače lana	4
2.4. KRIOMLJEVENJE	5
2.4.1. Kriomlin	6
2.5. HIDROLIZA PROTEINA	7
2.5.1. Antioksidacijsko djelovanje proteinskih hidrolizata	7
2.5.2. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti	8
2.6. <i>IN VITRO</i> PROBAVLJIVOST	9
2.6.1. Fungal protease A	9
2.7. LIOFILIZACIJA	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.2. Uzorci	10
3.1.3. Kemikalije i standardi	11
3.1.4. Aparatura	12
3.2. METODE RADA	12
3.2.1. Kriogeno mljevenje	12
3.2.2. Ekstrakcija ulja po Soxhletu	13
3.2.3. Određivanje proteina metodom po Kjeldahlu	14
3.2.4. Hidroliza uzoraka	15
3.2.5. Određivanje stupnja hidrolize	16
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	17
3.2.7. Liofilizacija hidroliziranih uzoraka	18
3.2.8. Određivanje probavljivosti	18
3.2.9. Statistička obrada	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. ODREĐIVANJE PROTEINA	20
4.2. REZULTATI HIDROLIZE PROTEINA	21
4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI HIDROLIZIRANE POGAČE LANA	25
4.4. ODREĐIVANJE PROBAVLJIVOSTI	30
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Lan (*Linum usitatissimum L.*) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka iz obitelji Linaceae, a laneno sjeme je bogat izvor α -linolenske kiseline, topivih i netopivih dijetalnih vlakana, proteina i fitokemikalija.

Kako se u današnje vrijeme javlja povećana potreba za hranom, to rezultira sve većom proizvodnjom, a prilikom prerade i proizvodnje hrane dolazi do nastajanja velike količine nusprodukata koji uglavnom postanu otpad. Kako bi se smanjila količina otpada iz industrija i povećala iskoristivost nusprodukata u proizvodnji hrane, posljednjih godina se fokus stavio upravo na istraživanje iskoristivosti tih nusproizvoda.

Pogača lana je kruti ostatak koji se dobije prešanjem lanenog sjemena kod proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja te se većinom koristi kao stočna hrana. S obzirom da se prilikom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja primjenjuju niže temperature, u pogači ostaje prisutna velika količina bioaktivnih spojeva. Upravo zbog toga se lanena pogača se smatra vrlo vrijednim izvorom spojeva poput lignana, fenolnih kiselina i flavonoida, koji pokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost.

Lanena pogača bogata je proteinima, a peptidi dobiveni iz lanene pogače pokazuju razne pozitivne učinke na zdravlje, poput antimikrobnog, protuupalnog i antioksidacijskog djelovanja. Zbog toga peptidi dobiveni iz lanenih proteina mogu se iskoristiti kao dodatak funkcionalnoj hrani i na taj način spriječiti i/ili odgoditi razvoj raznih kroničnih bolesti (Nwachukwu i Aluko, 2018). Bioaktivni peptidi iz proteina dobivaju se enzimskom hidrolizom, a na njihovu aktivnost utječe vrsta enzima i vrijeme trajanja hidrolize, kao i aminokiselinski sastav dobivenih peptida.

U ovom radu korištena je i nova metoda mljevenja uz primjenu kriogenog hlađenja kako bi se ispitaio utjecaj mljevenja na oslobađanje bioaktivnih spojeva.

Stoga je cilj ovoga rada provesti hidrolizu na uzorcima pogače lana koji su prethodno podvrgnuti kriogenom mljevenju, a zatim uz dodatak enzima proteaze A proučiti utjecaj količine enzima, vremena i temperature na stupanj hidrolize te antioksidacijska svojstva i probavljivost hidroliziranih uzoraka pogače lana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SJEME LANA

2.1.1. Biološka kvalifikacija i sastav

Lan (*Linum* (keltski=nit) *usitatissimum* (lat.=najkorisnije) L.) je jednogodišnja biljka iz porodice *Linaceae* čija je sirovina sjeme, a nusproizvod pogača. Zrelo sjeme lana je spljošteno i duguljasto, a boja sjemena je određena količinom taninskih pigmenata, kojih u žutom sjemenu lana nema (Shim i sur., 2014). Smeđa sorta lana raste između 0,3 i 1 metra te se uzgaja za proizvodnju tekstilnih vlakana i ulja. Sorte lana koje imaju dužu stabljiku, 80-120 cm visoku i manje sjeme, a obično se koriste za proizvodnju tekstilnih vlakana. Sorte koje se koriste za dobivanje ulja imaju kraće i jako razgranate stabljike, 60-80 cm visoke te veći broj sjemenki. Laneno sjeme je važan izvor lignana, fenolnih kiselina, minerala i masnih kiselina. Najzastupljeniji minerali u sjemenkama lana su: kalcij, mangan, fosfor i kalij. Osim što je jedan od najbogatijih izvora α -linolenske kiseline (58,5-59,7 % od ukupnih masnih kiselina) laneno sjeme je osnovni izvor visoko kvalitetnih proteina i topivih vlakana te fenolnih spojeva (Ćapin, 2016).

2.2. PROIZVODNJA I UPOTREBA LANENOG ULJA

Laneno ulje koje se upotrebljava za prehranu se proizvodi isključivo postupkom hladnog prešanja jer ima izuzetno visok udio nezasićenih masnih kiselina, osobito višestrukonezasićenih (73 %) i svako izlaganje povišenoj temperaturi (pa i temperaturi kondicioniranja) loše bi djelovalo na održivost tih ulja (Škevin, 2018).

Na oksidativnu stabilnost ulja značajno utječe sastav masnih kiselina i negliceridne komponente kao što su tokoferol i tokotrienol. Oksidacijski proces uglavnom uključuje degradaciju višestrukonezasićene masne kiseline i stvaranje slobodnih radikala, što u konačnici uzrokuje gubitak funkcionalnih svojstava i nutritivne vrijednosti (Moslavac i sur., 2009). Takvo hladno prešano laneno ulje je prikladno za ljudsku potrošnju, ali se koristi samo kao prehrambeni dodatak zbog omega-3 masnih kiselina.

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

U svijetu se lan koristi u obliku lanenog sjemena i lanenih vlakana. U Europi se uglavnom uzgaja vlaknasti lan te se kao takav koristi u poljoprivredi i za izradu tkanina i niti od čega se proizvode ribarske mreže i konopci. Ulje se može konzumirati i koristiti za proizvodnju boja, lakova, linoleuma, platnenih tkanina, tiskarskih boja i sapuna, pri čemu kao takvo prolazi postupak rafinacije. Zemlje u kojima se lan najviše proizvodi su Indija, Kanada (najveći svjetski proizvođač lana), Kina, Sjedinjene Američke Države i Etiopija (Kuraica, 2019).

2.3. LANENA POGAČA

2.3.1. Kemijski sastav i upotreba lanene pogače

Lanena pogača je kruti ostatak koji se dobije kao nusproizvod prešanja lanenih sjemenki prilikom proizvodnje lanenog ulja (slika 1). Prema kemijskom sastavu lanena pogača sadrži 11-14 % vode, 30-34 % proteina, 6-9 % masti, 31-35 % ekstrahiranih tvari bez dušika i 9-10 % celuloze. Od postotka ukupnih proteina, u najvećoj količini je prisutan arginin (22,5 %), zatim lizin (8,7 %), triptofan (5,4 %) te cistin (3,1 %) (Škevin, 2018).

Lanena pogača se uglavnom koristi kao hrana za životinje, no zbog bogatog nutritivnog sastava potencijalna je sirovina za dobivanje važnih bioaktivnih spojeva (Škevin, 2018). Također, pogača lana ima veliki potencijal za ljudsku prehranu (energetske pločice, vafli, palačinke, žitarice za doručak). Danas se još koristi se i kao obnovljivi izvor energije-ogrjev te kao sirovinska osnova za izolaciju proteina, vlakana i ostalih bioaktivnih komponenti (Ćapin, 2016).



Slika 1. Pogača lana (Anonymus 1)

2.3.2. Nutritivne komponente pogače lana

2.3.2.1. Proteini

Udio proteina se uglavnom kreće u rasponu od 20,9 do 48,1 %, sa srednjom vrijednosti od 34,5 %. Na sadržaj proteina unutar lanene pogače mogu utjecati veličina čestica, ali i tretmani tijekom obrade lana. Čestice lanene pogače od 850 μm (mikrona/mikrometara) imaju niži udio proteina od onih čija je veličina 420 μm . Zahvaljujući prisustvu jako topivih i slabije topivih polisaharida, ekstrahirani proteini iz sjemena lana mogu se koristiti pri proizvodnji mesa, sladoleda te konzervirane ribe. Interakcija između proteina i polisaharida bitna je i kod proizvodnje niskokaloričnih i nemasnih pekarskih proizvoda (Herceg, 2019).

2.3.2.2. Vitamini i minerali

Najzastupljeniji vitamini u sjemenu lana su tokoferoli (α -, β -, i γ -oblik) od kojih je dominantni tokoferol γ -tokoferol (oko 80 %) i niacin (Bernacchia i sur., 2014). Sorta, zrelost sjemena, regija uzgoja, uvjeti uzgoja i način ekstrakcije utječu na sadržaj tokoferola u lanu. Lan također sadrži i malu količinu vitamina K (filokinon) bitnu za formiranje proteina, zaslužnih za zgrušavanje krvi i izgradnju kostiju (Morris, 2007). Najzastupljeniji minerali u pogači lana su kalcij, mangan, fosfor i kalij te se koncentracija kalcija kreće od 3,3-3,8 mg g^{-1} , mangana od 4,8-5,9 mg g^{-1} , fosfora od 6,4-8,2 mg g^{-1} te kalija od 9,0-10,1 mg g^{-1} (Ogunronbi, 2011).

2.3.2.3. Prehrambena vlakna

Sjemenke cijelog lana i mljeveni lan su izvori prehrambenih vlakana, a ukupna vlakna čine oko 28 % mase sjemenki lana. Lanena vlakna su biorazgradiva te im se pripisuju dobra mehanička svojstva. Uz te karakteristike, treba naglasiti da su lanena vlakna mekana, sjajna i fleksibilna te su čvršća od vlakana pamuka. Za izradu čipke se koriste mekana lanena vlakna, dok se grublja koriste za proizvodnju užadi. Služe i kao sirovina u proizvodnji cigareta, novčanica, te za jačanje plastičnih materijala. Zbog ekoloških razloga i dobrih mehaničkih svojstava se sve više koriste kao zamjena za staklo (Singh i sur., 2011).

