

# Izolacija bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda proizvodnje lanenog ulja

---

Ćapin, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2016

*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:159:352581>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*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, studeni 2016.

Marko Čapin 647/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH  
SPOJEVA IZ NUSPROIZVODA  
PROIZVODNJE LANENOG ULJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Škevin uz pomoć dr.sc. Marko Obranović, viši asistent. Diplomski rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta broj 9550-Zelena otapala za zelenu tehnologiju.

# 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

## IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ NUSPROIZVODA PROIZVODNJE LANENOG ULJA

*Marko Čapin 647/PI*

**Sažetak:** Pogaču lana odlikuju visoke koncentracije polifenolnih spojeva, prvenstveno lignana, te ona može poslužiti kao dobra sirovina za njihovu ekstrakciju. Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti bioaktivne spojeve iz pogače lana dobivene nakon hladnog prešanja koristeći standardne metode ekstrakcije te ispitati utjecaj mikrovalova i ultrazvuka na ekstraktibilnost bioaktivnih spojeva. Standardnom metodom iz pogače su izolirani i tekućinskom kromatografijom detektirani lignani: sekoizolarikirezinol ( $7,76 \text{ mg g}^{-1}$ ), pinorezinol ( $2,33 \text{ mg g}^{-1}$ ) i matarezinol ( $1,43 \text{ mg g}^{-1}$ ) te manja količina fenolnih kiselina: *p*-kumarinska ( $0,57 \text{ mg g}^{-1}$ ), ferulinska ( $0,34 \text{ mg g}^{-1}$ ) siriginska ( $0,06 \text{ mg g}^{-1}$ ) i sinapinska kiselina ( $0,04 \text{ mg g}^{-1}$ ). Primjenjene metode ultrazvučno-mikrovalno potpomognute ekstrakcije nisu dale zadovoljavajuće rezultate. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se metoda optimirala i jasnije utvrdili utjecaji ultrazvuka i mikrovalova na molekule lignana i fenolnih spojeva.

**Ključne riječi:** pogača lana, lignani, fenolne kiseline, ultrazvučno-mikrovalna ekstrakcija

**Rad sadrži:** 43 stranica, 13 slika, 10 tablica i 61 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Dubravke Škevin

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Marko Obranović, viši asistent

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Radojčić-Redovniković
2. izv. prof. dr. sc. Dubravke Škevin
3. doc. dr. sc. Klara Kraljić
4. izv. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjena)

**Datum obrane:** listopad 2016.

## 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

### ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM BYPRODUCTS OF FLAXSEED OIL PRODUCTION

*Marko Čapin 647/PI*

**Abstract:** Flaxseed cake is characterized by high concentrations of polyphenolic compounds, particularly lignans and it can serve as sources for their extraction. The aim of this study was to isolate and identify the bioactive compounds from flax cake obtained after cold pressing using standard extraction methods, and examine the effect of microwaves and ultrasound on the extractability of bioactive compounds. Using standard method for extraction following compounds were isolated and determined with HPLC: lignans - Secoisolariciresinol (7,76 mg g<sup>-1</sup>), pinoresinol (2,33 mg g<sup>-1</sup>) and matairesinol (1,43 mg g<sup>-1</sup>) and smaller amounts of phenolic acids - *p*-coumaric acid (0,57 mg g<sup>-1</sup>), ferulic (0,34 mg g<sup>-1</sup>) syringic (0,06 mg g<sup>-1</sup>) and sinapinic acid (0,04 mg g<sup>-1</sup>). Applied methods for ultrasound-microwave assisted extraction did not provide clear results. Further research is needed in order to optimize the methods and clearly identify the effects of ultrasound and microwaves on molecules of lignans and phenolic compounds.

**Keywords:** flaxseed cake, lignans, phenolic acids, ultrasound-microwave extraction

**Thesis contains:** 43 pages, 13 figures, 10 tables and 61 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. Dubravka Škevin, Associate professor

**Technical support and assistance:** PhD. Marko Obranović, senior assistant

**Reviewers:**

1. PhD. Dubravka Škevin, Associate professor
2. PhD. Klara Kraljić, Assistant professor
3. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Associate professor
4. PhD. Sandra Balbino, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** October 2016

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Lan i laneno ulje .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Proizvodnja ulja .....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Hladno prešanje .....	6
2.2.2. Rafinirano laneno ulje .....	6
<b>2.3. Pogača lana .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. Lignani .....</b>	<b>8</b>
2.4.1. Metabolizam lignana .....	9
2.4.2. Bakterije odgovorne za pretvorbu biljnih lignana u životinjske .....	10
2.4.3. Funkcijska aktivnost lignana .....	11
2.4.3.1. Utjecaj lignana na zdravlje.....	11
2.4.3.2. Antioksidacijska aktivnost .....	11
2.4.3.3. Estrogene i anti-estrogene funkcije.....	11
2.4.3.4. Metabolizam hormona i dostupnost .....	12
2.4.3.5. Utjecaj lignana na ekspresiju gena i/ ili aktivnost enzima .....	13
<b>2.5. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz pogače lana .....</b>	<b>13</b>
<b>2.6. Nove metode ekstrakcije .....</b>	<b>14</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>16</b>
3.1.1. Uzorci .....	16
3.1.2. Reagensi i standardi.....	16
<b>3.2. Metode rada .....</b>	<b>18</b>
3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u sjemenu i pogači .....	18
3.2.2. Određivanje udjela ulja u sjemenu i pogači.....	19
3.2.4. Iskorištenja procesa proizvodnje ulja .....	20
3.2.5. Referentna metoda ekstrakcije lignana .....	21
3.2.6. Ekstrakcija lignana i fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru/reaktoru.....	22
3.2.7. Određivanje sastava lignana pogače lana .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Kvaliteta sjemena i iskorištenje procesa proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. HPLC metode za određivanje koncentracije lignana u pogači lanu .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Ekstrakcija lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana referentnom metodom.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4. Ekstrakcija lignana pogače lana na ultrazvučnom-mikrovalnom ekstraktoru .....</b>	<b>34</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>37</b>

## 1. UVOD

Lan je jednogodišnja biljka iz obitelji *Linaceae* koja uključuje deset rodova i više od 150 vrsta. Tradicionalno se uzgaja za proizvodnju tekstilnih vlakana i sjemena. Biološka vrijednost sjemena iskazana je u kemijskom sastavu njegovog ulja, ali i u sastavu fenolnih spojeva, primarno lignana. Ovi spojevi pokazuju jaku antioksidacijsku i biološku aktivnosti zbog čega laneno sjeme pokazuje mnogobrojne povoljne učinke na ljudsko zdravlje.

Pogača lana je nusproizvod, odnosno kruti ostatak nakon prešanja koji se donedavno uglavnom smatrao otpadom i beskorisnim ostatkom. Danas se koristi u različite svrhe i privlači interes industrije i znanstvene zajednice. Koristi se kao obnovljivi izvor energije - ogrjev, kao stočna hrana te kao sirovinska osnova za izolaciju proteina, vlakana i ostalih bioaktivnih komponenti.

Zbog svoje hidrofilnosti fenolni spojevi su izrazito slabo topivi u ulju i zaostaju u pogači nakon prešanja ulja. Visoke koncentracije fenolnih spojeva čine pogaču lana dobrom sirovinom za njihovu ekstrakciju. Ekstrakcija fenolnih spojeva najčešće se provodi upotrebom organskih otapala, no u novije vrijeme ispituju se mogućnosti primjene inovativnih i efikasnijih metoda ekstrakcije kao brzih i ekološki prihvatljivijih postupaka.

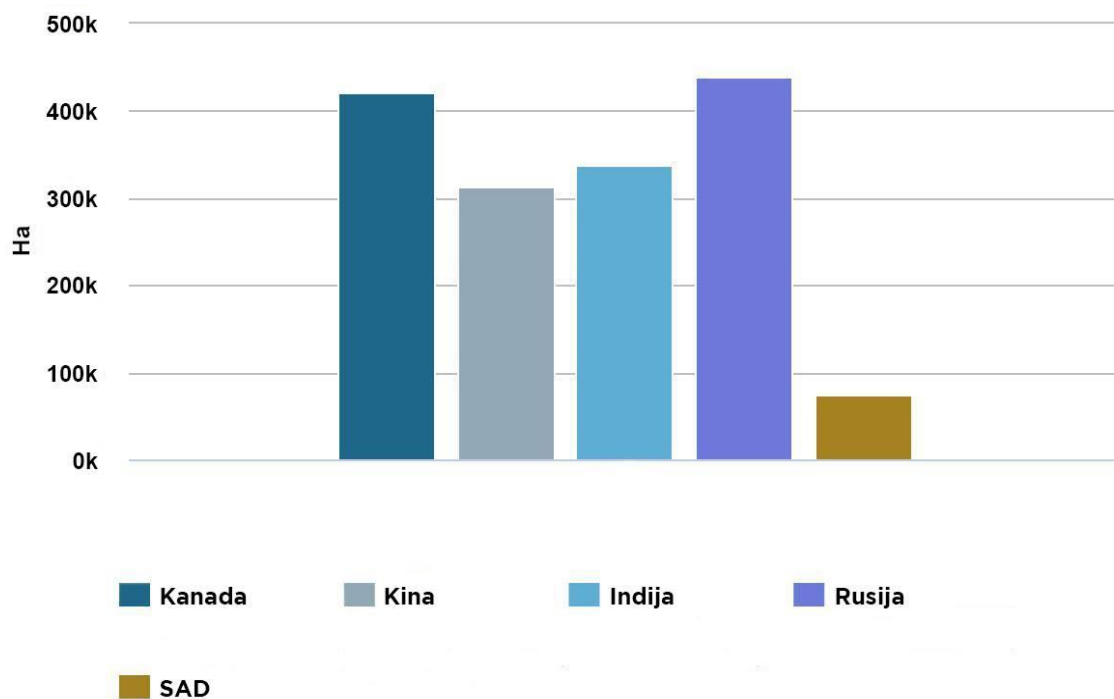
Cilj ovog istraživanja biti će odrediti udio lignana i ostalih fenolnih spojeva u laboratorijski proizvedenoj pogači lana, standardnom metodom za njihovu ekstrakciju i detekciju te ispitati utjecaj novih tehnologija ekstrakcije, mikrovalova i ultrazvuka te kombinacije tih dviju novih tehnologija, na izolaciju lignana iz pogače lane.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Lan i laneno ulje

Lan je jednogodišnja biljka iz obitelji *Linaceae* koja uključuje deset rodova i više od 150 vrsta. Raste do visine od 0,3 do 1 metra te se uzgaja za proizvodnju tekstilnih vlakana i ulja. Sorte lana koje se koriste za proizvodnju tekstilnih vlakana obično imaju dužu stabljiku, 80-120 cm visoku i manje sjeme. Sorte koje se koriste za dobivanje ulja imaju kraće i jako razgranate stabljike, 60-80 cm visoke i veći broj sjemenki. Istraživanja su pokazala da je za rast i razvoj lana najpogodnije plodno tlo fine teksture i ilovačka tla (pijesak, mulj i glina). Prije više od 60 godina, prosječna svjetska proizvodnja lana je bila oko 3,4 mil. tona, što je bilo više od suncokreta (2,5 mil. t) i nešto manje od uljane repice (3,8 mil. t). Od tada, svjetska proizvodnja lana vrarira između 2 i 3 mil. t dok je proizvodnja ostalih uljarica znatno porasla.



k = tisuće

**Slika 1.** Glavni svjetski proizvođači lana u svijetu 2013. godine

Kanada je jedna od najvećih proizvođača i izvoznika lana, gdje se minimalna količina sjemena koristi za proizvodnju lanenog ulja (Slika 1). U prosjeku, Kanada proizvodi iznad 800 000 t lana godišnje (Przybylski, 2005).

Nutritivne komponente sjemena lana su ulje, proteini (oko 20%), lignani, topiva vlakna (oko 30%), minerali i vitamini, a sjeme lana sadrži oko 40% ulja (od toga oko 73% polinezasićenih masnih kiselina, te je jedan od najbogatijih prehrambenih izvora esencijalne  $\alpha$ -linolenske masne kiseline) (Zhang i sur., 2008; Sharav i sur., 2013).



**Slika 2.** Lan (*Linum usitatissimum* L.) (Anonymous 1, 2016)

**Tablica 1.** Fizikalno-kemijska svojstva lanenog ulja (Przybylski, 2005)

Svojstvo	Laneno ulje
Relativna gustoća (20°C/voda pri 4°C)	0,925-0,935
Indeks loma ( $n_D^{20}$ °C)	1,475-1,475
Točka topljenja (°C)	-20 do -24
Točka isparavanja (°C)	120-135
Jodni broj	182-203
Neosapunjiva tvar (%)	0,1-1,7
Osapunjivi dio (mg KOH g <sup>-1</sup> )	187-195
Fosfor (mg kg <sup>-1</sup> )	1,0-30
Klorofil (ppm)	0,0-1,5
SMK (% oleinske)	0,1-2,0
Trigliceridi (%)	94-98

Glavne komponente biljnih ulja, uključujući i laneno ulje, su trigliceridi koji čine više od 90% svih komponenti. Sastav masnih kiselina kod lanenog ulja se razlikuje od komercijalnih ulja zbog vrlo visokog udjela  $\alpha$ -linolenske masne kiseline (ALA), najčešće iznad 50%. Zbog vrlo visokog udjela ALA lanene sjemenke i laneno ulje se često koriste kao dodatak prehrani gdje je potrebno obogaćivanje s esencijalnim omega-3 masnim kiselinama. Udio linolenske kiseline u lanenom ulju varira zbog raznih čimbenika pa tako lan uzgojen u Kanadi sadrži 5% palmitinske kiseline (16:0), 3% stearinske kiseline (18:0), 17% oleinske kiseline (18:1), 15% linoleinske kiseline (18:2) i 59% linolenske kiseline (18:3) dok slična sorta lana uzgojena u Sjevernoj Dakoti sadrži 5-6% palmitinske kiseline (16:0), 3-6% stearinske kiseline (18:0), 19-29% oleinske kiseline (18:1), 14-16% linoleinske kiseline (18:2) te 45-52% linolenske kiseline (18:3). Niže temperature tijekom 10-25 dana nakon cvatnje su glavni uzrok višeg udjela linolenske kiseline u lanenom ulju.

U usporedbi s ostalima, laneno ulje sadrži niži udjel zasićenih masnih kiselina, i nešto manju koncentraciju tokoferola (upola manju nego u suncokretovom i repičinom ulju, i za trećinu manje nego u sojinom ulju). Dominantan tokoferol u lanenom ulju je  $\gamma$ -tokoferol (oko 80%), a kao jedinstveni antioksidans (učinkovitiji od ostalih izomera tokoferola) se pokazao plastokromanol-8, derivat  $\gamma$ -tokoferola sa dvostruko dužim bočnim lancem.

Steroli su prisutni u lanenom ulju ali u mnogo manjim koncentracijama nego u ostalim biljnim uljima. Tako npr. u lanenom ulju ukupna koncentracija sterola iznosi  $2,3 \text{ mg g}^{-1}$  dok u biljnim uljima (suncokret, soja, repica) koncentracija je  $4,1-6,9 \text{ mg g}^{-1}$ . Sastav sterola je sličan kao i kod drugih ulja što znači da je  $\beta$ -sitosterol najzastupljeniji a zatim kampesterol i  $\Delta^5$ -avenasterol (Przybylski, 2005).

**Tablica 2.** Sastav lanenog ulja (Przybylski, 2005)

<b>Komponenta</b>	<b>Laneno ulje</b>
<b>Masne kiseline (% od ukupnih)</b>	
C16:0	5,3
C18:0	3,3
C18:1	17,9
C18:2	14,7
C18:3	58,7
SFA	9,0
MUFA	18,1
PUFA	72,9
<b>Tokoferoli (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	
α-	20
γ-	200
Δ-	7
Plastokromanol-8	120
Ukupno	347
<b>Steroli (% od ukupnih)</b>	
Brasikasterol	1
Kampesterol	27
Stigmasterol	8
β-Sitosterol	50
Δ <sup>5</sup> -Avenasterol	10
<b>Ukupni steroli (g kg<sup>-1</sup>)</b>	2,3

**Kratice:** Masne kiseline: SFA-zasićene; MUFA-mononezasićene; PUFA-polinezasićene

## **2.2. Proizvodnja ulja**

### **2.2.1. Hladno prešanje**

Lan sadrži visoku količinu ulja te je nekada potrebno prešati dva puta kako bi izdvojili većinu ulja iz smjenke. Prije samog mljevenja sjemenke je potrebno dovesti na optimalnu vlažnost od 9,5% do 10%, na taj način ćemo smanjiti veličinu nastalih čestica tijekom mljevenja te dobiti najveću moguću količinu ulja. Sjemenke s optimalnom vlažnosti potom se melju kako bi se razbila njihova struktura te omogućilo bolje izdvajanje ulja. Laneno ulje koje se koristi za ljudsku prehranu je hladno prešano te nikakvi dodaci nisu dozvoljeni u njemu. Prema industrijskim standardima hladno prešanje se provodi kada temperatura proizvodnog procesa ne prelazi 50° C (Codex Alimentarius, 1999). U praksi se koriste i ekspeleri koji imaju sposobnost hlađenja djelova preše koji su u kontaktu sa sjemenkama i uljem tijekom procesa. Nakon toga ulje se filtrira i pakira u boce u struji dušika ili nekog drugog inertnog plina zbog toga što je laneno ulje jako osjetljivo na oksidaciju. Boce u koje se pakira su zatamnjene te na taj način štite ulje od svjetlosti, tj. procesa fotooksidacije (Przybylski, 2005).

### **2.2.2. Rafinirano laneno ulje**

Kao i kod hladnog prešanja, prvo se postigne optimalna vlaga sjemenki lana te se potom na nizu glatkih valjaka sjemenke usitnjavaju. Nakon toga usitnjene sjemenke se zagrijevaju na 80-100° C kako bi se inaktivirali enzimi i pospješio postupak odvajanja ulja tijekom prešanja. Sjeme se potom premješta u ekspeler gdje dolazi do odvajanja ulja nakon čega se filtrira i sprema u tank u kombinaciji sa uljem koje je dobiveno uz pomoć ekstrakcije određenim otapalom. Iz dobivene sačme se potom uklanja otapalo te se ona koristi uglavnom kao stočna hrana. Ovakvo dobiveno ulje se rafinira na isti način kao i sva biljna ulja. Degumiranje se primjenjuje kako bi se uklonili fosfolipidi, neutralizacijom se smanjuje udio slobodnih masnih kiselina. Bijeljenjem se uklanja klorofil i drugi pigmenti te eliminira ostatak pesticida, teških metala i drugih potencijalno toksičnih spojeva. Deodorizacija ulja se provodi kako bi se uklonili neugodni mirisi (Przybylski, 2005).

## **2.3. Pogača lana**

Lanena pogača je nusproizvod koji se dobiva hladnim prešanjem lanenih sjemenki. Pogača lana predstavlja jeftinu sirovinu koja se uglavnom koristi kao stočna hrana. Osim kao stočna hrana pogača lana ima veliki potencijal da se koristi i u prehrani ljudi (energetske pločice, vafli, palačinke, žitarice za doručak)

Laneno sjeme pa tako i lanena pogača su najveći izvor lignana. Osim lignana lan je važan izvor fenolnih kiselina. Važnost lignana i fenolnih kiselina se očituje u njihovoj biološkoj aktivnosti kao što su npr. antioksidacijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje.

Za usporedbu, drugi najveći izvor lignana je sezam gdje koncentracija lignana u ulju i sjemenu varira od  $1,6 \text{ mg g}^{-1}$  do  $9,9 \text{ mg g}^{-1}$  ovisno o vrsti sjemena i načinu ekstrakcije. Također, lignani u sezamu se razlikuju od lignana u lanu. Pa tako u sezamu imamo sezamin, sezamol, sezamolin te sezaminol diglukozid dok u lanu prevladaju sekoizolarikirezinol-diglukoizid i sekoizolarikirezinol (Kanu 2010).

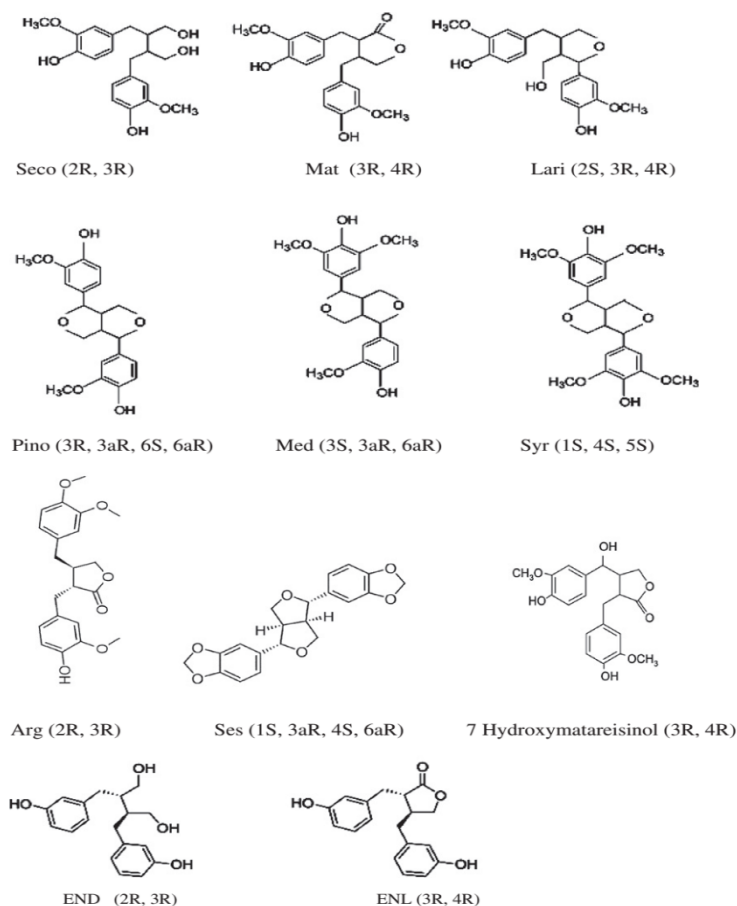
Lanena pogača, osim lignana i fenolnih kiselina, je bitan izvor minerala i masnih kiselina. Najzastupljeni minerali u pogači lana su kalcij, mangan, fosfor i kalij te se koncentracija kalcija kreće od  $3,3\text{-}3,8 \text{ mg g}^{-1}$ , mangana od  $4,8\text{-}5,9 \text{ mg g}^{-1}$ , fosfora od  $6,4\text{-}8,2 \text{ mg g}^{-1}$  te kalija od  $9,0\text{-}10,1 \text{ mg g}^{-1}$ . Što se tiče masnih kiselina, najzastupljenija je linolenska sa udjelom od  $58,5\text{-}59,7\%$  a slijede je linolna sa  $15,8\text{-}16,9\%$  i oleinska sa  $15,0\text{-}15,6\%$  (Ogunronbi, 2011).