Lan je prepoznatljiv zbog zdravstvenih prednosti svojih ulja i fitokemikalija kao što su lignani te topivih i netopivih vlakana. Udio topivih i netopivih vlakana varira između 20:80 i 40:60. Topljive frakcije vlakana imaju svojstva gume te pokazuju pozitivan učinak na smanjenje razvoja dijabetesa, pretilosti, raka debelog crijeva, dok netopiva vlakna imaju laksativni učinak (Bekhit i sur., 2018), a glavna netopljiva frakcija vlakana se sastoji od celuloze i lignina koji

povećavaju volumen crijeva te zbog toga imaju laksativan učinak i sprječavaju konstipaciju (Muir, 2006).

Također, lignani imaju antioksidacijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. Visok sadržaj lignana također može sniziti razinu kolesterola u krvnoj plazmi. Osim navedenog, lignan se smatra potencijalnim antitumorskim agensom, posebice protiv tumora induciranih hormonima (npr. tumor prostate).

2.3.2.4. Masne kiseline

Lan je bogat različitim masnoćama, što osigurava jedinstvenu mješavinu masnih kiselina te je upravo zbog toga povijesno cijenjen. Bogat je polinezasićenim masnim kiselinama, posebno linolenskom (esencijalna omega-3 masna kiselina) s udjelom od 58,5-59,7 % i linolnom kiselinom sa 15,8-16,9 % te oleinskom sa 15,0-15,6 % (Ogunronbi, 2011). Konzumacija lanenih sjemenki i njihovih produkata povećava razinu linolenske i drugih omega-3 masnih kiselina u krvi, što za posljedicu ima smanjenje razine ukupnog kolesterola i lipoproteina niske gustoće (LDL).

U usporedbi s ostalima, laneno ulje sadrži nešto manju koncentraciju tokoferola. Najzastupljeniji (oko 80 %) je γ -tokoferol, a jedinstveni antioksidans je derivat γ -tokoferola, plastokromanol-8, sa dvostruko dužim bočnim lancem. Osim tokoferola, prisutni su i steroli koji nalaze u koncentraciji od 2,3 mg g⁻¹ dok u biljnim uljima (suncokret, soja, repica) koncentracija je 4,1-6,9 mg g⁻¹. Najzastupljeniji sterol je β -sitosterol, a zatim kampesterol i Δ 5-avenasterol (Przybylski, 2005).

2.4. KRIOMLJEVENJE

Pojam „kriogeno“ potječe od grčkih riječi *kryos* (jako hladno) i *genics* (proizvodnja) što bi u grubo značilo da kriogeno mljevenje podrazumijeva proizvodnju pomoću određenog izvora hlađenja. Dakle, kriogeno mljevenje je proces usitnjavanja materijala korištenjem niskih temperatura koje se postižu primjenom kriogenih tekućina poput tekućeg helija, vodika, neona, dušika, zraka, argona ili kisika. Kao kriogena tekućina najčešće se koristi tekući dušik (-196 °C) zbog svojih karakterističnih kemijskih i fizikalnih svojstava (inertnost, nizak viskozitet i površinsku napetost) te dostupnost na tržištu (Herceg, 2019).

Niske temperature dovode do slabljenja stanične strukture što dovodi do povećanja lomljivosti i krhkosti materijala, a time se omogućava lakše i finije usitnjavanje te ujedno se sprječavaju toplinska oštećenja i ponovna aglomeracija čestica i u konačnici se čuva aktivnost specifičnih

spojeva u hrani zbog ograničenog stvaranja topline tijekom procesa (Hemery i sur., 2011). Na taj način se zadržavaju korisne komponente i dobiva se proizvod poboljšane kvalitete (Kaur i Srivastav, 2018). Također, kriomljevenjem se troši manje energije i povećava se produktivnost. Uspoređujući s mljevenjem pri sobnoj temperaturi, ovim načinom usitnjavanja dobiju se veličine čestica od oko 50 μm što bi se pri sobnoj temperaturi postiglo tek nakon 3 uzastopna mljevenja (Hemery i sur., 2011). Osim toga, s obzirom da dolazi do povećanja aktivne površine, dolazi i do lakše ekstrakcije fenolnih spojeva.

2.4.1. Kriomlin

Kriomlin je laboratorijski uređaj koji spada u skupinu kugličnih mlinova (slika 2), a koristi se za provedbu usitnjavanja materijala kriogenim postupkom. Kuglični mlin je uređaj koji za usitnjavanje tvrdih materijala koristi čelične kuglice, pri čemu bubanj s uzorkom rotira. Izvor tekućeg dušika je pohranjen u spremniku te je povezan s cijevi na sami uređaj. Time se osigurava integrirani sustav hlađenja te se tekući dušik uvodi kontinuirano u sustav u točno određenim količinama kako bi se radna temperatura održala na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Retsch, 2017a). Automatski sustav hlađenja osigurava kontinuirano hlađenje posudice s uzorkom prije i tijekom cijelog procesa mljevenja, pri čemu proces započinje tek kada je uzorak ohlađen na radnu temperaturu. Time se postiže efikasnije usitnjavanje, ali i očuvanje kvalitete uzorka.



Slika 2. Vibracioni kriomlin i spremnik za tekući dušik (proizvođač Retsch i Apollo) (Anonymus 2)

2.5. HIDROLIZA PROTEINA

Proteini su izvor esencijalnih aminokiselina i energije, a osim uloge makronutrijenata, neki proteini iz hrane imaju pozitivan učinak na zdravlje jer njihovom hidrolizom nastaju bioaktivni peptidi (Chalamaiah i sur., 2018). Hidrolizati proteina dobivaju se enzimskom, kiselinskom ili mikrobnom hidrolizom biološkog materijala izoliranog iz tkiva životinja, biljaka, mikroorganizama ili mliječnih proizvoda koji su bogati različitim hranjivim tvarima, kao što su aminokiseline, oligopeptidi, lipidi, elementi u tragovima, vitamini i minerali (Franěk i sur., 2000).

Uspoređujući peptide niske molekulske mase s ishodnim proteinima, peptidi su lakše probavljivi i biodostupniji. Zadnjih je godina dokazano da proteinski hidrolizati posjeduju širok raspon različitih bioloških aktivnosti, uključujući antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje te imunomodulatorno, antitumorsko i antihipertenzijsko djelovanje (Garcia i sur., 2013). Osim navedenih bioloških aktivnosti, proteinski hidrolizati posjeduju i različita fizikalno-kemijska svojstva poput topljivosti, vezanja lipida te stvaranja emulzija.

Smatraju se prirodnim bioaktivnim sastojcima funkcionalne hrane, lijekova i kozmetike. Danas najveću pažnju privlače hidrolizati s antioksidacijskim djelovanjem zbog potencijalne prirodne zamjene za umjetne antioksidanse u proizvodima za ljudsku upotrebu (Vaštag, 2010).

2.5.1. Antioksidacijsko djelovanje proteinskih hidrolizata

Namirnice sa visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina vrlo su podložne procesu oksidacije. Posljedice reakcije oksidacije u hrani su promjena boje, okusa i mirisa proizvoda, te u konačnici može doći do gubitka nutritivne vrijednosti. Osim toga, oksidacijom mogu nastati toksični produkti, zbog čega postoji potreba dodatka antioksidansa kako bi se očuvala kvaliteta proizvoda. Zbog toga se često koriste sintetski antioksidansi poput butil-hidroksitoluena (BHT) i butil-hidroksianisola (BHA), dok se od prirodnih antioksidansa koriste askorbinska kiselina i α -tokoferol (Kasote, 2013). Sve je veća potražnja za novim i sigurnim antioksidansima prirodnog porijekla jer brojna istraživanja ukazuju na potencijalnu toksičnost sintetskih antioksidansa (Udenigwe i Aluko., 2012).

Lanena pogača izvor je spojeva poput lignana, fenolnih kiselina i flavonoida koji imaju antioksidacijsku aktivnost. Zbog toga bi se fenolni spojevi mogli izolirati iz lanene pogače te se direktno koristiti kao prirodni antioksidansi uz istovremeno nutritivno obogaćivanje proizvoda.

Proteinski hidrolizati imaju antioksidacijska svojstva poput uklanjanja ili suzbijanja reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala te inhibicija oksidacije bioloških molekula inducirane

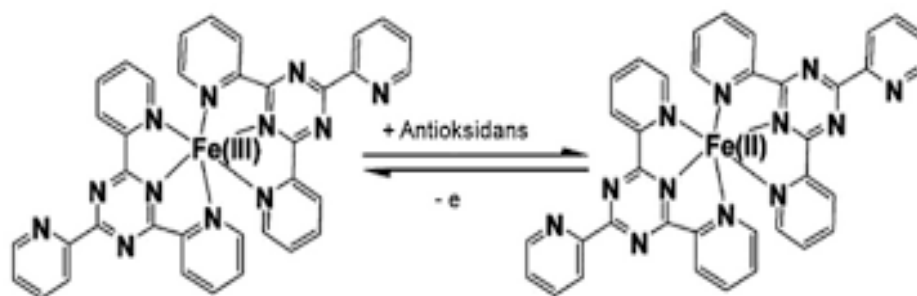
reaktivnim kisikovim vrstama. S obzirom da antioksidansi mogu sudjelovati u reakcijama prijenosa jednog elektrona, uklanjanje slobodnih radikala je moguće. Prema tome, broj aminokiselinskih ostataka koji mogu prenijeti elektrone na slobodne radikale pri fiziološkom pH može pridonijeti povećanoj antioksidacijskoj aktivnosti.

Različiti faktori utječu na antioksidacijsku aktivnost proteinskih hidrolizata, poput stupnja hidrolize, vrste proteaze korištenu za pripremu hidrolizata te svojstva nastalih peptida (molekulska masa, hidrofobnost i aminokiselinski sastav). Povećani udio histidina, cisteina, prolina, metionina i aminokiselina s aromatskim pobočnim ograncima u peptidima pridonosi povećanoj antioksidacijskoj aktivnosti peptida. Peptidi s većim udjelom hidrofobnih aminokiselinskih ogranaka pokazuju veće antioksidacijsko djelovanje zbog toga što stupaju u kontakt s hidrofobnim molekulama u stanici kao što su polinezasićeni lanci masnih kiselina (Udenigwe i Aluko., 2012).

2.5.2. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti

2.5.2.1. FRAP

FRAP je jednostavna, brza i precizna metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Mehanizam se zasniva na redukciji kompleksa željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom (Fe(III) (TPTZ)₂Cl₃) u Fe (II) pomoću antioksidanasa iz ekstrakta. Rezultat reakcije prati se promjenom žutog obojenja u intenzivno plavo obojenje u prisustvu antioksidansa. Praćenje redukcije provodi se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 593 nm (slika 3) (Shahidi i Zhong, 2015).



Fe³⁺-TPTZ (žute boje)

Fe²⁺-TPTZ (plave boje)

Slika 3. FRAP reakcija (Prior i sur., 2005)

2.6. IN VITRO PROBAVLJIVOST

Istraživanja se provode koristeći *in vivo* ili *in vitro* uvjete. Istraživački eksperimenti *in vivo* su oni u kojima se efekti različitih bioloških entiteta testiraju na cijelim živim organizmima, obično na životinjama, ali i na ljudima i biljkama.

S druge strane, *in vitro* ispitivanje odvija se u laboratoriju i obično uključuje proučavanje mikroorganizama, ljudskih ili životinjskih stanica u kulturi. *In vitro* ispitivanje izravna je metoda istraživanja koja omogućuje procjenu različitih bioloških pojava u određenim stanicama bez neželjenih varijabli prisutnih u cijelim organizmima. U radu je korištena *in vitro* metoda probave proteina koja ima visoku povezanost s modelom probave štakora i koristi se isti standard kazeina kao potpuno probavljiva kontrola (Seladi-Schulman J., 2019).

2.6.1. Fungal protease A

Gljivična proteaza A je enzim dobiven iz bakterije *Aspergillus oryzae* te je korišten kao enzim za hidrolizu u ovome radu. Aktivnost proteaze kreće se u rasponu pH 3,0-6,5, a optimalni pH je 3,0. Temperaturni raspon djelovanja ovoga enzima je 30-70 °C, a optimalna temperatura aktivnosti 60 °C. Stabilnost enzima je 18 mjeseci na suhom i hladnome mjestu. Gljivična proteaza A dostupna je u obliku bijelog do žutosmeđeg praha topivog u vodi (De Castro i Sato, 2014).

2.7. LIOFILIZACIJA

Liofilizacija je proces sušenja namirnice u zamrznutom stanju. Postupak se sastoji od nekoliko značajnih koraka, koji obuhvaćaju operacije zamrzavanja i dehidracije (sublimacija pa desorpcija) te kondicioniranja (što uključuje pakiranje i skladištenje) (Lovrić, 2011).

Zamrzavanje namirnica može se provoditi na uobičajen način ili pak u rashladnim uređajima kojima imaju mogućnost zamrzavanja na niskim temperaturama. Također se zamrzavanje može provesti otparavanjem određene količine vode podvrgavanjem proizvoda odgovarajućem vakuumu, pri čemu oduzimanje topline isparavanja izaziva njegovo zamrzavanje (Šeler, 2007).

Postupak liofilizacije se koristi prilikom sušenja uzoraka s velikom količinom vode, kod uzoraka podložnih hidrolizi te kod termolabilnih uzoraka kod kojih se voda ne može ukloniti konvencionalnim načinom sušenja (Muzzio i Dini, 2011).

Prednosti procesa su:

Velika trajnost, održanje strukture i vanjskog oblika, dobra topljivost proizvoda u prahu, dobra rekonstrukcija kod ponovnog primanja vode, porozna struktura podesna za bubrenje, neznatne

promjene boje, arome i okusa, te minimalan gubitak vitamina. Osim navedenih prednosti, smanjenjem težine snizuju se troškovi transporta i skladištenja (Lovrić, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.2. Uzorci

Materijal koji se istraživao u ovom diplomskom radu je pogača lana, proizvedena hladnim prešanjem na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

Pogača lana je prvotno samljevena na kriomlinu te joj je potom uklonjeno ulje Soxhlet ekstrakcijom. Takvim odmašćenim uzorcima pogače lana je, pomoću metode po Kjeldahlu, određen udio proteina jer se uz pomoć tog podatka te plana provedbe same analize, može uzorcima dodati točno određena količina enzima koja je potrebna za hidrolizu. Hidroliza uzoraka je provedena u dvije serije. Hidroliziranim uzorcima pogače lana je u prvoj seriji titracijskom metodom određen stupanj hidrolize te FRAP metodom antioksidacijska aktivnost. Nakon provedbe hidrolize uzoraka u drugoj seriji, provodi se liofilizacija uzoraka te im je ispitana probavljivost, tj. *in vitro* enzimski digestija koja je blisko povezana s modelom probave štakora.

3.1.3. Kemikalije i standardi

Kemikalije i standardi korišteni u ovome radu su:

- Petroleter
- Kjeldah katalizator ($K_2SO_4 + CuSO_4$)
- Koncentrirana sumporna kiselina
- Vodikov peroksid (30 %)
- Klorovodična kiselina (0.1 M, 0.06 M, 0.001 M)
- Destilirana voda
- Natrij hidroksid (0,05 M, 40 %)
- Formaldehid (13 %)
- Etanol
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina; 10-1000 mM)
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mM)
- TPTZ (10 mM)
- Acetatni pufer (300 mM)
- Pepsin
- Tripsin
- Kimotripsin
- L-Glicin
- Ninhidrin reagens (2 % otopina)
- Trikloroctena kiselina (40 % w/v)
- Tris pufer (1 M)
- Natrij – acetat pufer (50 mM)
- Alkohol (50 %)

3.1.4. Aparatura

Aparatura korištena za eksperimentalni dio ovoga rada je:

1. Mlin za kavu
2. Vibracioni kriomlin + spremnik za tekući dušik (Retsch + Apollo, Njemačka)
3. Aparatura po Soxhletu (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
4. Analitička vaga (Kern d.o.o., Slovenija)
5. Vodena kupelj s postoljem za trešnju (Stuart, Švedska)
6. Blok za spaljivanje + aspiracijski modul (Tecator, Njemačka)
7. Destilacijska jedinica Kjeldhal (Foss, Danska)
8. Centrifuga Rotina 35 (Hettich, Njemačka)
9. Centrifuga (Falcon, Colorado, SAD)
10. Spektrofotometar (PerkinElmer, SAD)
11. Liofilizator (Martin Christalpha 1-4 LSC plus, Njemačka)
12. Inkubator (Mettler, Njemačka)
13. pH metar (Jenway, Ujedinjeno Kraljevstvo)
14. Vortex (IKA, Njemačka)
15. Magnetska mješalica (IKA, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Kriogeno mljevenje

Pogača lana je prvotno ručno usitnjena, a potom finije usitnjena na mlinu za kavu, a u konačnici je provedeno i kriogeno mljevenje (prema unaprijed određenim uvjetima same meljave). Postupak uključuje $8 \pm 0,1$ g uzorka stavljenog u posudu za mljevenje u kriomlinu te dodatak 12 kuglica. Postupak mljevenja optimiran je u prijašnjim diplomskim radovima (Herceg, 2019; Kuraica, 2019). Mljevenje traje 12 minuta (u 1 ciklusu), a frekvencija udaraca i trenja su 30 Hz. Početak mljevenja je spuštanje temperature senzora na -196 °C (aktivacija timera na 3 min), a nakon isteka 3 min započinje sama meljava (12 minuta).

3.2.2. Ekstrakcija ulja po Soxhletu

Za ekstrakciju ulja iz pogača lana korištena je standardna HRN EN ISO metoda (659:2010) ekstrakcije po Soxhletu. Prethodno samljeveni uzorci pogače lana su stavljani u čahure napravljene od filter papira. Čahure su zatvorene i umetnute u čahure za ekstrakciju. Na vrhu čahure se postavlja vata te se one postavljaju u aparaturu po Soxhletu (slika 4). Zatim je dodana određena količina petroletera (otapalo za ekstrakciju). Potom se sakupljao ekstrakt (ulje + otapalo) u tikvicu u koju su prethodno dodane 3-4 staklene kuglice za vrenje.

Ekstrakcija je trajala 5 sati, a potom su uzorci izvađeni sa Soxhleta i stavljeni na sušenje na sobnu temperaturu te su kao takvi bili spremni za daljnju analizu.



Slika 4. Aparatura po Soxhletu (vlastita fotografija)

3.2.3. Određivanje proteina metodom po Kjeldahlu

Za određivanje udjela proteina u uzorcima pogače lana korištena je referentna metoda po Kjeldahlu (HRN ISO 1871, 2017). Metoda se zasniva na indirektnom određivanju udjela proteina iz udjela dušika.

Određivanje udjela proteina je započeo vaganjem uzorka pogače lana ($0,5 \pm 0,01$ g uzorka) te prebacivanjem u kivetu od 500 ml. U svaku kivetu su dodane dvije tablete Kjeldahl katalizatora te 15 ml 96 % sumporne kiseline.

Nakon pripreme stalak s kivetama postavljen je u digestijsku jedinicu za mineralizaciju te je uključen sustav za odvod para i započelo je lagano zagrijavanje. Zagrijavanje je pojačano kada se reakcija u kivetama smirila. Postupak mineralizacije zaustavljen nakon 3-4 sata kada zaostane bistra plavo-zelena tekućina (bez izgorjenih crnih komadića) jer je to indikator potpune digestije uzorka, pri čemu se dobije amonijev sulfat.

Nakon što se otopina ohladi pri sobnoj temperaturi, u uzorak se doda 79 ml destilirane vode te se kiveta stavlja u destilacijsku jedinicu Kjeltex 2100 uređaja (Foss A/S, Hillerød, Danska), a na izlaznu kondenzacijsku jedinicu se postavi Erlenmayerova tikvica s 25 ml 4 %-tne otopine borne kiseline s metilnim crvenilom i brom-krezol zeleno (služe kao indikatori). Uređaj automatski dodaje 5*10 ml natrijeve lužine (40 % otopine NaOH) i destiliranu vodenu paru (4 minute) pri čemu se kondenzira u bornu kiselinu. Količina prisutnog dušika u uzorku se određuje titracijom klorovodične kiseline ($c=0,1$ M) do promjene boje iz plavo-zelene u crvenu. Navedeni postupak vrijedi i za slijepu probu.