Osim za ekstrakciju lignana, minerala i masnih kiselina, iz pogače lana se mogu izolirati proteini i polisaharidi. Odmašćena pogača se centrifugira te se iz tekućeg dijela dobivaju proteini, a iz krutog polisaharidi. Udio proteina iznosi  $27,3\%$ , a polisaharida  $10,7\%$  (Gutierrez, 2010).

Cijela biljka lana pa tako i pogača lana bi se mogla koristiti kao obnovljivi izvor tekstilnih vlakana, jestivog ulja i antioksidanasa. Na taj način bi se uspješno zamjenili sintetski aditivi koji se koriste u hrani i kozmetici (Pag, 2013).

## 2.4. Lignani

Lan je najbogatiji prirodni izvor lignana te sadrži 75-800 puta više lignana nego druge biljke. Lignani su spojevi sa dibenzilbutanskim kosturom te imaju sličan učinak kao i fitoestrogeni. Najzastupljeniji lignan u lanu je sekoisolarikirezinol diglukozid (SDG) koji se često uspoređuje s sekoisolarikirezinolom (SECO). Do usporedbe ova dva lignana dolazi zbog toga što SDG ima dvije vezane glukoze, a kada se te glukoze uklone hidrolizom dobivamo SECO. SDG se pojavljuje u 2 izomerna oblika u lanu. Od ostalih lignana u lanu se nalaze još matairezinol (MATA), izolarikirezinol (Iso), larikirezinol (LARI), dimetoskiosolarikiresinol te pinorezinol (PINO). Sadržaj lignana u lanu se razlikuje u ovisnosti o sortama, o mjestu uzgoja i klimatskim uvjetima uzgoja (Johnsson, 2004). Ostali značajni izvori lignana su bezalkoholna pića (čaj), voće, povrće i žitarice (Thompson i sur., 2006).



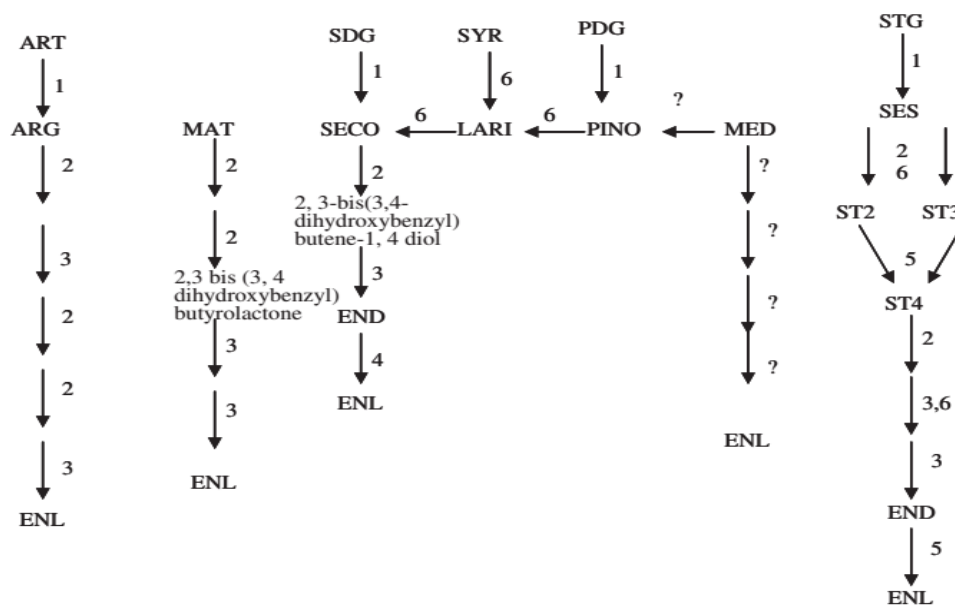
**Slika 3.** Strukturne formule biljnih lignana: sekoisolarikirezinol(SECO), matairezinol (MATA), larikirezinol (LARI), pinorezinol (PINO), mediorezinol (MED), siringarezinol (Syr), artigenin (ARG), sezamin (SES), enterodiol (END), enterolakton (ENL) (Landete, 2012)

#### 2.4.1. Metabolizam lignana

U ranim 1980-ima enterodiol (END) i enterolakton (ENL) su identificirani kao lignani životinjskog podrijetla te se oni razlikuju od lignana biljnog podrijetla zbog fenolne hidroksilne skupine na meta položaju aromatičnog prstena. Nastaju u ljudskom tijelu u gastrointestinalnom traktu gdje dolazi do hidrolize šećera sa SDG-a djelovanjem gastrointestinalnih bakterija. (Ford i sur., 2001). Nakon toga slijedi dehidroksilacija i demetilacija čime se dobije životinjski lignan END. Smatra se da END prolazi kroz proces oksidacije kako bi se dobio ENL. Tijekom fekalne inkubacije matarezinola kao glavni produkt se pokazao enterolakton (62% MATA se pretvara u ENL). Također, tijekom inkubacije SECO dolazi do njegove pretvorbe u END i ENL (72%). (Heinonen i sur., 2001). Pretvorba PINO u END i ENL se pokazala gotovo učinkovitom kao i SECO i MATA. Tijekom inkubacije kod PINO i LARI osim END-a i ENL-a pronađen je i metabolit enterofuran. Izolarikirezinol ostaje nepromijenjen tijekom inkubacije.

Do sada su različite studije analizirale unos biljnih lignana kod ljudi te koliko ih se kao takvih metabolizira u probavnom sustavu u životinjske lignane. Nažalost istraživanja nisu potpuno rasvijetlila taj problem, ali se zna ako se kroz šest tjedana konzumira hrana bogata biljnim lignanima (sjemenke lana) doći će do povećanja koncentracije END-a i ENL-a za oko 1000-10000 puta. (Atkinson i sur., 1993). Brojne studije su dokazale da povećanjem unosa hrane bogate lignanima možemo smanjiti rizik od raka dojke, raka debelog crijeva, raka prostate te gubitka kose (Kuijsten i sur., 2006).





**Slika 4.** Metabolizam biljnih lignana pinoresinol diglukozida(PDG), larikiresinola(LARI), sekoisolarikirezinol diglukozida(SDG), matairesinola(MAT), siringaresinola(SYR), sezamin triglukozida(STG) i arctina(ART) do enterodiola(END) i enterolaktona(ENL) (Landete, 2012)

#### 2.4.2. Bakterije odgovorne za pretvorbu biljnih lignana u životinjske

Istraživanja provedena na ovom području ukazuju na to da su za pretvorbu biljnih lignana u životinjske odgovorne crijevne bakterije. One su odgovorne za reakcije deglikozidacije, demetilacije, dehidroksilacije i dehidrogenacije pri pretvorbi biljnih lignana u ENL. Također, one su odgovorne i za transformaciju jednog biljnog lignana u drugi biljni lignan pa se tako PINO i LARI transformiraju u SECO djelovanjem *E. Lenta* (Clavel i sur., 2006) te PINO u LARI djelovanjem *Enterococcus faecalis* soja PDG-1 (Xie i sur., 2003).

Sojevi *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides Ovatus* i *Clostridium cocleatum* te *Clostridium sp.* SDG-Mt85-3Db su uključeni u deglikozilaciju SDG-a u SECO. No novija istraživanja su pokazala kako *Bifidobacterium pseudocatenulatum* WC 401 ima najveći značaj kod pretvorbe SDG-a u SECO (Roncaglia i sur., 2011).

Za demetilaciju SECO su odgovorne *Butyribacterium methylotrophicum*, *Eubacterium callanderi*, *Eubacterium limosum*, *Ruminococcus productus* i *Peptostreptococcus productus*.

*Clostridium scindens* i *E. Lenta* su odgovorne za dehidroksilaciju SECO-a dok je *E. Lenta* SDG-2 odgovorna za fenolnu *p*-dehidroksilaciju SDG-a do END i ENL (Clavel i sur., 2006). Najviše istraživanja se provelo na SECO koji je najzastupljeniji lignan te lan sadrži većinom njega.

### 2.4.3. Funkcijska aktivnost lignana

#### 2.4.3.1. Utjecaj lignana na zdravlje

Provedena su brojna istraživanja na temu utjecaja lignana na zdravlje. Lignani imaju povoljan učinak na kardiovaskularne bolesti, simptome menopauze, rak dojke, rak prostate, rak crijeva te imaju hepatoprotektivno djelovanje (Landete, 2012).

#### 2.4.3.2. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidativno djelovanje je odgovorno za bioaktivnost biljnih i životinjskih lignana. Ono se može očitovati na primjeru raka i lupus nefritisa gdje SDG ima antioksidacijsko djelovanje te je on sposoban ukloniti hidroksilne radikale (Prasad, 1997). U jednom od istraživanja proučavala se antioksidacijska aktivnost SDG, SECO, END, ENL i vitamina E. Najbolju antioksidacijsku aktivnost pokazuje SECO i END, a najnižu vitamin E. SDG, END i ENL djeluju kao antioksidansi protiv oštećenja DNA i lipidne peroksidacije. Također, SDG, SECO, END i ENL doprinose smanjenju hiperglikemije, ateroskleroze i hiperkolesterolemije (Hu i sur., 2007).

#### 2.4.3.3. Estrogene i anti-estrogene funkcije

Biljni i životinjski lignani se ponašaju kao estrogenski agonisti ili antagonisti. Kemijska struktura lignana je slična onoj 17- $\beta$ -estradiola te oni mogu imati agonistički i antagonistički učinak „in vitro“ (Sathyamoorthy i sur., 1994) i „in vivo“ (Damdimopoulou i sur., 2011). Istraživanja pokazuju da se pri fiziološki relevantnim koncentracijama ENL-a dolazi do aktivacije estrogenskih receptora (ER). Na taj način se može djelovati u prevenciji

raka i hormonskih terapija (Hebert-Croteau, 1998). Zbog svoje sličnosti s 17- $\beta$ -oestradiolom, životinjski lignani su prirodni ligandi ER i vjeruje se da su selektivni modulatori receptora za estrogen. Na taj način oni mogu djelovati antikancerogeno. Mehanizam djelovanja životinjskih lignana na ER je predmet istraživanja, ali postoje i dokazi iz ljudskih opservacijskih studija gdje fitoestrogen može modulirati razinu hormona i oblik ER (Low i sur., 2005; Touillaud i sur., 2005).

Pretpostavlja se da je biološko djelovanje fitoestrogena pod utjecajem ER  $\alpha$  i  $\beta$ . Estrogenski receptor je ligand ovisni transkripcijski faktor. ER posjeduje dvije aktivne transkripcijske domene: samostalna transkripcijska domena AF-1 koja se nalazi na N- kraju i AF-2 koja se nalazi na C- kraju (Green i Chambon, 1998). Primarni slijed AF-2 domene značajno razlikuje ER  $\alpha$  i  $\beta$  te to uzrokuje različite antagonističke i agonističke karakteristike za razne kemikalije koje sadrže fitoestrogen (Barkhem i sur., 1998).