Udio proteina izračunava se prema formuli (1) iz udjela prisutnog dušika koji se računa prema formuli (2). Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina dvaju paralelnih određivanja.

$$\% \text{ dušika} = \frac{(V_2 - V_1) * c(\text{HCl}) * 14,008}{m} * 100 \quad [1]$$

V_2 -volumen klorovodične kiseline za titraciju (ml)

V_1 -volumen klorovodične kiseline za titraciju (ml)

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

m – masa uzorka (g)

$$\% \text{ proteina} = \% \text{ dušika} * f \quad [2]$$

f – faktor konverzije za uljarice; 6,25

3.2.4. Hidroliza uzoraka

Hidroliza uzoraka provedena je uz enzim gljivičnu proteazu A, na temperaturama od 50 °C, 60 °C i 70 °C u vremenskom razdoblju od 1, 4,5 i 8 sati. Prema formuli [3] je izračunata količina enzima koja je dodana uzorcima (ovisno o unaprijed postavljenom planu provedbe pokusa (tablica 1).

$$m(\text{enzima}) \left[\frac{\text{HUT}}{\text{g}} \right] = \frac{m(\text{uzorka}) * \%(\text{proteina u uzorku}) * c(\text{enzima})}{250000} \quad [3]$$

HUT= Hemoglobin Unit Tyrosine base

Tablica 1. Plan provedbe pokusa

	temp. [°C]	konc. [HUT]	vrijeme [h]
0	25	/	/
1	60	5000	8
2	60	3000	4,5
3	60	3000	4,5
4	60	3000	4,5
5	60	5000	1
6	60	1000	1
7	60	3000	4,5
8	60	3000	4,5
9	60	1000	8
10	50	1000	4,5
11	50	5000	4,5
12	50	3000	8
13	50	3000	1
14	70	5000	4,5
15	70	1000	4,5
16	70	3000	8
17	70	3000	1

Uzorci lanene pogače su hidrolizirani u dvije serije. U prvoj seriji se određivao stupanj hidrolize i antioksidacijska aktivnost, a u drugoj seriji probavljivost.

Najprije je potrebno pripremiti uzorke i odvagati enzime. Enzim je izvagan na aluminijskoj foliji, a količina je izračunata unaprijed za svaki pojedini uzorak.

U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 ml s obrušenim grlom odvagano je $1 \pm 0,001$ g odmašćene lanene pogače te je dispergirano u 35 ml vode. Uzorci su zatim zagrijavani u vremenu od 10 minuta nakon postignutih $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ u tikvici. Nakon toga tikvice su ohlađene na temperaturu $<50\text{ }^{\circ}\text{C}$ te je dodan enzim, a aluminijska folija je ispirana s 5 ml vode. Uzorci su potom uronjeni u vodenu kupelj na odgovarajuću temperaturu ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) i zagrijavani su 1, 4,5 ili 8 sati. Po završetku hidrolize enzim je inaktiviran zagrijavanjem u vodenoj kupelji na $100\text{ }^{\circ}\text{C}/10$ min. Uzorci su zatim ohlađeni, prebačeni u kivete te su centrifugirani 15 min pri 10 000 okretaja. U konačnici je supernatant odvojen i u njemu je određen stupanj hidrolize i antioksidacijska aktivnost. Ovaj postupak uključuju hidrolizu uzoraka u prvoj seriji.

U drugoj seriji hidrolize uzoraka, nakon završetka hidrolize, enzim inaktiviran zamrzavanjem na temperaturu $<18\text{ }^{\circ}\text{C}$, a ne zagrijavanjem u vodenoj kupelji kao u prvoj seriji hidrolize uzoraka. Nakon zamrzavanja su uzorci liofilizirani te je takvim uzorcima ispitana probavljivost.

3.2.5. Određivanje stupnja hidrolize

Stupanj hidrolize je određivan titracijskom metodom. U čaši od 150 ml pomiješano je 5 ml supernatanta i 60 ml destilirane vode te su uzorci titrirani s 0,05 M NaOH do pH 8,50 nakon čega je dodano 10 ml 13 % formaldehida i ponovno se provodi titracija s 0,05 M NaOH do pH 8,50. Stupanj hidrolize (SH) se izračuna prema formuli [4].

$$SH = \frac{c * V_t * 1,16 * \frac{V}{5 \text{ ml}}}{m * \frac{\% \text{ proteina}}{100} * 8} * 100 \quad [4]$$

SH – stupanj hidrolize

c – koncentracija titranta (NaOH; 0,05 M)

V_t – utrošeni volumen titranta nakon dodatka formaldehida do porasta pH 8,50

V – ukupni volumen uzorka (40 ml)

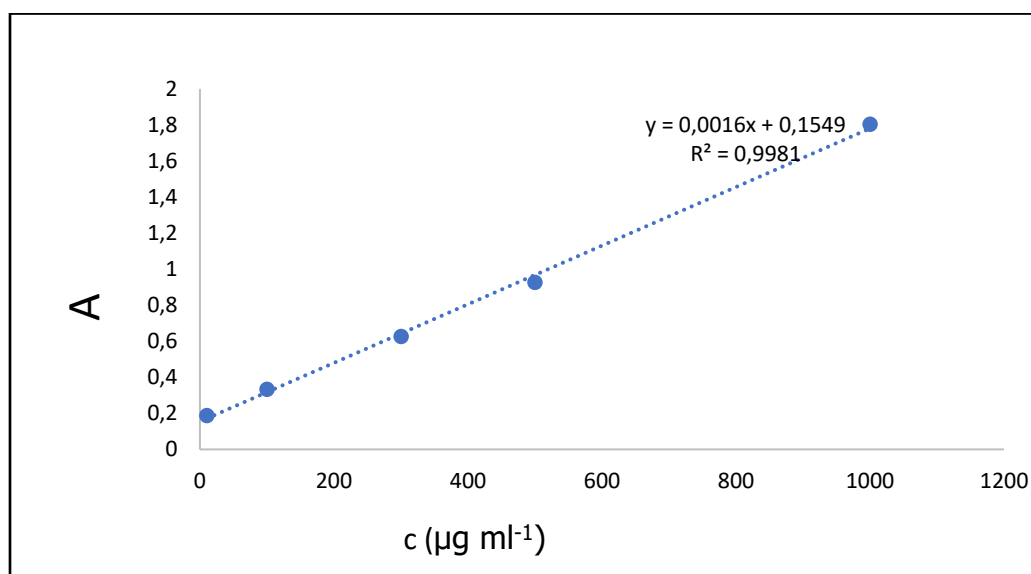
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Na dan analize je pripremljena svježa otopina FRAP reagensa. Smjesa se sastojala od 2,5 ml 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,5 ml 10 mM TPTZ u 40 mM HCl i 25 ml 300 mM acetatnog pufera. Pripremljena otopina je zagrijana na temperaturu 37 °C te je ta temperatura održavana (Benzie i Strain, 1996). U kivetu za spektrofotometrijsko mjerenje odpipetirano je 30 μl uzorka (supernatant nakon centrifugiranja hidroloziranih uzoraka) te je dodano 3 ml FRAP reagensa. Nakon 4 min izmjerena je apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru (PerkinElmer, SAD), pri 593 nm, u usporedbi sa slijepom probom. Sva mjerenja provedena su u minimalno dvije paralele za svaki uzorak, a rezultati su izraženi kao μM ekvivalenta Trolox-a po g suhe tvari uzorka. Za izradu baždarnog pravca pripremljena je otopina Trolox-a u etanolu, u rasponu koncentracija 10-1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, čija je jednadžba pravca prikazana jednadžbom [5] (slika 5).

$$y = 0,0016x + 0,1549 \quad [5]$$

y – koncentracija standarda otopine Trolox-a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

x – izmjerena vrijednost apsorbancije pri 593 nm



Slika 5. Baždarni dijagram Trolox-a

3.2.7. Liofilizacija hidroliziranih uzoraka

Nakon provedene hidrolize uzorci su zamrznuti u zamrzivaču na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ su liofilizirani. Liofilizacija je provedena u liofilizatoru Alpha 1-4 (Martin Christ, Njemačka) pri temperaturi komore liofilizatora od $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i tlaku 0,2 bara. Proces liofilizacije trajao je 24 sata, a liofilizati su skladišteni u zamrzivaču na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.8. Određivanje probavljivosti

Ispitivanje probavljivosti provedeno je na liofiliziranim uzorcima prema metodi tvrtke Megazyme (K-PDCAAS 09/17). To je *in vitro* enzimska digestija koja je blisko povezana s modelom probave štakora. Standard koji je korišten je potpuno probavljivi kazein.

Ispitivanje probavljivosti započinje vaganjem 500 mg uzorka uz dodatak 19 ml HCl (0,06 M), zatim je otopina promiješana i izvršena je inkubacija 30 min na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inkubatoru 300 o/min. Po završetku inkubacije dodano je 1 ml pepsina, a dobivena otopina je promiješana i inkubirana 60 min na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inkubatoru pri 300 o/min. Nakon provedene inkubacije od sat vremena uzorcima je podešen pH s 2 ml 1,0 M tris pufera, uzorci su ponovno promiješani te je dodano 200 μl smjese tripsin/kimotripsin. Uzorci su još jednom promiješani te inkubirani na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inkubatoru pri 300 o/min tijekom 4 h. Po završetku inkubacije, uzorci su uronjeni u kipuću vodenu kupelj te su zadržani 10 min. Nakon 10 min uzorci su promiješani te su ohlađeni na sobnu temperaturu u vremenu od najmanje 20 min. Potom slijedi pipetiranje po 4 ml svakog uzorka u plastičnu epruvetu sa zatvaračem (Falcon) te je dodan po 1 ml 40 % TCA, epruvete su promiješane i inkubirane na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, tj. u hladnjaku tijekom noći (najmanje 16 h). Slijedeći dan uzorci su izvađeni iz hladnjaka te su centrifugirani u centrifugi (Falcon, Colorado, SAD) pri 10 000 o/min. Iz takvog centrifugiranog uzorka napravljeno je razrjeđenje svakog uzorka (20 puta). U staklene epruvete od 5 ml otpipetirano je 300 μl uzorka te je dodano 150 μl ninhidrina (2 %). Korišteni standard je L-Glicin u koncentracijama 0-1 mM, a pipetirana količina glicina je jednaka količini uzorka te je također dodan ninhidrin. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda. Epruvete s uzorcima, slijepom probom i standardom stavljene su u vodenu kupelj na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 35 min. Nakon izvršenog zagrijavanja epruvete su hlađene minimalno 10 min te je dodan alkohol (50 % v/v) u količini od 450 μl . Sadržaj epruveta s uzorcima i standardom prebačen je u mikrokivete za spektrofotometrijsko mjerenje te je izmjerena apsorbancija pri 570 nm na UV/VIS spektrofotometru.

L-Glicin je korišten kao standard, a iz izmjerenih apsorbancija je napravljen dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji (baždarni dijagram).

Jednadžba pravca baždarnog dijagrama glasi: $y = 0,989x + 0,076$, $R^2=0,993$. Koristeći jednadžbu pravca baždarnog dijagrama i jednadžbu [6] i [7] izračunata je koncentracija primarnih amina prisutnih u uzorku.

$$y = A * B + C \quad [6]$$

y- apsorbancija

A - nagib

B –presjek pravca

C – nepoznata koncentracija primarnih amina

$$C2 = \frac{C1 * D * 1,25}{W} \quad [7]$$

C2 - koncentracija primarnih amina korigirana za razrjeđenje

C1 - koncentracija primarnih amina u razrijeđenom uzorku

D - faktor razrjeđenja uzorka prije određivanja amina

1,25 - razrjeđenje s TCA

W - masa uzorka (g)

3.2.9. Statistička obrada

Rezultati analize izraženi su kao srednja vrijednost dva ili više paralelnih određivanja koje su izračunate u računalnim programima Microsoft Excel 2013 i Design Expert v.11 software (StatEase, Minneapolis, USA). Provedena je faktorska analiza varijance (ANOVA), a to je jedinstveni postupak kojim je moguće raščlaniti i procijeniti varijabilnosti uvjetovane različitim čimbenicima. ANOVA je provedena kako bi se odredio utjecaj 3 nezavisnih varijabli (temperature hidrolize, vremena hidrolize i koncentracije enzima za hidrolizu) na stupanj hidrolize, antioksidacijsku aktivnost hidrolizata te koncentraciju primarnih amina. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost $p \leq 0,05$. Parametri koji su pokazali značajan

statistički utjecaj bili su nit vodilja za optimiziranje procesa hidrolize pogače lana. S obzirom da je jedini statistički značajan bio utjecaj temperature hidrolize na antioksidacijsku aktivnost, potrebno je provesti daljnja istraživanja za potpunu optimizaciju procesa hidrolize.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Lanena pogača je nusproizvod koji zaostaje tijekom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja. Pogača lana se najviše koristi kao hrana za stoku, ali pokazuju veliki potencijal kao dodatak u pripremi funkcionalnih proizvoda zbog svojeg vrlo vrijednog sastava. Također, njihovim iskorištenjem se smanjuje problem nakupljanja otpada.

Cilj ovog rada je provesti hidrolizu na uzorcima pogače lana koji su prethodno podvrgnuti kriogenom mljevenju te im je određen udio proteina, a zatim uz dodatak enzima proteaze A proučiti utjecaj količine enzima (1000, 3000 i 5000 HUT), vremena (1, 4,5 i 8 h) i temperature (50, 60 i 70 °C) na stupanj hidrolize te antioksidacijska svojstva (FRAP metodom) i probavljivost hidroliziranih uzoraka pogače lana *in vitro* metodom, tj. koncentraciju primarnih amina. Rezultati su prikazani u obliku tablica (tablica 2-tablica 4), a nakon provedene ANOVA statističke analize dobiveni rezultati prikazani su slikama (slika 6-slika 10).

4.1. ODREĐIVANJE PROTEINA

Za određivanje točne količine enzima koji su potrebni za tretman same pogače lana, potrebno je najprije odrediti ukupnu količinu proteina. Nakon kriogenog mljevenja te odmašćivanja pogače, određivala se količina proteina pomoću referentne metode, a rezultati su izraženi u postocima, tj. kao srednja vrijednost dvaju mjerenja. Količina proteina u pogači lana bila je 39,35 %.

Elsorady (2020) u svom radu navodi količinu proteina u pogači lana u vrijednosti od 38,41 % pa se može uočiti sličnost rezultata. Također, ta količina proteina se podudara i sa vrijednostima u radu Oomah (1993) u kojem su vrijednosti većine uzoraka iznad 36 %, a razlike se pripisuju genetici i okolišu.

4.2. REZULTATI HIDROLIZE PROTEINA

Nakon određivanja količine proteina u lanenoj pogači, određena je količina enzima za daljnju analizu, a uzorci lana podvrgnuti su hidrolizi proteina. Korištena je proteaza A, a hidroliza je provedena pri tri različite temperature (50, 60, 70 °C) i koncentracijama enzima 1000 HUT (Hemoglobin Unit Tyrosine base), 3000 HUT i 5000 HUT tijekom 1, 4,5 i 8 sati. Nakon provedene hidrolize uzorci se zagrijavaju na 100 °C/10 min radi inaktivacije enzima i centrifugiraju te se u supernatantu određuje stupanj hidrolize titrimetrijskom metodom. Stupanj hidrolize (SH) je izračunat iz količine utrošenog titranta (0,1 M NaOH), a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dvaju titracija svakoga pojedinog uzorka. Vrijednosti SH su različite, a ovise o temperaturi, koncentraciji enzima i vremenu hidrolize, a prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz rezultata stupnja hidrolize svih uzoraka na 50, 60 i 70 °C, pri koncentraciji enzima od 1000, 3000 i 5000 HUT i vremenu hidrolize od 1, 4,5 i 8 h

Broj uzoraka	Temp. [°C]	Konc. [HUT]	Vrijeme [h]	SH [%]
1	60	5000	8	23,57
				23,57
2	60	3000	4,5	22,09
				22,09
3	60	3000	4,5	22,83
				22,09
4	60	3000	4,5	23,57
				23,57
5	60	5000	1	22,09
				22,09
6	60	1000	1	23,57
				22,83
7	60	3000	4,5	23,57
				22,83
8	60	3000	4,5	22,83
				22,83
9	60	1000	8	23,57
				23,57
10	50	1000	4,5	22,09
				23,57
11	50	5000	4,5	23,57
				23,57
12	50	3000	8	21,36
				22,09
13	50	3000	1	25,04
				24,30
14	70	5000	4,5	22,09
				22,09
15	70	1000	4,5	22,09
				22,09
16	70	3000	8	11,78
				11,78
17	70	3000	1	23,57
				23,57

U tablici 2 može se uočiti da najveću vrijednost SH pokazuje uzorak 13 na temperaturi od 50 °C, ali s obzirom da se taj uzorak izdvaja u odnosu na druge uzorke pri 50 °C, može se zaključiti da ipak najveću vrijednost pokazuju uzorci tretirani na 60 °C (pokazuju konstantu vrijednost). Iz toga se može zaključiti da je optimalna temperatura za provođenje hidrolize 60 °C.

De Castro i Sato (2014) su u svom radu su proučavali biokemijske karakteristike proteaze iz *Aspergillus oryzae* kao i antioksidacijska svojstva hidrolizata proteina. Aktivacijska energija proteaze se mjerila u rasponu temperature od 30 do 80 °C. Rezultati su pokazali da porastom temperature u rasponu od 30 do 55 °C, aktivnost proteaze raste, zatim od 55 do 60 °C dostiže maksimum i najstabilnija je te u konačnici do 80 °C aktivnost proteaze opada, čime se zaključuje da katalitičke reakcije potiskuju enzimatsku deaktivaciju nakon postizanja maksimuma aktivnosti proteaze.

Osim temperature, u ovom radu su za određivanje stupnja hidrolize korišteni parametri - vrijeme i koncentracija enzima.

Može se uočiti da su vrijednosti SH nakon 8 h hidrolize na 60 °C i koncentracije enzima od 5000 HUT veće nego nakon 1 h hidrolize. Također, vrijednosti SH nakon 8 h hidrolize i koncentracije enzima do 1000 HUT su iste kao i nakon 1 h, te su te vrijednosti ujedno iste i kod 5000 HUT i 8 h hidrolize.

Vrijednosti SH svih uzoraka nakon 4,5 h hidrolize, uz koncentraciju enzima od 3000 HUT i temperaturi od 60 °C su vrlo slične, a uzorak broj 4 pokazuje najveću vrijednost od 23,57 %, koja je ista vrijednosti nakon 8 h hidrolize kod 1000 i 5000 HUT.

Iz prikaza rezultata može se uočiti da je SH na temperaturi hidrolize od 50 °C pri većoj koncentraciji enzima, tj. 5000 HUT veća nego pri koncentraciji enzima od 1000 HUT. Povećanjem koncentracije enzima, pri istoj temperaturi i vremenu, povećava se SH.

Na temperaturi od 70 °C, nakon 4,5 h hidrolize, stupanj hidrolize kod koncentracije enzima od 1000 HUT je veća nego kod koncentracije enzima od 5000 HUT.

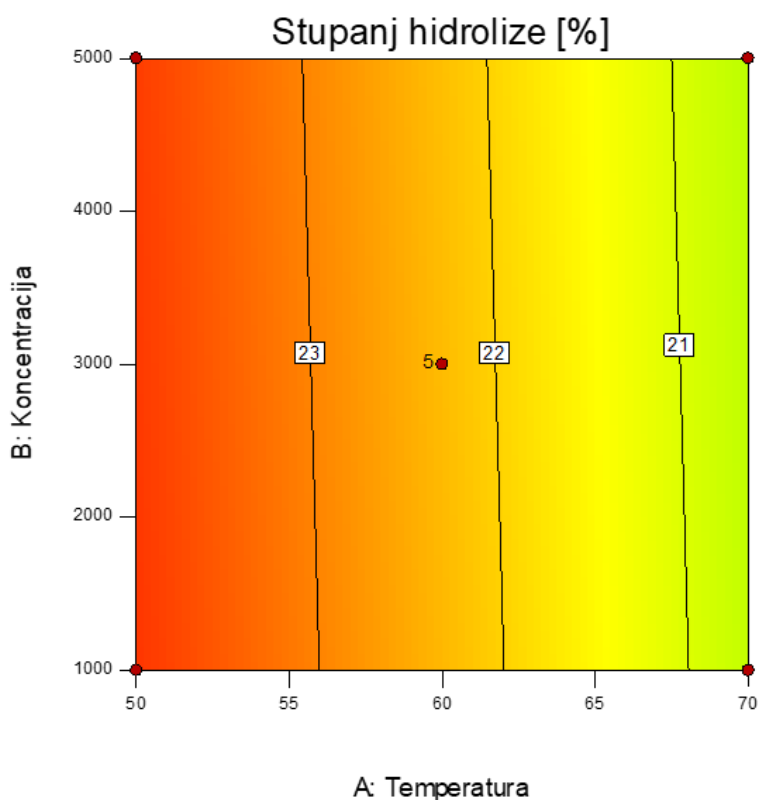
Također, može se uočiti da je najveća vrijednost SH upravo pri 4,5 h i koncentraciji enzima od 1000 HUT na temperaturi hidrolize od 70 °C.