U jednom istraživanju su se ispitivale sposobnosti END, ENL i 17- $\beta$ -oestradiol da se potakne transaktivacija ER  $\alpha$  i ER  $\beta$  kako bi se modulirali ER  $\alpha$  geni. Studija je pokazala da END i 17- $\beta$ -oestradiol izazivaju ER  $\alpha$  transkripciju putem AF-1 i AF-2 dok ENL ne uključuje AF-1 nego uglavnom djeluje preko AF-2 (Carreau i sur., 2008).

#### 2.4.3.4. Metabolizam hormona i dostupnost

Životinjski lignani i njihovi biljni prekursori utječu na hormonalni status normalnog tkiva i tumora. Zapažene su promjene u menstrualnom ciklusu i razini spolnih hormona prilikom konzumiranja hrane bogate lignanima (lan) što ukazuje na odnos između lignana i hormonske biorasploživosti (Brooks i sur., 2004). U jednom od istraživanja se proučavao učinak unosa lana na razinu endogenog hormona i veznih proteina kod žena u postmenopauzi. Konzumacijom lana došlo je do značajnog smanjenja 17- $\beta$ -oestradiola u serumu i povećanja prolaktina (Hutchins i sur., 2001).

Visoka koncentracija lana inhibira aromatazu perifernih i/ ili stanica raka te smanjuje razinu estrogena (Adlercreutz i sur., 1993).

#### 2.4.3.5. Utjecaj lignana na ekspresiju gena i/ ili aktivnost enzima

Životinjski lignani mogu modulirati proteine ER i stoga utječu na hormonalni status. Također mogu mijenjati genetski prikaz i aktivnost enzima koji su uključeni u aktivnost zdravih tkiva i tumora. SDG je učinkovit u odgađanju/suzbijanju dijabetesa tip 1 i tip 2 (Prasad, 2002). Potencijalni mehanizam antikancerogenog djelovanja uključuje indukciju detoksikacije faze II enzimima kao što su NADPH, kinon reduktaza. Potrebna su još brojna istraživanja kako bi se shvatio utjecaj lignana na gene i enzimsku aktivnost.

### 2.5. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz pogače lana

Ekstrakcija je prvi korak u izolaciji, identifikaciji i iskorištenju fenolnih tvari iz pogače lana. Postupak ekstrakcije predstavlja kritični korak pri izolaciji biološki aktivnih spojeva. Da bi se postigao maksimalni ekstrakcijski kapacitet potrebno je uzeti u obzir prirodu biljnog materijala, ali i prirodu samih spojeva. Lipofilnost ili hidrofilnost spojeva ima značajan utjecaj na njihovu topljivost u otapalu i obratno, polarnost otapala također utječe na efikasnost ekstrakcije (Tsao i Deng, 2004).

Tradicionalno se postupci ekstrakcije temelje na ekstrakciji tekuće/tekuće. Međutim, takva ekstrakcija podrazumijeva upotrebu velikih količina organskih otapala, dugotrajna je i ekološki neprihvatljiva (Aturki i sur., 2008).

Najčešće korišteno otapalo u ekstrakciji kruto/tekuće je heksan i, u znatno manjoj mjeri, metanol. Sačma koja se ostaje nakon ekstrakcije uz pomoć heksana sebi može zadržati polarne lipide. Osim metanola i heksana za ekstrakciju ulja se mogu koristiti vodena otopina etanola i vodena otopina metanola s amonijakom (Oomah i sur., 1996). Upotrebom vodene otopine etanola dolazi do bolje ekstrakcije fosfolipida i slobodnih masnih kiselina u usporedbi s ekstrakcijom gdje se koristi heksan (Nieh i Snyder, 1991). Vodena otopina metanola s amonijakom poboljšava učinak ekstrakcije i smanjuje koncentraciju nepoželjnih lipida, poput oksidiranih masnih kiselina, što rezultira poboljšanjem okusa. Prisutnost amonijaka u vodenoj otopini metanola je također zaslužna za uklanjanje cijanogenih glikozida iz lanene pogače te smanjenje koncentracije fenolnih kiselina, tanina i topljivih šećera u sačmi. Na taj način se poboljšavaju prehrambena i senzorska svojstva lanene sačme.

U novije vrijeme jedno od najčešće upotrebljivanih otapala za ekstrakciju biljnih lignana je otopina 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH. Za analizu biljnih lignana najčešće se koristi plinska kromatografija (GC) i visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC). Prilikom izolacije i analize biljnih lignana na plinskoj kromatografiji lignani se moraju pretvoriti u oblike koji su manje polarni. Pretvorba lignana u manje polarne oblike se odvija uz pomoć kemijske reakcije derivatizacije. Postoje 3 načina derivatizacije, a to su sililacija, acilacija i alkilacija. Do sada se samo sililacija koristi prilikom analize biljnih lignana na GC-u (Čukelj i sur., 2011).

Ovisno o krajnjim ciljevima ekstrakcije važno je dobiti što čišći ekstrakt tako da u njemu ne bude tvari koje bi mogle negativno utjecati na željenu biološku aktivnost. Zadnjih nekoliko godina stručnjaci rade na pronalaženju optimalnog rješenja kada je ekstrakcija u pitanju s ciljem smanjenja vremena ekstrakcije i smanjenja volumena korištenog otapala uz istovremeno zadržavanje poželjne kemijske strukture i biološke aktivnosti određenog fenolnog spoja Fontana i sur. (2013).

## **2.6. Nove metode ekstrakcije**

Nove metode ekstrakcije u ovom slučaju podrazumijevaju ekstrakcije potpomognute energijom mikrovalova i kombinacije mikrovalova i ultrazvuka. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija je jedna od najvažnijih metoda za ekstrakciju vrijednih spojeva iz biljnih materijala (Spigno i Faveri 2009). Mikrovalnom ekstrakcijom postiže se smanjenje vremena trajanja ekstrakcije, smanjena uporaba otapala i poboljšani ekstrakcijski prinos. Bitni čimbenici kod mikrovalne ekstrakcije su izbor otapala i temperatura. Izbor otapala ovisi o topljivosti željenog ekstrakta, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala određenim dielektričnom konstantom. Odabrano otapalo treba imati visoku dielektričnu konstantu i mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova. Osim otapala i temperature, mikrovalna ekstrakcija je određena snagom i frekvencijom mikrovalova, trajanja mikrovalne radijacije, količinom vlage i veličinom čestica u uzorku, tlakom i brojem ekstrakcijskih ponavljanja (Wang i Weller, 2006). Povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom, a kod ekstrakcije termo-labilnih spojeva uzrokuje razgradnju ekstrakata.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom visokog intenziteta (20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost u kraćem vremenu (Caili i sur., 2006), jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala (Chemat i sur., 2004a). Ekstrakcija ovisi o primijenjenoj frekvenciji, intenzitetu ultrazvuka, vremenu tretiranja i polarnosti medija, koji može biti čista otopina ili smjesa otapala. Ultrazvuk se može koristiti i u kombinaciji s mikrovalnim zračenjem s ciljem povećavanja stupnja iskorištenja (Chemat i sur., 2004b).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Uzorci

Kao materijal u ovom radu je korištena pogača lana koju smo proizveli laboratorijskim hladnim prešanjem na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu iz sjemena lana uzgojenog 2015. godine u okolini Zagreba na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon proizvodnje ulja dobiveni nusproizvod tj. pogača je samljevena i skladištena u hladnjaku na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.2. Reagensi i standardi

- metanol
- HPLC metanol
- natrij hidroksid
- mravlja kiselina
- petroleter
- octena kiselina
- enzim *beta*-glukuronidaza/sulfataza iz *H. pomatia* (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Natrij acetatni pufer
- Sekoizolarikirezinol diglucoizd (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Sekoizolarikirezinol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Larikirezinol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Matairezol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

Priprema 0,05 M Na-acetatnog pufera se provodi na način da se u čašu od 100 mL doda 80 mL destilirane vode i magnet. U čašu se doda 0,290 mL octene kiseline. Nakon toga se dodatkom 2 M ili 4 M NaOH uz miješanje vrijednost pufera postavi na 5.

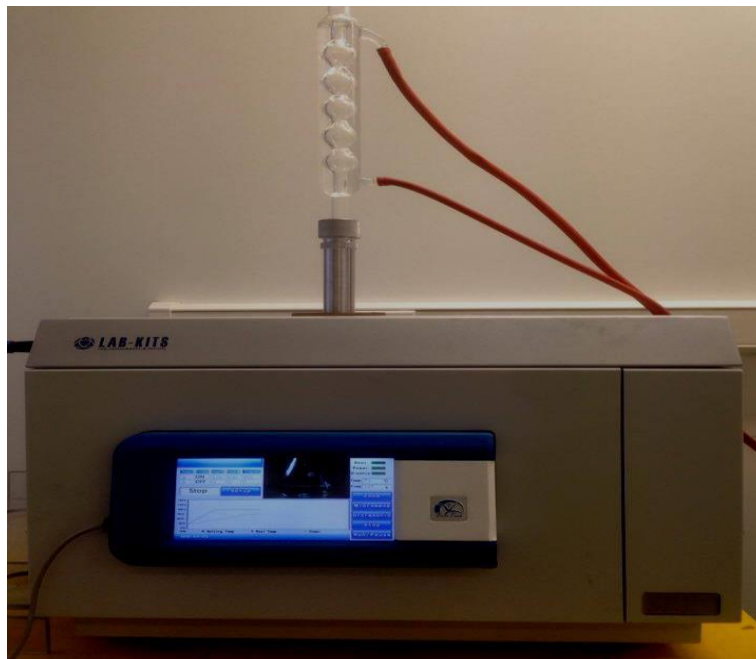
### 3.1.3. Aparatura

- SPE Kolone s C-8 punjenjem (Varian, Bond Elut – Certify II, 50 mg, 3 mL)
- aparatura po Soxhletu (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)(Slika 5)
- magnetska mješalica IKA, C-MAG HS7 s termoregulatorom IKA, ETS-D5, Staufen im Breisgau, Njemačka
- laboratorijska pužna preša „Komet“, model CA/53 (Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka)
- rotavapor (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- uparivač s dušikom, Reacti-Therm Dry Block + Reacti-Vap Evaporator, Pierce, SAD
- mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor (Lab Kits, Hong Kong, Kina) (Slika 6)
- centrifuga (Falcon, Colorado, SAD)
- HPLC sustav sa binarnom pumpom, autosemplerom, DAD detektorom 1200 Series, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD).
- ultrazvučna kupelj (Sonorex, Belin, Njemačka)





**Slika 5.** *Aparatura po Soxhletu (vlastita fotografija)*



**Slika 6.** *Ultrazvučno – mikrovalni ekstraktor (vlastita fotografija)*

## 3.2. Metode rada

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

Za određivanje vode u sjemenu lana korištena je standardna metoda (HR EN ISO 665:2004), sušenja do konstantne mase u sušioniku pri temperaturi od  $103 \pm 2$  °C. Sjeme lana analiziralo se bez prethodnog mljevenja.