Nakon dobivenih rezultata stupnja hidrolize, provedena je statistička analiza ANOVA, te uz pomoć dobivenih rezultata statističke analize su izrađeni grafovi (slika 6-slika 10).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Stupanj hidrolize [%]
● Design Points
24.67
11.783

X1 = A: Temperatura
X2 = B: Koncentracija

Actual Factor
C: Vrijeme = 4.5



Slika 6. Grafički prikaz rezultata stupnja hidrolize, u ovisnosti o koncentraciji enzima i temperaturi hidrolize

Vrijednosti SH variraju od 11,78 % i 25,04 %, a iz slike 6. može se uočiti da, iako su više vrijednosti SH dobivene kada je temperatura hidrolize niža, a koncentracija enzima viša (crveno područje), statističkom obradom nije pokazan značajan utjecaj temperature hidrolize, koncentracije enzima i vremena na stupanj hidrolize ($p=0,137$).

Dobiveni rezultati ne dovode do zaključka optimalnih uvjeta za najbolji SH, te uspoređujući s drugim radovima se može uočiti odstupanje dobivenih rezultata od prethodnih istraživanja na tu temu. Razlozi tome mogu biti nepreciznost u provođenju postupka mjerenja stupnja hidrolize ili osjetljivost uređaja (npr. vaganje lanene pogače na $1 \pm 0,001$ g što može utjecati na količinu proteaze te u konačnici i dobivene rezultate).

U radu (Vaštag i sur., 2009), istraživao se učinak parametra hidrolize (temperatura, omjer početnog enzima/supstrata i vrijeme) na hidrolizu proteinskih hidrolizata na pogači buče uz pomoć proteaze iz *Aspergillus niger* te antioksidacijske karakteristike dobivenih hidrolizata. Rezultati su pokazali da su optimalni uvjeti proteaze na temperaturi od 40 °C, omjer enzima/supstrata (E/S) 4,38 HUT mg^{-1} supstrata proteina i vremenu od 85 min.

Također, u radu je dobiveno da je najznačajniji parametar na SH imalo vrijeme i temperatura ($p < 0,01$), dok utjecaj koncentracije enzima nije bio značajan ($p > 0,1$). Zbog toga je zaključeno da su upravo temperatura i vrijeme imali glavni utjecaj na SH.

4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI HIDROLIZIRANE POGAČE LANA

4.3.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Mehanizam FRAP metode zasniva se na redukciji kompleksa željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} pomoću antioksidansa iz ekstrakta. Rezultat reakcije prati se promjenom žutog obojenja u intenzivno plavo obojenje u prisustvu antioksidansa. Praćenje redukcije provodi se spektrofotometrijski na način da se nakon 4 min izmjeri apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru (PerkinElmer, SAD), pri 593 nm te se rezultati usporede sa slijepom probom. Sva mjerenja provedena su u minimalno dvije paralele za svaki uzorak, a rezultati su izraženi kao μM ekvivalenta Trolox-a po g suhe tvari uzorka mjerenjem apsorbancije pri 593 nm (slika 5), a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Prikaz rezultata FRAP metode, tj. antioksidacijske aktivnosti [$\mu\text{mol (g.s.tv)}^{-1}$] svih uzoraka nakon hidrolize na 50,60 i 70 °C, pri koncentraciji enzima od 1000, 3000 i 5000 HUT i vremenu hidrolize od 1, 4,5 i 8 h

Broj uzoraka	Temp. [°C] *	Konc. [HUT]	Vrijeme [h]	Antioksidacijska aktivnost [$\mu\text{mol (g.s.tv)}^{-1}$]
1	60	5000	8	156,01
				155,01
2	60	3000	4,5	155,60
				155,90
3	60	3000	4,5	155,44
				155,88
4	60	3000	4,5	156,02
				155,18
5	60	5000	1	155,93
				154,83
6	60	1000	1	155,23
				156,05
7	60	3000	4,5	155,87
				155,43
8	60	3000	4,5	155,53
				156,07
9	60	1000	8	155,65
				155,99
10	50	1000	4,5	155,43
				155,73
11	50	5000	4,5	155,87
				155,35
12	50	3000	8	155,08
				156,20
13	50	3000	1	155,83
				155,31
14	70	5000	4,5	156,22
				155,98
15	70	1000	4,5	156,20
				156,10
16	70	3000	8	156,50
				155,48
17	70	3000	1	155,37
				156,21

* Statistički značajan utjecaj temperature hidrolize na antioksidacijsku aktivnost ($p \leq 0,05$)

Iz tablice 3 može se uočiti da su najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti na temperaturi od 70 °C pri koncentraciji enzima potrebnog za hidrolizu od 1000 i 5000 HUT.

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti nakon provedene hidrolize na temperaturi od 50 °C i vremenu od 4,5 h su vrlo slične.

Također, uspoređujući rezultate ovisno o vremenu hidrolize na temperaturi od 50 °C, može se uočiti mali porast antioksidacijske aktivnosti uzoraka koji su podvrgnuti hidrolizi 8 h.

Iz tablice 3 uočavaju se podjednake vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka pri koncentraciji enzima od 3000 HUT i temperaturi od 60 °C nakon 4,5 h hidrolize.

Nakon hidrolize provedene na 60 °C s koncentracijom enzima od 1000 HUT, ukoliko se kao varijabla proučava vrijeme, može se uočiti da su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti veće nakon provedene osmosatne hidrolize.

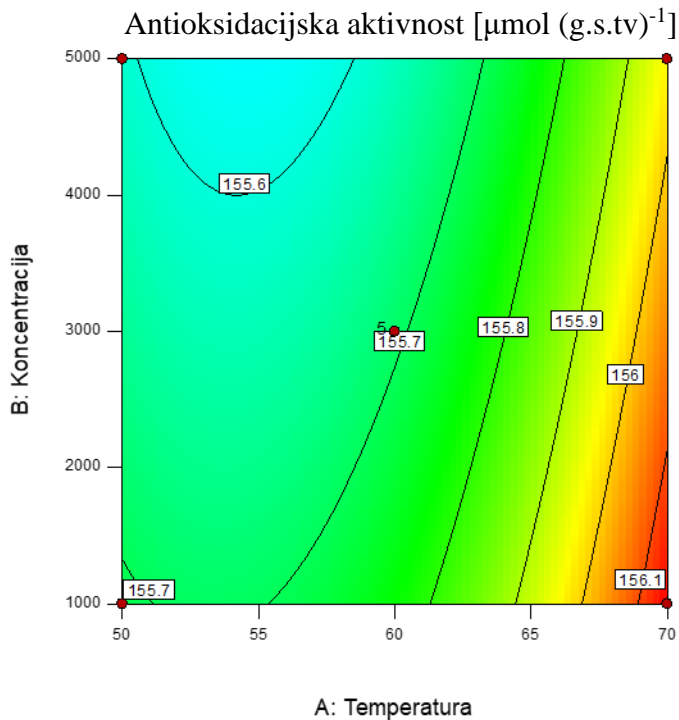
Nakon provedene hidrolize u trajanju od 4,5 h, na temperaturi od 70 °C uočava se minimalna razlika vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ovisne o koncentraciji enzima.

U radu Karamać i sur. (2014) proteini iz lanene pogače bili su izolirani pa hidrolizirani uz pomoć pankreatina, na temperaturi od 50 °C te je nakon hidrolize određivana antioksidacijska aktivnost FRAP metodom, te su rezultati pokazali da su najveću antioksidacijsku aktivnost pokazali uzorci sa 5-20 % SH, a uzorci sa više i manje % SH su pokazali manju antioksidacijsku aktivnost.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
FRAP [$\mu\text{mol g s.tv.}^{-1}$]
● Design Points
156.151
155.381

X1 = A: Temperatura
X2 = B: Koncentracija

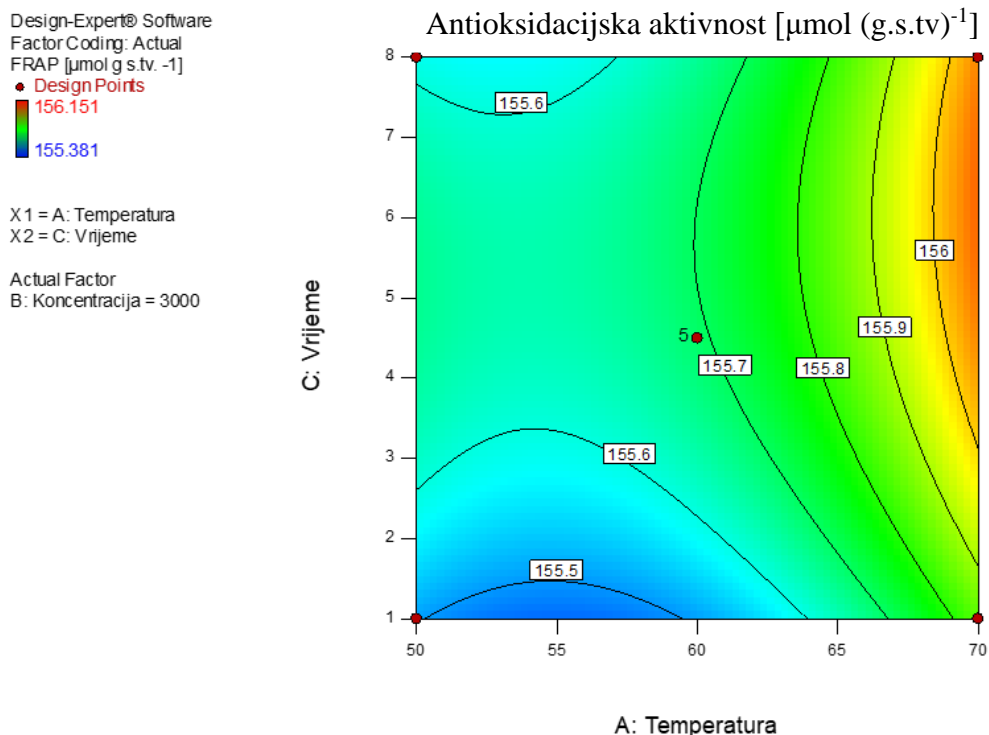
Actual Factor
C: Vrijeme = 4.5



Slika 7. Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti, u ovisnosti o koncentraciji enzima i temperaturi hidrolize

Optimalni uvjeti na grafu na slici 7 prikazani su crvenim obojenjem, zbog čega se može zaključiti da upravo pri najvišim temperaturama i najmanjoj koncentraciji enzima su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti najveće (optimalno vrijeme 4,5 h).

Na slici 8 je grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti, u ovisnosti o vremenu i temperaturi hidrolize (optimalna koncentracija enzima 3000 HUT), te se na njemu može uočiti slabije crveno obojenje, tj. donekle optimalni uvjeti hidrolize za najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, također pri višoj temperaturi, te porastu vremena.