U osušenu i izvaganu posudicu izvaže se na analitičkoj vagi 5 g sjemena, s točnošću 0,001 g. Posudica se stavi s podignutim poklopcem u sušioniku koji je prethodno zagrijan na  $103 \pm 2$  °C. Nakon 2 sata posudica se u sušioniku zatvori poklopcem i stavi u eksikator hladiti. Kada se ohladi do sobne temperature, izvaže se i ponovo stavi s podignutim poklopcem u sušionik na 1 sat, nakon čega se ponovo se hladi i važe. Sušenje se nastavlja po 1 sat dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne bude najviše 0,005 g. Za svaki uzorak naprave se dva paralelna određivanja, među kojima razlika ne smije biti veća od 0,5%.

Kao rezultat uzima se srednja vrijednost dva paralelna određivanja. Udjel vode izražava se u postocima prema jednadžbi [1]:

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

gdje je :

$m_0$  = masa prazne posudice (g)

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

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

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

Za određivanje ulja u sjemenu lana, u ovom je radu korištena standardna metoda (HR EN ISO 659:2010).

U tuljcu za ekstrakciju izvaže se 5-10 g samljevenog očišćenog sjemena lana. Mljevenje je izvršeno u električnom mlinu za kavu. Izvagani uzorak u tuljcu zatvori se vatom stavi u aparat za ekstrakciju. Doda se potrebni volumen otapala petroletera, a ekstrakt se skuplja u izvaganu tikvicu u koju su stavljene 1-2 staklene kuglice za vrenje. Ekstrakcija se provodi 8 sati u aparatu po Soxhletu. Nakon završene ekstrakcije, otpari se otapalo, a ostatak suši 60 minuta pri  $103 \pm 2$  °C, ohladi i važe. Sušenje se nastavlja po 30 minuta do konstantne mase. Rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja s tim da razlika ne prelazi 0,5 %, a izražava se jednom decimalom.

Maseni udjel ulja izračuna se prema jednadžbi [2]:

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

gdje je:

$m_0$  = masa uzroka sjemena (g)

$m_1$  = ukupna masa ekstrahiranog ulja (g)

### 3.2.3. Proizvodnja ulja

Prije proizvodnje ulja laneno se sjeme usitnjava električnim mlinom na odgovarajuću veličinu pogodnu za prešanje i dodatkom vode količina vlage se podesi na približno 9,5%. Sjeme je ručno usipavano kroz lijevak preše. Okretanjem puža preše dolazi do prešanja i izdvajanja ulja iz sjemena, a da bi se postiglo što bolje iskorištenje reguliran je tlak na izlaznom otvoru za pogaču. Ulje koje se izdvajalo sakuplja se u odgovarajuću, prethodno pripremljenu, posudu, dok se pogača usitnjavala i ponovo prešala, da bi se postiglo bolje iskorištenje. Nakon drugog prešanja pogača je samljevena u mlinu i čuvana na -20 °C radi daljnjih analiza.

### 3.2.4. Iskorištenja procesa proizvodnje ulja

Da bi odredili iskorištenje procesa proizvodnje ulja iz sjemena lana, potrebno je odrediti udjel vode i ulja u dobivenoj pogači. Navedebu su parametri određeni metodama opisanim u poglavlju 3.2.1. te poglavlju 3.2.2.

Iskorištenje procesa definirano je kao omjer stvarne mase ulja proizvedenog iz 100 g sjemena i udjela ulja u sjemenu u postocima (%). Iskorištenje procesa proizvodnje ulja izračuna se prema jednadžbama [3] i [4];

$$m_u = u_s - \frac{u_p \times (100 - v_s - u_s)}{100 - v_p - u_p} \quad [3]$$

$$\text{Iskorištenje procesa (\%)} = \frac{m_u}{u_s} \times 100 \quad [4]$$

gdje je

$m_u$  = masa dobivenog ulja

$v_s$  = udjel vode u lanenom sjemenu (%)

$u_s$  = udjel ulja u lanenom sjemenu (%)

$v_p$  = udjel vode u pogači (%)

$u_p$  = udjel ulja u pogači (%)

### 3.2.5. Referentna metoda ekstrakcije lignana

U epruvetu s čepom odvažuje se 50 mg pogače lana i doda 5 mL otapala koje se sačinjavalo od 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH. NaOH dodajemo s ciljem postizanja bazne hidrolize kako bi došlo do pucanja esterskih veza unutar makromolekula.

Tako pripremljen uzorak mješan je na magnetskoj mješalici 60 minuta pri temperaturi od 60 °C. Miješalica ima ugrađen senzor za održavanje temperature koji se uroni u čašu s destiliranom vodom u koju se stavljaju i zatvorene epruvete sa uzorcima. Voda se može prije samog miješanja malo ugrijati kako bi ubrzao proces. Nakon 60 minuta epruvete se lagano hlade pod mlazom vode.

Ohlađeni uzorak se centrifugira 10 minuta pri 2500 okr  $\text{min}^{-1}$ . Dobiveni supernatant u kojem se nalaze lignani i fenolne kiseline se prebaci u tikvicu za uparavanje u koju se doda 200  $\mu\text{l}$  octene kiseline za regulaciju pH, vrijednost otpine pH mora biti 5 ili malo viši zbog aktivnosti enzima za hidrolizu.

Otapalo se otpari na rotavaporu 12 minuta pri temperaturi od 60 °C i 70 okr  $\text{min}^{-1}$ . Po završetku uparavanja koncentrirani uzorak se prelije u odmjernu tikvicu od 10 mL, ohladi i nadopuni s metanolom do oznake. 1 mL alikvota se odvoji u epruvetu s navojem i upari pod strujom dušika.

Suhom uzorku se dodaje enzim otopljen u 0,05 M Na-acetatnom puferu. 0,00077 g enzima se otapa u 2 mL pufera u epruveti sa navojem. Epruveta se potom stavlja na magnetsku mješalicu a hidroliza traje 17 sati na temperaturi od 37 °C .

Nakon 17 sati uzorak se nanosi na SPE kolone ali prije samog nanošenja kolone se moraju kondicionirati s 2 mL metanola i 2 ml 0,05 M Na-acetatnog pufera. Nakon kondicioniranja kolone s Na-acetatnim puferom uzorak koji se nalazi u koloni je eluiran s 3

mL metanola. Dobiveni uzorak se prenosi u odvojenu epruvetu i upari pod strujom dušika te ponovno otopi u 3 mL 0,05 M Na-acetatnog pufera.

### 3.2.6. Ekstrakcija lignana i fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru/reaktoru

Ekstrakcija lignana i drugih polifenolnih spojeva u ovom radu provedena je prema metodama koje su u svojim radovima objavili Nemes i Orsat (2011), Beejmohun i sur. (2007) te Cvitanić (2016) u diplomskom radu. U posebnu Erlenmeyer-ovu tikvicu s metalnim produžetkom za prijenos ultrazvučnih valova na dnu doda se 5 g pogače lana te 100 mL otapala za ekstrakciju.

Kao otapalo u našem prvom pokusu (Nemes i Orsat, 2011) korištena je smjesa 70% metanola te 30% NaOH koncentracije od 0,25 do 1 M. Raspon snage koji se koristio bio je od 50 do 150 W, a vrijeme od 1 do 15 minuta. Nakon provedene ekstrakcije, fenolni ekstrakt je odmah odvojen od pogače centrifugiranjem (15 min na 5000 okretaja), a supernatant je prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjen otapalom do oznake. Uzorak se neutralizira octenom kiselinom i profiltrira kroz PVDF filter veličina pora od 0,20  $\mu\text{m}$ .

**Tablica 3.** Parametri ekstrakcije korišteni u radu

Masa uzorka (g)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Snaga mikrovalova (W)	Ultrazvuk	Otapalo
5	3	100-200	Da/Ne	70% metanol + 30% 0,25 M ili 1M NaOH
	9		Ne	

Kod drugog načina izolacije fenolnih spojeva prema metodi Beejmohun i suradnici (2007) korišteno je otapalo s 70% metanola i 30% NaOH čija koncentracija je varirala od 0,1 M do 1 M. Vrijednost snage se kretala od 30 do 360 W. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran, neutraliziran te profiltriran kako je opisano u prethodnom postupku.

**Tablica 4.** Parametri ekstrakcije korišteni u radu

<b>Masa uzorka (g)</b>	<b>Vrijeme ekstrakcije (min)</b>	<b>Snaga mikrovalova (W)</b>	<b>Ultrazvuk</b>	<b>Otapalo</b>
5	1	30-360	Ne	70% metanol + 30% 0,1 M ili 1 M NaOH
	3		Da/Ne	
	5		Ne	
	7		Ne	
	10		Ne	
	15		Da/Ne	

Kod trećeg načina izolacije fenolnih spojeva korištena je metoda kao što je primjenjena u diplomskom radu Cvitanić (2016) te je korišteno otapalo s 80% metanola i 20% destilirane vode. Vrijednost snage je bila 100 W i 200 W s ultrazvukom ili bez. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran a supernatant je prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjen otapalom do oznake.

**Tablica 5.** Parametri ekstrakcije korišteni u radu

<b>Masa uzorka (g)</b>	<b>Vrijeme ekstrakcije (min)</b>	<b>Snaga mikrovalova (W)</b>	<b>Ultrazvuk</b>	<b>Otapalo</b>
5	3	100	Ne	80% metanol
	3	100	Da	80% metanol
	6	200	Ne	80% metanol
	6	200	Da	80% metanol

### 3.2.7. Određivanje sastava lignana pogače lana

Sastav lignana određen je metodom koja je razvijena i validirana u skopu diplomskog rada Cvitanić (2016) koristeći Agilent Technologies HPLC serije 1200 s DAD detektorom. Razdvajanje lignana ekstrahiranih iz pogače lana provedeno je pri 30°C na Phenomenax C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm × 4,6 mm, 2,6 μm, 100 Å). Količina injektiranog uzorka iznosila je 5 μL. Kao mobilna faza korištene su 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B). Protok otapala bio je 0,9 ml min<sup>-1</sup>, a gradijent korišten za razdvajanje polifenolnih spojeva prikazan je u tablici 6.

**Tablica 6.** Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

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

Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su na 280 i 330 nm, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize snimani su spektri u ultraljubičastom djelu spektra (od 200 do 400 nm). Fenolni spojevi lanene pogače identificirani su usporedbom spektara i retencijskih vremena detektiranih spojeva i standarada (galna, protokatehinska, 4-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, *p*-kumarinska, sinapinska, *trans*-cimetna, klorogenska, kavaska i ferulinska kiselina te tirosol, vanilin, siringaldehid, oleuropein i kvercetin). Za identifikaciju lignana pogače lana injektirani su standardi lignana (pinorezinol, sekoizolarikirezinol diglukoizd, sekoizolarikirezinol, larikirezinol i matairezinol). Za kvantifikaciju fenolnih kiselina i alkohola korištene su baždarne krivulje izrađene u sklopu diplomskog rada Cvitanić (2016), dok su lignani pogače lana kvantificirani prema baždarnim krivuljama izrađenim

injektiranjem otopina ranije navedenih standarda lignana u koncentracijama od 0 do 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedene su analize na sjemenu lana uzgojenom u okolici grada Zagreba na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2015. godine. Cilj ovog rada bio je uhodati proces ekstrakcije i detekcije lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana koristeći postojeće metode te ispitati utjecaj mikrovalova i ultrazvuka na ekstraktibilnost bioaktivnih spojeva

### 4.1. Kvaliteta sjemana i iskorištenje procesa proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja

Provedene su analize udjela vode i udjela ulja u sjemenu, s ciljem utvrđivanja kvalitete lanenog sjemena. Laneno ulje proizvedeno je postupkom hladnog prešanja. Sjemenu su određeni parametri kvalitete. Dobiveni rezultati prikazani su pomoću tablica, a kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja. Za određivanje vode u sjemenu i pogači lana korištena je standardna metoda sušenja do konstantne mase a za određivanje ulja u sjemenu i pogači lana, korištena je standardna metoda po Soxhletu.

Udio vode u sjemenu ovisi o stupnju zrelosti sjemena, vremenskim prilikama tijekom sazrijevanja i žetve, a tijekom skladištenja vrlo je važna relativna vlažnost zraka, kako suho sjeme ne bi apsorbiralo vodu iz zraka. Povećanjem vlažnosti sjemena dolazi do biokemijskih promjena u sjemenu pa dolazi do klijanja, razgradnje triglicerida, razvoja plijesni i drugih mikroorganizama, a samim time se umanjuje kakvoća sjemena i povećavaju troškovi jer takvo sjeme prije skladištenja i prerade treba sušiti (Rade i sur., 2001). Udio vode u ispitivanom uzorku je 6,95% što je unutar raspona literaturnih podataka koje su iznijeli Rade i suradnici (2001), a koji navode udio vode 6-8%.

**Tablica 7.** Udio vode i ulja u sjemenu lana

Sorta	Udio vode (%)	Udio ulja na suhu tvar (%)
Sjemenke lana	6,95	40,2

Udio ulja u sjemenu je 40,2% što je isto kao udjel ulja koji navode Sharav i sur. (2013) od oko 40 %, i slaže se s literaturnim podatcima Rade i suradnici (2001) koji navode udjel

ulja u sjemenu od 33 % do 43 %. U ostalim znanstvenim radovima udio ulja u sjemenu se kreće od 35,5 do 46,2 % (Rac, 1964), 20,0-40,0 % (Zhang i sur., 2013), 38,0-45,0 % (Pospišil, 2013) i 34,0-42,3 % (Pali i Mehta, 2014). To ukazuje da je sjeme dobre kvalitete i da su dobiveni rezultati u skladu sa literaturnim navodima.

**Tablica 8.** Udjeli vode i ulja u pogači nakon proizvodnje ulja

<b>Uzorak</b>	<b>Udjel vode (%)</b>	<b>Udjel ulja (%)</b>
Pogača	9,01	13,7

U radu smo postupkom hladnog prešanja proizveli ulje i pogaču kao nusproizvod. Nakon proizvodnje određeni su udjeli vode i ulja u pogači, da bi se izračunalo iskorištenje procesa. Iskorištenje nakon podešavanja udjela vode koje se provodi postepenim dodavanjem vode u samljeveno sjeme (čime se % H<sub>2</sub>O podešava na približno 9,5%) i dvostrukog hladnog prešanja je iznosilo 76,6% što je znato više nego iskorištenje od 34,6% što su dobili Gui i suradnici (2012). To pokazuje koliko podešavanje udjela vlage u sjemenu i ponovno prešanje pogače imaju znatni utjecaj na povećanje iskorištenja, za razliku od Gui i suradnici (2012) koji to nisu radili. Fedio i Dorrel (1977) su u svom radu dobili iskorištenje od samo 4,4% nakon što su udio vode povećali s 8% na 16% s tim da im je početno iskorištenje iznosilo 54%. Unatoč relativno maloj razlici u udjelu vode došlo je do znatnog pada u iskorištenju.

Udio vode i ulja u pogači su prikazani u tablici 5. Dobiveni udio ulja i vode u pogači se slaže s literaturnim navodom za pogaču smeđeg lana koje su objavili Mueller i suradnici (2010) dok je udio ulja u pogači žutog lana je iznosio 7,6%. Do razlike u udjelu ulja u pogači u ovom slučaju je mogla doći zbog različitih sorti sjemenki lana. Gutierrez i suradnici (2010) su objavili rezultate od 27,8% zaostalog ulja i 10,65% za udio vode u pogači. Taj podatak možemo objasniti s lošim iskorištenjem procesa kojeg su koristili.

#### 4.2. HPLC metode za određivanje koncentracije lignana u pogači lanu

Za identifikaciju i određivanje koncentracije lignana u pogači lana korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - HPLC te je korištena metoda koja je razvijena i validirana u skopu diplomskog rada Cvitanić (2016). Lignani u pogači lana identificirani su usporedbom s retencijskim vremenima injektiranih standarda (Tablica 9), a kvantificirani prema jednadžbama izrađenim iz baždarnih krivulja (Tablica 10).

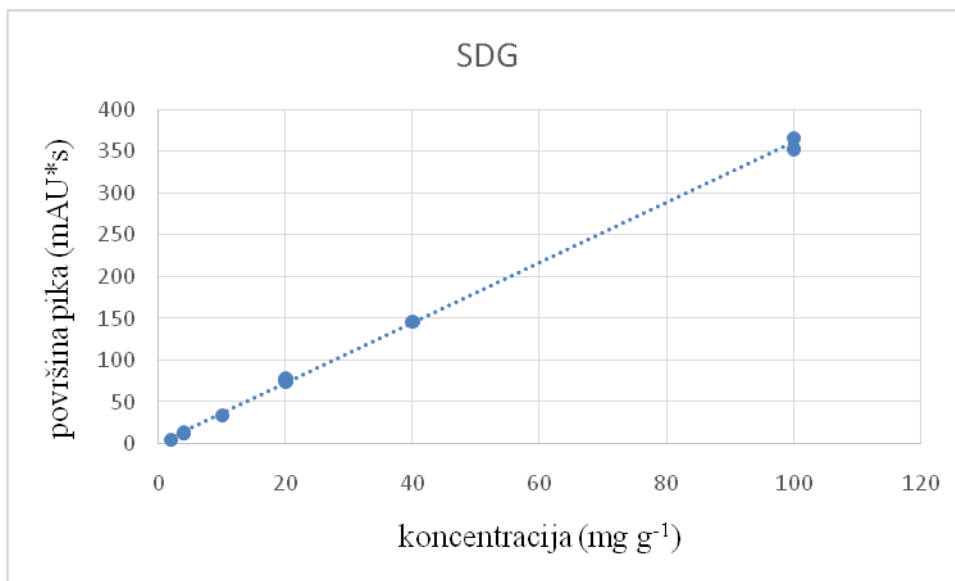
Za izračunavanje retencijskog vremena i jednadžbe pravca koristili smo standarde za sekoizolarikirezinol diglukozid, sekoizolarikirezinol, i matarezinol, pinorezinol larikirezinol u koncentracijama od  $0,1 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $0,04 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $0,02 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $0,01 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $0,004 \text{ mg g}^{-1}$  i  $0,002 \text{ mg g}^{-1}$ .

**Tablica 9.** Vremena zadržavanja (retencijska vremena) lignana korištenih za razvoj metode

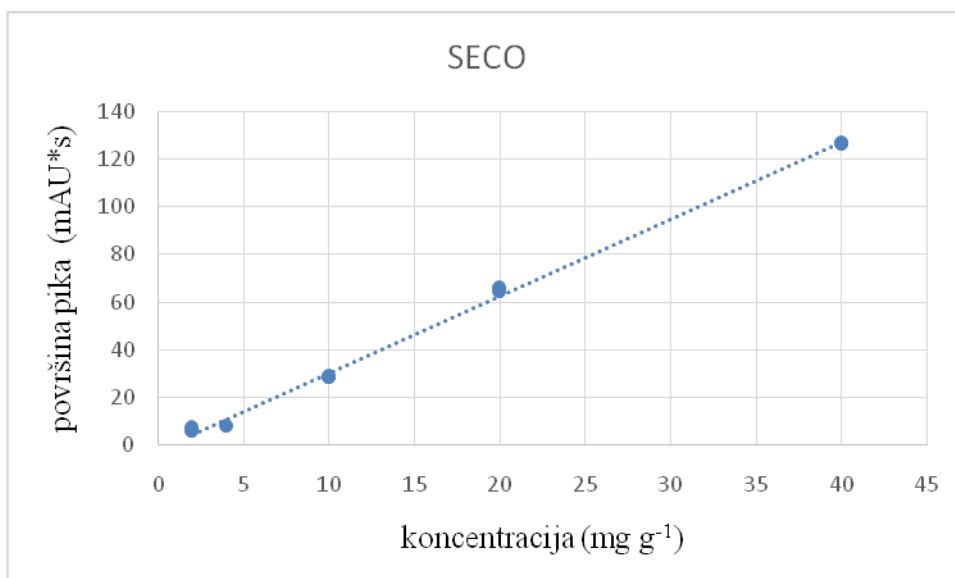
Lignani	Vrijeme zadržavanja (min)
Sekoizolarikirezinol diglukozid	17,10
Sekoizolarikirezinol	16,70
Matarezinol	18,19
Larikirezinol	16,47
Pinorezinol	17,70

**Tablica 10.** Jednadžba pravca standarda

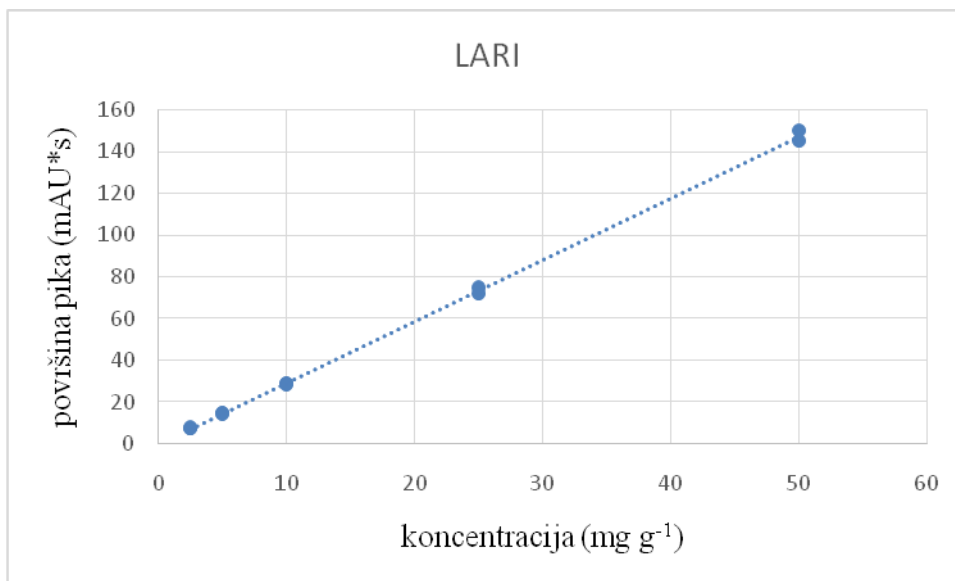
Lignani	Jednadžba pravca
Sekoizolarikirezinol diglukozid	$y = 3,6050x + 0,3970$
Sekoizolarikirezinol	$y = 3,2294x - 1,9474$
Matarezinol	$y = 2,1309x + 12,098$
Larikirezinol	$y = 2,9529x - 0,4193$
Pinorezinol	$y = 4,2271x - 0,5165$