Slika 8. Grafički prikaz vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u ovisnosti o vremenu i temperaturi hidrolize

ANOVA statističkom obradom dobiveni su rezultati iz kojih se može zaključiti da značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ima temperatura hidrolize, tj. što je veća temperatura, to je veća i antioksidacijska aktivnost ($p=0,002$). Koncentracija i vrijeme nisu pokazali značajan utjecaj na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ($p>0,05$).

U radu Silva i sur. (2013), ispitivan je antioksidacijski kapacitet hidrolizata lana, te kakav utjecaj na hidrolizate lana ima *in vitro* probava.

Rezultati su pokazali da je SH hidrolizata varirao do 12,7 do 19,3 %, a da su FRAP metodom dobivene najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kod vrijednosti SH od 13,6 do 14,7 %, što je sredina navedenog raspona SH. Ovi rezultati su u skladu sa drugim istraživanjima, koji sugeriraju da postoji optimalni raspon SH vrijednosti hidrolizata u kojem se dobivaju najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (Tang i sur., 2009).

Uspoređujući rezultate drugih radova, može se uočiti razlike u dobivenim rezultatima.

U ovome radu je određeno da se povećanjem temperature hidrolize povećava antioksidacijska aktivnost hidrolizata, ali da stupanj hidrolize raste do određene vrijednosti te do najviše temperature opada, što bi u konačnici značilo da se vrijednosti SH ne mogu povezati sa vrijednostima antioksidacijske aktivnosti dok se u drugim radovima to može jer porastom SH

raste antioksidacijska aktivnost samo do određene granice te daljnjim porastom SH, antioksidacijska aktivnost opada.

4.4. ODREĐIVANJE PROBAVLJIVOSTI

Hidrolizatima proteina dobivenih iz pogača uljarica određivane je probavljivost. Nakon provedene hidrolize i dobivanja hidrolizata proteina, uzorci su liofilizirani te se ispitivala probavljivost *in vitro* metodom probave proteina koja opisuje model probave štakora. Ispitivanje probavljivosti provedeno prema metodi tvrtke Megazyme (K-PDCAAS 09/17). Standard koji je korišten je potpuno probavljivi kazein. Nakon pripreme uzoraka i cijelog postupka određivanja probavljivosti, sadržaj epruveta s uzorcima i standardom prebačen je u mikrokivete za spektrofotometrijsko mjerenje te je izmjerena apsorbancija pri 570 nm na UV/VIS spektrofotometru.

L-Glicin je korišten kao standard, a iz izmjerenih apsorbancija je napravljen dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji (baždarni dijagram). Koristeći jednadžbu pravca baždarnog dijagrama i jednadžbu [6] i [7] izračunata je koncentracija primarnih amina prisutnih u uzorku, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz rezultata koncentracije primarnih amina [mM g^{-1}] svih uzoraka nakon hidrolize 50, 60 i 70 °C, pri koncentraciji enzima od 1000, 3000 i 5000 HUT i vremenu hidrolize od 1, 4,5 i 8 h

Broj uzoraka	Temp. [°C] *	Konc. [HUT]	Vrijeme [h]	Konc. primarnih amina [mM g^{-1}]
1	60	5000	8	39,85
				39,75
2	60	3000	4,5	46,63
				46,85
3	60	3000	4,5	48,70
				47,62
4	60	3000	4,5	42,79
				42,07
5	60	5000	1	39,70
				40,0
6	60	1000	1	38,05
				37,83
7	60	3000	4,5	35,76
				35,14
8	60	3000	4,5	38,19
				38,45
9	60	1000	8	39,19
				40,03
10	50	1000	4,5	34,86
				34,94
11	50	5000	4,5	36,18
				35,12
12	50	3000	8	37,17
				37,91
13	50	3000	1	32,65
				33,09
14	70	5000	4,5	39,40
				38,20
15	70	1000	4,5	37,23
				36,13
16	70	3000	8	31,67
				31,93
17	70	3000	1	34,88
				35,90

*Statistički značajan utjecaj interakcija temperature na koncentraciju primarnih amina ($p \leq 0,05$)

Vrijednosti koncentracije primarnih amina iz tablice 4 prate porast vrijednosti SH (tablica 2). Dakle, vrijednosti rastu u rasponu od 50 do 60 °C, gdje dostižu maksimum, a zatim se vrijednosti smanjuju kako temperatura dalje raste na 70 °C.

Također, ukoliko se proučava kako vrijeme hidrolize utječe na vrijednosti koncentracije primarnih amina, može se uočiti da je najveća vrijednost upravo na 4,5 h, te da se nakon jednosatne i osmosatne hidrolize te vrijednosti smanjuju.

Ukoliko se analiziraju uzorci nakon hidrolize na 50 °C, uočljivo je da su hidrolizati proteina lanene pogače na uzorcima koji su tretirani s koncentracijom enzima od 5000 HUT pokazali veću koncentraciju primarnih amina, tj. veću probavljivost.

Također, ukoliko se uspoređuju rezultati ovisnosti koncentracije primarnih amina o vremenu, uočljiva je veliko povećanje koncentracije primarnih amina nakon 8 h hidrolize.

Nakon provedene hidrolize na 60 °C uzorci pokazuju najveće vrijednosti uspoređujući sa vrijednostima nakon provedene hidrolize na 50 °C i 70 °C.

Također, hidrolizati pripremljeni uz koncentraciju enzima od 1000 HUT su nakon 8 h hidrolize pokazali veću vrijednost koncentracije primarnih amina nego nakon 1 h hidrolize, dok su hidrolizati pripremljeni uz koncentraciju enzima od 5000 HUT nakon 8 h pokazali malo manju vrijednost nego nakon 1 h hidrolize.

Uspoređujući međusobno vrijednosti dobivene nakon korištenja različitih koncentracija enzima, veće vrijednosti pokazuju hidrolizati pripremljeni sa koncentracijom enzima od 5000 HUT.

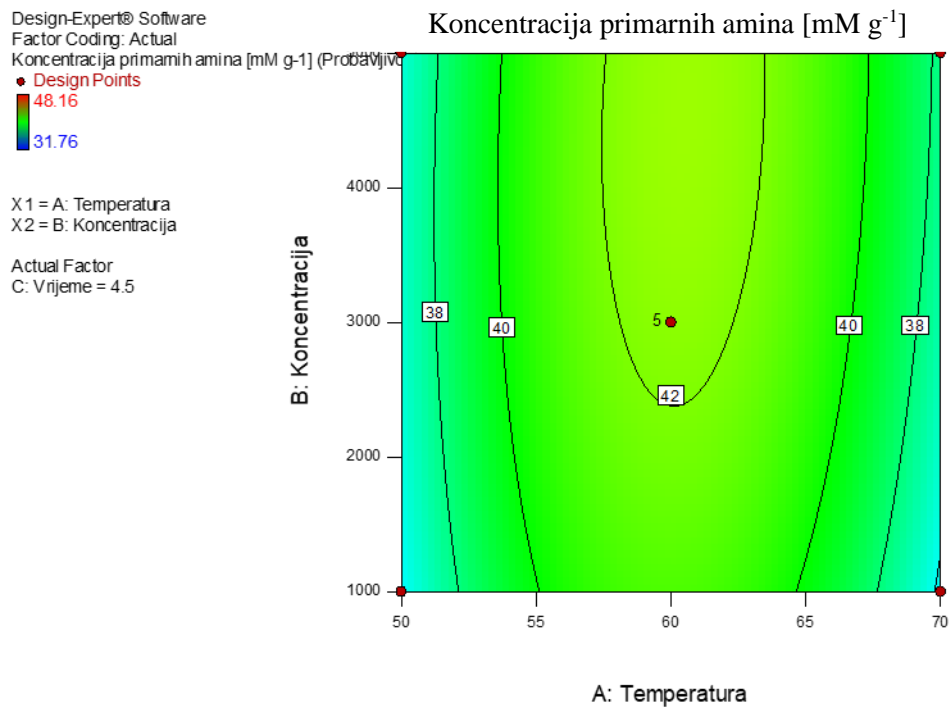
Koncentracija primarnih amina kod hidroliziranih uzoraka je najveća pri hidrolizi na 60 °C, nakon 4,5 h uz koncentraciju enzima od 3000 HUT.

Nakon provedene hidrolize na 70 °C, 4,5 h, veće vrijednosti koncentracije primarnih amina pokazuju hidrolizati pripremljeni sa koncentracijom enzima od 5000 HUT nego oni pripremljeni sa koncentracijom enzima od 1000 HUT.

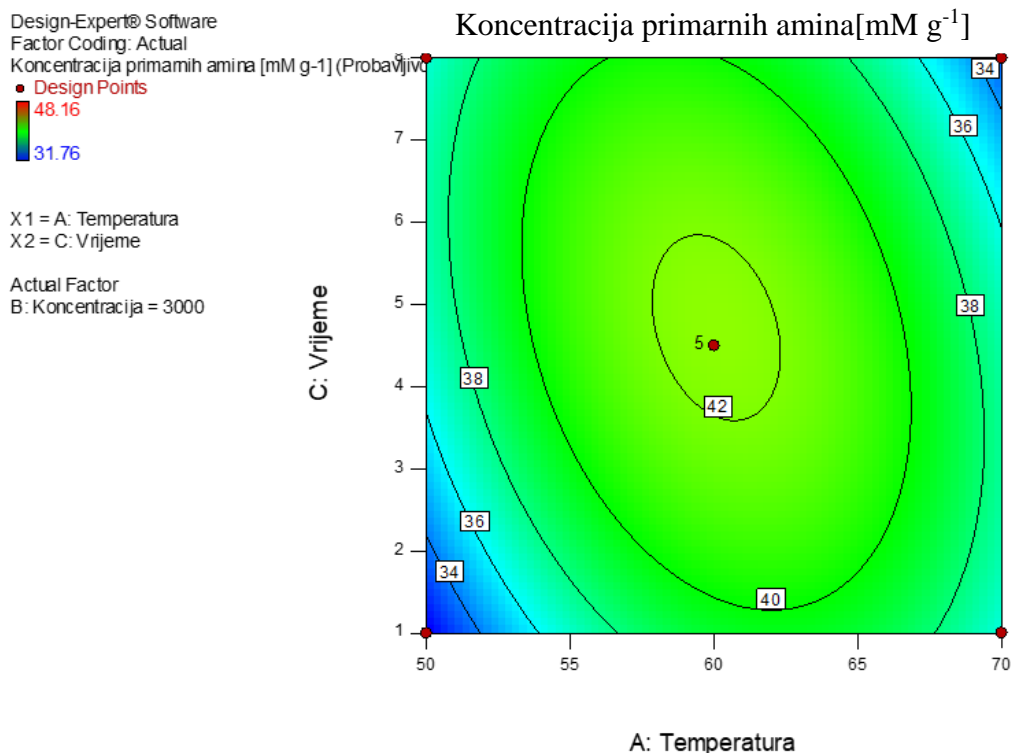
Također, uspoređujući rezultate dobivene nakon hidrolize sa koncentracijom enzima od 3000 HUT, može se uočiti da su veće vrijednosti kod 1000 i 5000 HUT.

Ukoliko se uspoređuje vrijeme utrošeno za hidrolizu, najveće vrijednosti su dobivene nakon 4,5 h, zatim 1 h pa u konačnici 8 h.

Na slikama 9 i 10 prikazani su rezultati dobiveni nakon određivanja probavljivosti, tj. koncentracija primarnih amina u odnosu na koncentraciju enzima i temperaturu hidrolize, pri optimalnom vremenu hidrolize od 4,5 h (slika 9), te koncentracija primarnih amina u odnosu na vrijeme i temperaturu hidrolize, pri optimalnoj koncentraciji enzima od 3000 HUT (slika 10).



Slika 9. Grafički prikaz koncentracije primarnih amina u ovisnosti o koncentraciji i temperaturi hidrolize



Slika 10. Grafički prikaz koncentracije primarnih amina u ovisnosti o vremenu i temperaturi hidrolize

Nakon provedene metode za određivanje probavljivosti, ANOVA statistička analiza nije pokazala ikakav značajan utjecaj vremena, koncentracije enzima ili temperature na koncentraciju primarnih amina ($p > 0,005$). Jedino je A^2 (utjecaj interakcija temperature) imao značajan utjecaj, $p = 0,003$. Iz slike 10. može se uočiti da su donekle pogodeni optimalni uvjeti, a to su 60 °C, koncentracija enzima 3000 HUT i vrijeme hidrolize od 4,5 h, ali potrebno je provesti daljnja istraživanja u svrhu optimizacije procesa hidrolize pogače lana.

U radu Silva i sur. (2013) istraživao se utjecaj *in vitro* probavljivosti na hidrolizatima lanene pogače kao i njihova antioksidacijska aktivnost. Rezultati *in vitro* probavljivosti ukazuju na to da su antioksidacijski spojevi lanenog sjemena ostali stabilni pod simuliranom probavom, vjerojatno zbog zaštite koju stvara matrica hrane. Također, hidrolizati su pokazali porast antioksidacijske aktivnosti nakon provedene *in vitro* probavljivosti ($p < 0,05$). Ovi rezultati sugeriraju da su sastavni dijelovi hidrolizata koji su odgovorni za antioksidacijsku aktivnost su već bili dostupni i stabilni tokom stvorenih uvjeta probave.

Marambe i sur., (2008) u svom radu proveli su istraživanje u kojem su uspoređivali probavu lanenog proteina za cijelo sjeme i za lanenu pogaču nakon uklanjanja sluzi. *In vitro*

probavljivost proteina usporila je prisutnost sluzi, ali otkrili su da bi tretmani, koji bi inaktivirali inhibitore proteaze ili uklanjanjem sluzi ili oboje, povećali ukupnu probavu.

U radu Venuste i sur. (2013) rezultati istraživanja su pokazali da hidrolizati proteina dobivenim enzimskom hidrolizom pokazuju veću probavljivost od enzimski ne tretiranih. Mogući razlog tome je bolji pristup proteolitičkim enzimima prema labilnim peptidnim vezama u hidrolizatima.

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovoga rada bio je provesti enzimsku hidrolizu pogače lana te hidrolizatima ispitati stupanj hidrolize, antioksidacijsku aktivnost FRAP metodom te odrediti *in vitro* probavljivost.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Proces hidrolize je promijenio kemijski sastav i funkcionalna svojstva pogača lana
2. Statističkom obradom nije pokazan značajan utjecaj temperature hidrolize, koncentracije enzima i vremena na stupanj hidrolize ($p=0,137$).
3. Značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ima temperatura hidrolize, tj. što je veća temperatura, to je veća i antioksidacijska aktivnost ($p=0,002$). Koncentracija i vrijeme nisu pokazali značajan utjecaj na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ($p>0,05$).
4. ANOVA statistička analiza nije pokazala značajan utjecaj vremena, koncentracije enzima ili temperature na koncentraciju primarnih amina ($p>0,005$). Jedino je A^2 (utjecaj interakcija temperature) imao značajan utjecaj, $p=0,003$.
5. Za definiranje optimalnih uvjeta hidrolize pogače lana potrebno je provesti daljnja istraživanja.

6. LITERATURA

Anonymus 1 <<https://www.feedipedia.org/node/735>> . Pristupljeno 1. lipnja 2021.

Anonymus 2 <<http://grains-ffood.pbf.hr/>> . Pristupljeno 1. lipnja 2021.

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

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

Bernacchia, R., Preti, R., Vinci, G. (2014) Chemical Composition and Health Benefits of Flaxseed. *Austin J. Nut. Food Sci.* **2** (8), 2381-8980, <https://www.austinpublishinggroup.com/nutrition-food-sciences/fulltext/ajnfs-v2-id1045.php> . Pristupljeno 2. lipnja 2021.

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

Chalamaiah, M., Yu, W., Wu., J. (2018) Immunomodulatory and anticancer protein hydrolyzates (peptides) from food preteins: A review. *Food Chem.* **245**, 205-222.

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

de Castro, R. J., & Sato, H. H. (2014) Protease from *Aspergillus oryzae*: Biochemical Characterization and Application as a Potential Biocatalyst for Production of Protein Hydrolysates with Antioxidant Activities. *J. Food Process.* 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/372352>

Elsorady, M.E. (2020) Characterization and functional properties of proteins isolated from flaxseed cake and sesame cake. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **12** (1), 77-83

- Franěk, F., Hohenwarter, O., Katinger, H. (2000) Plant protein hydrolysates: Preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotech. Progress.* **16**, 688-692.
- Garcia, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., Marina, M. L. (2013) Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant and other less occurrence bioactivities. *Talanta* **106**, 328-349.
- 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, M. (2019) Utjecaj kriomljevenja na udio prehrambenih vlakana, masnih kiselina i ciklinopeptida pogače lana. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (Referentna metoda).
- HRN ISO 1871: 2017, Poljoprivredni i prehrambeni proizvodi -- Opće upute za određivanje dušika Kjeldahlovom metodom
- Karamać, M., Kulczyk, A., Sulewska, K. (2014) Antioxidant Activity of Hydrolysates Prepared from Flaxseed Cake Proteins Using Pancreatin. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **64** (4), 227–234
- Kasote, D.M. (2013) Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *Int. Food Res. J.* **20**, 27-34.
- Kaur, B. i Srivastav, P.P. (2018) Effect of cryogenic grinding on chemical and morphological characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) peel powder. *J. Food Process. Pres.* **42**, e13583.
- Kuraica, I. (2019) Utjecaj kriomljevenja na sastav fenola, sterola i antioksidacijsku aktivnost pogače lana. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet
- Lovrić, T. (2011) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenih inženjerstva, 212-215
- Marambe, P.W.M.L.H.K., Shand, P.J., Wanasundara, J.P.D. (2008) An in-vitro investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 1155–1164.

Morris, D. (2007) Description and Composition of Flax. In: D. Morris, ed., Flax – A Health and Nutrition Primer, 4th ed. Flax Council of Canada, 9-21.

Moslavac, T., Benčić, Đ., Pašić, M. (2009) Utjecaj dodatka različitih biljnih ulja na oksidacijsku stabilnost smjese suncokretovog ulja. *Glasnik Zaštite Bilja*, **3** (6), 65-75.

Muir, A.D. (2006) Flax lignans – analytical methods and how they influence our understanding of biological activity. *J. AOAC Int.* **89**, 1147-1157.

Muzzio, C.R., Dini, G.D. (2011) Simulation of freezing step in vial lyophilization using finite element method, *Comp Chem Eng*, **35**, 2274-2283

Nwachukwu, I. D., Aluko, R. E. (2018) Antioxidant Properties of Flaxseed Protein Hydrolyzates: Influence of Hydrolytic Enzyme Concentration and Peptide Size. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **95**, 1105-1118.

Ogunronbi, O., Jooste, P.J., Abu, J.O., Van der Merwe, B. (2011) Chemical composition, storage stability and effect of cold-pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. *J. Food Process. Pres.* **35**, 64-79.

Oomah, B. D. i Mazza, G. (1993) Flaxseed proteins – a review. *Food Chem.* **48**, 109

Prior RL, Wu X, Schaich K. (2005) Standardised methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agri. Food Chem*, **53** (10), 4290-4302.

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

Retsch GmbH (2017) The Art of Milling, <<http://online.fliphtml5.com/uebb/ftup/#p=2>> Pristupljeno 3. lipnja 2021.

Seladi-Schulman, J. (2019) In Vivo vs. In Vitro: Definition, Examples, and More. *Healthline*. <https://www.healthline.com/health/in-vivo-vs-in-vitro> . Pristupljeno 3. lipnja 2021.

Shahidi F., Zhong Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *J. Func. Food.*, **18**, 757-781.

- Shim, Y., Gui, B., Arnison, P., Wang, Y., Reaney, M. (2014) Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **38** (1), 5-20.
- Silva, F.G.D., O'Callaghan, Y., O'Brien, N.M., Netto, F.M. (2013) Antioxidant capacity of flaxseed products: The effect of in vitro digestion. *Plant Foods Hum. Nutr.* **68** (1), 24–30.
- Singh, K., Mridula, D., Rehal, J., Barnwal, P. (2011) Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51** (3), 210-222.
- Siracusa L, Kulisic-Bilusic T, Politeo, O. (2011) Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model. *J Agric Food Chem*, **59**, 12453–12459
- Šeler, A. (2007) Određivanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta u liofiliziranim jagodama (*fragaria x ananassa* duch.). Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet
- Škevin, D. (2018) Kemija i tehnologija ulja i masti, Nastavni materijal, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb
- Tang, C-H., Peng, J., Zhen, D-W. (2009) Physiocochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esulentum* Moench) protein hydrolysed. *Food Chem.* **115**, 672-678
- Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. (2012) Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.* **71**, 11-24.
- Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2010) Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food Bioprod. Process.*, **88**, 277-282.
- Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C. F., Karangwa, E., Abbas, S., & Kamdem, P. E. (2013) Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. *Food & Function*, **4**(5), 811.

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.

Alina Mareva

Ime i prezime studenta