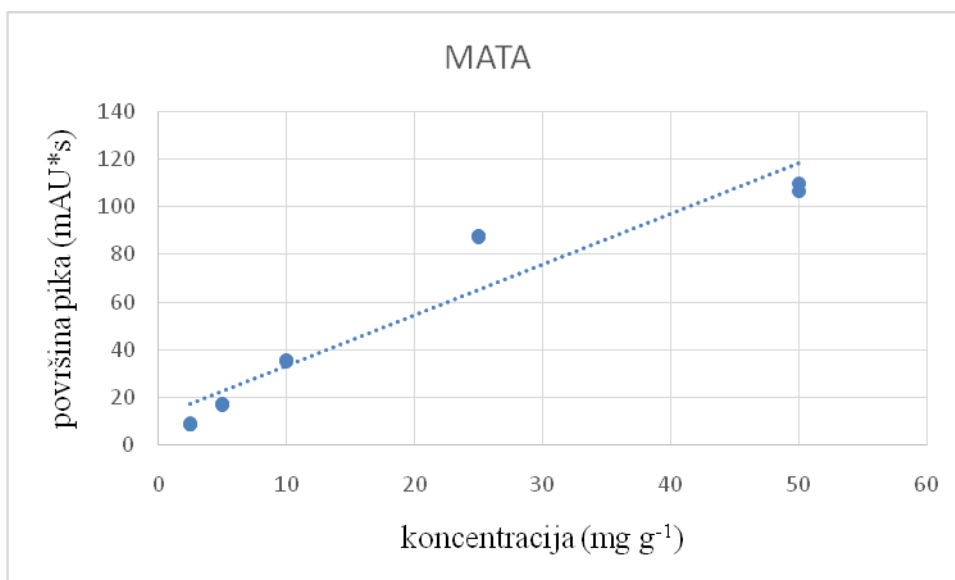
Slika 7. Baždarni dijagram za sekoizolarikirezinol diglukozid



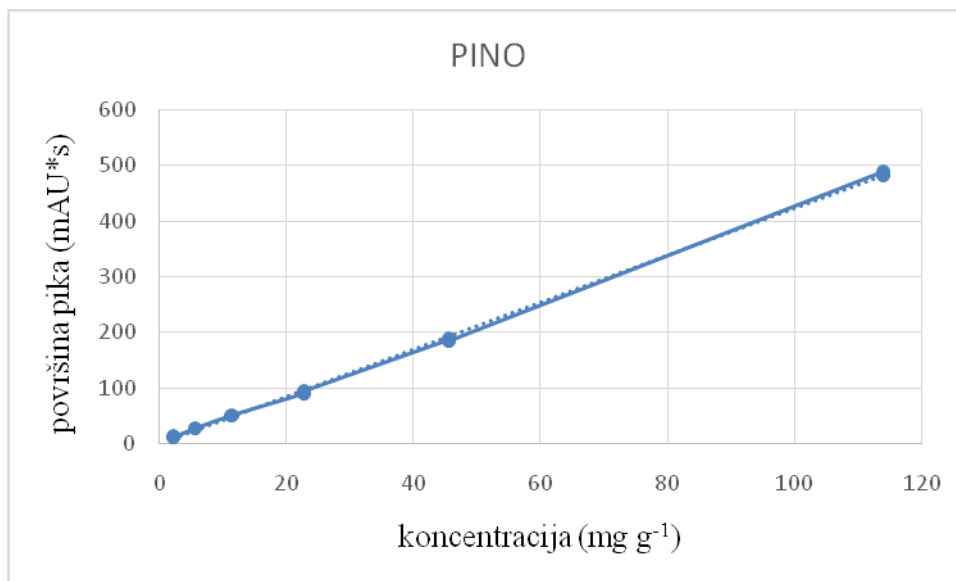
Slika 8. Baždarni dijagram za sekoizolarikirezinol



Slika 9. Baždarni dijagram za larikirezinol



Slika 10. Baždarni dijagram za matarezinol

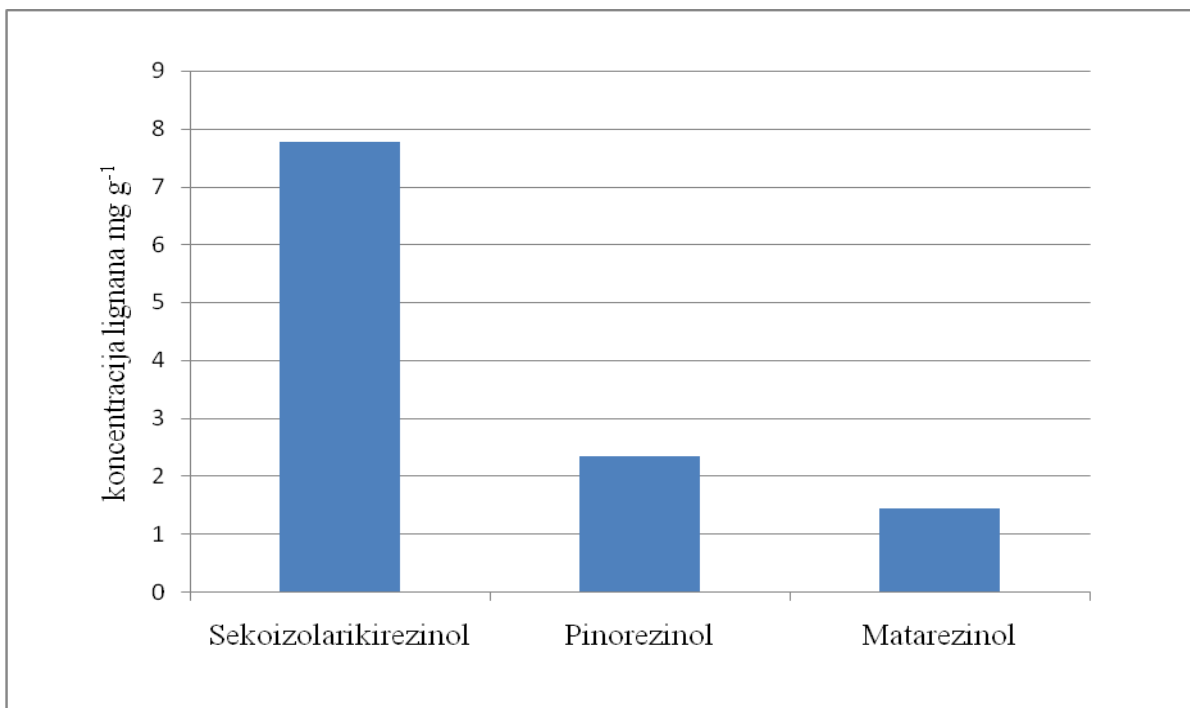


Slika 11. Baždarni dijagram za pinorezinol

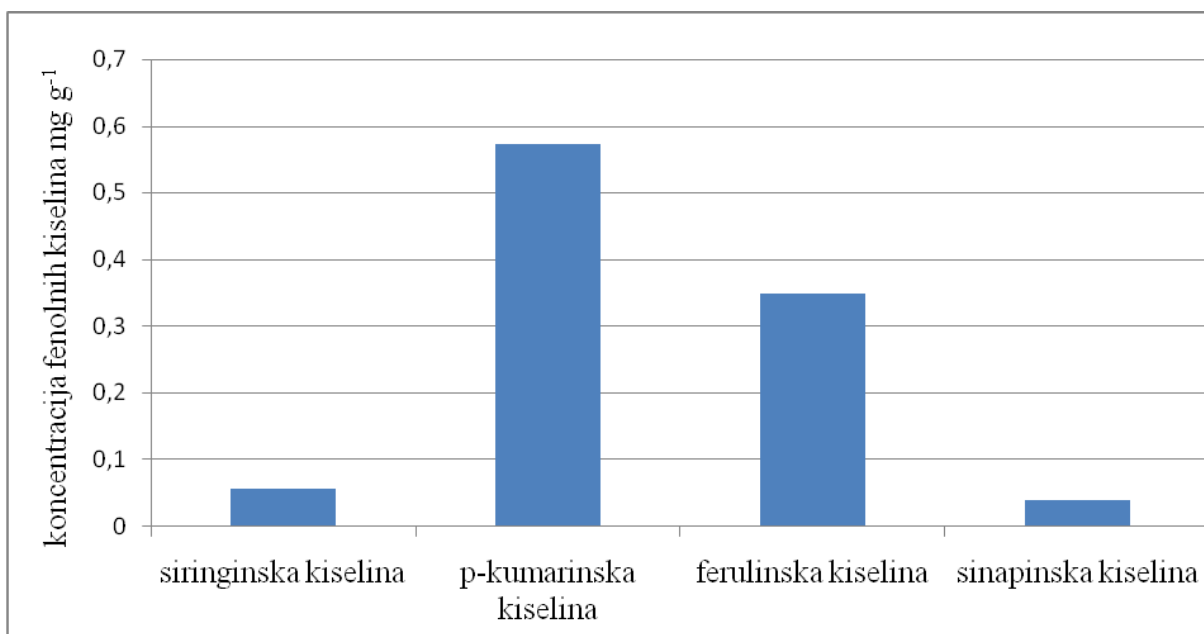
#### 4.3. Ekstrakcija lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana referentnom metodom

Kao referentnu metodu za određivanje lignana iz pogače lana koristili smo modificirani postupak prema Čukelj i suradnici (2011) s ciljem da se odredi koncentracija lignana i drugih fenola u pogači koja će biti korištena u daljnim istraživanjima.

Lan je najbogatiji prirodni izvor lignana te sadrži 75-800 puta više lignana nego druge biljke. Unatoč tome što je sjeme lana bogat izvor lignana vrlo mala količina prelazi u ulje. Obranović (2015) u svom istraživanju govori kako svega 0,001% od sveukupnih lignana iz sjemena prelazi u ulje. Najzastupljeniji lignan u lanu je sekoizolarikirezinol diglukozid (SDG) s koncentracijom 11,9-25,9 mg g<sup>-1</sup>. Osim SDG-a u lanu se još nalaze sekoizolarikirezinol (SECO), pinorezinol (PINO), matarezinol (MATA), larikirezinol (LARI). Koncentracija sekoizolarikirezinola u lanu se kreće oko 3,7 mg g<sup>-1</sup> a matarezinola oko 0,01 mg g<sup>-1</sup>. Svi oni spadaju u biljne lignane koji se u crijevima djelovanjem crijevne mikroflore pretvaraju u enterodiol i enterolakton koji spadaju u životinjske lignane. Koncentracija lignana u ulju može varirati s obzirom na klimatske uvjete, prvenstveno temperature tijekom godine (Westcott i Muir, 1996).



Slika 12. Koncentracija lignana u pogači lana dobivenih po metodi od Čukelj i suradnici (2011)



Slika 13. Koncentracija fenolnih kiselina u pogači lana dobivenih po metodi od Čukelj i suradnici (2011)

Rezultati dobiveni ovom metodom su prikazani na Slici 11. i Slici 12. Iz dijagrama (Slika 11) je vidljivo da od lignana u pogači lana najviše ima sekoizolarikirezinola s

koncentracijom od  $7,76 \text{ mg g}^{-1}$  a potom pinorezinola s  $2,33 \text{ mg g}^{-1}$  te matarezinola s  $1,43 \text{ mg g}^{-1}$ . Razlog nedostatka SDG-a korištenjem ove metode može biti taj što je došlo do cjepanja molekula glukoze pod utjecajem bazne i kiselinske hidrolize te je čitav SDG prešao u SECO. Rezultati naše metode se poklapaju sa metodom Kraushofer i Sontag (2002) koji su koristili „two step“ metodu ekstrakcije i dobili koncentraciju sekoizoralikirezinola od  $7,71 \text{ mg g}^{-1}$ . Beejmohun i suradnici (2007) su u svom istraživačkom radu određivali koncentracije SDG-a, *p*-kumarinske kiseline i ferulinske kiseline. Koncentracija SDG-a koju su dobili Beejmohun i suradnici (2007) je iznosila  $15,6 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$ , Rezultati koje su dobili Beejmohun i suradnici (2007), koristeći ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i mikrovalovima, su mnogo veći nego rezultati koje smo mi dobili koristeći standardnu metodu za ekstrakciju lignana. Možemo pretpostaviti kako ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i mikrovalovima ima mnogo bolji učinak na ekstrakciju od korištene referentne metode, ali isto tako do ove razlike može doći i zbog utjecaja klime ili sorte. U drugim literaturnim navodima koncentracija SDG-a se kretala oko  $13 \text{ mg g}^{-1}$  Liggins i suradnici (2000). Herchi i suradnici (2011) su pratili koncentracije pinorezinola, matarezinola i sekoizolarikirezinola kod 3 sorte lana tijekom različitih faza zrenja. Najveća zabilježena koncentracija pinorezinola je bila  $6,18 \text{ mg g}^{-1}$  dok su koncentracije matarezinola i sekoizolarikirezinola iznosile  $0,23 \text{ mg g}^{-1}$  tijekom 7 dana nakon cvatnje. Pretpostavlja se da je do pada u koncentraciji pinorezinola s  $6,18 \text{ mg g}^{-1}$  na  $0,01 \text{ mg g}^{-1}$ , u kasnijoj fazi zrenja, došlo zbog slabije aktivnosti ili čak potpune inaktivacije enzima pinorezinol sintaze.

Što se tiče fenolnih kiselina iz dijagrama (Slika 12) je vidljivo da najviše ima *p*-kumarinske kiseline s koncentracijom od  $0,57 \text{ mg g}^{-1}$ , a slijede ferulinska kiselina s koncentracijom  $0,34 \text{ mg g}^{-1}$ , siriginska kiselina s koncentracijom  $0,06 \text{ mg g}^{-1}$  te sinapinska kiselina s koncentracijom  $0,04 \text{ mg g}^{-1}$ . Beejmohun i suradnici (2007) su u svom radu objavili koncentracije *p*-kumarinske kiseline  $2,8 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ , a koncentracije ferulinske je iznosila  $3,7 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ . Herchi i suradnici (2011) su u svom radu ispitivali koncentracije fenolnih kiselina s obzirom na dane zrenja lana kod 3 vrste lana. Koncentracija ferulinske kiseline se kretala od  $0,01 \text{ mg g}^{-1}$  do  $2,15 \text{ mg g}^{-1}$ . Najveća koncentracija od  $2,15 \text{ mg g}^{-1}$  je zabilježena 7 dana nakon cvatnje i s vremenom je padala do najniže od  $0,01 \text{ mg g}^{-1}$ . Takvi rezultati mogu biti posljedica pada aktivnosti *o*-metil transferaze koja katalizira transfer funkcionalnih skupina. Rezultati koje su dobili Kraushofer i Sontag (2002) ukazuju na to da je način ekstrakcije fenolnih kiselina iz lana jako bitan faktor. Prema njihovim istraživanjima najbolja metoda ekstrakcije je „two step“ metoda gdje je prvi korak alkalna hidroliza, a drugi



enzimatska hidroliza. Prilikom ovakvog načina ekstrakcije koncentracija *p*-kumarisne kiseline je iznosila oko 1,5 mg g<sup>-1</sup>, a ferulinske oko 1,0 mg g<sup>-1</sup>.

#### 4.4. Ekstrakcija lignana pogače lana na ultrazvučnom-mikrovalnom ekstraktoru

Ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor je višenamjenski aparat koji daje mogućnost tri načina rada; ultrazvučno, mikrovalno i kombinirano ultrazvučno-mikrovalno. Korištena su otapala s različitom koncentracijom NaOH, vrijeme ekstrakcije, snaga mikrovalova i ultrazvuk.

Mikrovalno zračenje predstavlja elektromagnetsko zračenje s frekvencijom od 300 MHz do 300 GHz. Snaga mikrovalova je neionizirajuća tj. energija fotona nije dovoljno velika da dođe do pucanja kemijskih veza u molekulama. Prilikom mikrovalnog zračenja voda, masti i šećeri apsorbiraju zračenje koje se konvertira u gibanje, a gibanje prelazi u toplinu. Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Tijekom dielektričnog zagrijavanja dolazi do zagrijavanja cijelog volumena istovremeno i rotacije dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks i na taj način poboljšava ekstrakciju (Nemes 2007).

Struktura lignan je bila predmet brojnih istraživanja (Ramsay i sur. 2016). Struktura SDG-a je točno definirana Rickard i suradnici (1996), ali točan sastav makromolekula u lanu još uvijek nije jasno određen. Ramsay i suradnici (2016) su proučavali razvoj makromolekula lignana 4, 10, 16, 20, 24, 35, 45 dana nakon cvatnje. SDG je uglavnom povezan esterskim vezama unutar makromolekule lignana, ali jedna mala koncentracija slobodnog SDG je zabilježena tokom rane faze razvoja. Od 1. do 10. dana koncentracija slobodnog SDG-a je najveća i iznosi 25 mg g<sup>-1</sup>. Od 10. dana pa nadalje koncentracija SDG-a raste, ali dolazi do povezivanja SDG-a s hidroskimetilglutaričnom kiselinom (HMG) esterskom vezom. Signal koji je dobiven na HPLC-u odgovara lignan monoglizozidima i oni su dobiveni prije bazne hidrolize što znači da oni nisu uključeni u strukturu makromolekula. Signal dobiven na HPLC-u nakon 20 dana odgovara glukozidu hidroskicimne kiseline (HCAG) i postaje sve intenzivniji kako vrijeme zriobe prolazi. Takvi spojevi nisu vidljivi na spektru ako se ne korsi bazna hidroliza što znači da se te molekule akumuliraju u makromolekulama lignana

esterskim vezama. Nazastupljeniji HCAG-s spojevi su glukozid kumarinske kiseline (0,03-3,18 mg g<sup>-1</sup>) i glukozid ferulinske kiseline (0,02-1,13 mg g<sup>-1</sup>).

Yuan i suradnici (2008) navode kako je neophodno koristiti NaOH prilikom ekstrakcije SDG-a kako bi došlo do pucanja esterskih veza u makromolekulama. Također u svom radu navode kako koncentracija NaOH i temperatura imaju značajan utjecaj na vrijeme potrebno da dođe do hidrolize i oslobađanja SDG iz makromolekule. Osim bazne hidrolize prilikom ekstrakcije lignana iz lana je potrebno koristiti i kiselinsku hidrolizu. Yuan i suradnici (2008) navode kako se kiselinskom hidrolizom iz SDG dobiva SECO te male količine *p*-kumarinske i ferulinske kiseline. Na koncentraciju SECO izdvojenog iz SDG-a utječe koncentracija kiseline, vrijeme hidrolize i temperatura.

Provođenje postupaka ekstrakcije kako je prikazano u paragrafu 3.2.6. nije dovelo do dobivanja željenih rezultata tj. do ekstrakcije lignana iz pogače lana i njihove detekcije putem tekućinske kromatografije. Moguće da je došlo do promjena unutar strukture samih molekula lignana pod utjecajem mikrovalova čime je otežano njihovo detektiranje.

Korištenjem parametara koji su prikazani u tablicama 3 i 4 nismo dobili očekivane rezultate, a uzrok tome može biti mala koncentracija i volumen NaOH u otapalu i velika masa uzorka (5 g). Upotrebom manje mase uzorka i većeg volumena i koncentracije NaOH došlo bi do pucanje esterskih veza u makromolekuli i oslobađanja SDG kao što predlažu Yuan i suradnici (2008). Također, temperatura prilikom postupaka prikazanih u tablicama 3 i 4 nije prelazila 35 °C što je bitan faktor za ekstrakciju i stabilnost SDG.

Prilikom provođenja ekstrakcije kako je prikazano u tablici 5. nije došlo do oslobađanja SDG-a iz makromolekule jer otapalo u ovom pokusu nije sadržavalo NaOH koji bi hidrolizirao esterske veze unutar makromolekule.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Uspješno je proizvedeno ulje dvostrukim hladnim prešanjem a kao nusproizvod dobivena je pogača sa vrlo niskim udjelom ulja (13,7%) te je iskorištenje postupka proizvodnje lanenog ulja dvostrukim prešanjem iznosilo 76%.

2. Referentnom metodom ekstrakcije lignana i fenolnih spojeva iz pogače lana detektirani su sljedeći lignani: sekoizolarikirezinol, pinorezinol, matarezinol; te fenolne kiseline: siriginska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, sinapinska kiselina.

3. Primjena metoda ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom nije dala željene rezultate te je potrebno daljnje istraživanje i optimiranje metode.

## 6. LITERATURA

Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T. (1993) Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J. Steroid Biochem.* **44**, 147–153.

Atkinson, D. A., Hill, H.H., Shultz, T.D. (1993) Quantification of mammalian lignans in biological fluids using gas chromatography with ion mobility detection. *J. Chromatogr.* **617**, 173–179.

Aturki, A., Fanali, S., D’Orazio, G., Rocco, A., Rosati, C. (2008) Analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oil by using reversed-phase capillary electrochromatography. *Electrop.* **29**, 1643–1650.

Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S. (1998) Differential response of estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  to partial estrogen agonist/antagonist. *Mol. Pharmacol.* **54**, 105–112.

Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M.A., Mesnard, F. (2007) Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed. *Phytochem. Anal.* **18**, 275–282.

Brooks, J.D., Ward, W.E., Lewis, J.E., Hilditch, J., Nickell, L., Wong, E. (2004) Supplementation with flaxseed alters estrogen metabolism in postmenopausal women to a greater extent than does supplementation with an equal amount of soy. *Am J. Clin. Nutr.* **79**, 318–325.

Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C., Wenjuan, D. (2006). Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrason. Sonochem.* **13**, 511–516.

Carreau, C., Flouriot, G., Bennetau-Pelissero, C., Potier, M. (2008) Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on

ERalpha transcriptional activation in human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem.* **110**, 176–185.

Chemat, S., Lagha, A., Amar, H.A., Bartels, P. Chemat, F. (2004a) Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour Frag. J.* **19**, 188-195.

Chemat, S., Lagha, A., Amar, H.A., Chemat, F. (2004b) Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 5-8.

Clavel, T., Henderson, G., Engst, W., Dore, J., Blaut, M. (2006) Phylogeny of human intestinal bacteria that activate the dietary lignan Secoisolariciresinol diglucoside. *FEMS Microbiology* **55**, 471–478.

Codex stan 210-Codex standard for named vegetable oils (1999) FAO/WHO, Rim.

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

Čukelj, N., Jakasa, I., Sarajlija, H., Novotni, D., Čurić, D. (2011) Identification and quantification of lignans in wheat bran by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, **84**, 127-132.

Damdimopoulou, P., Nurmi, T., Salminen, A., Damdimopoulos, A.E., Kotka, M., van der Saag, L. (2011) A single dose of enterolactone activates estrogen signaling and regulates expression of circadian clock genes in mice. *J. Nutr.* **141**, 1583–1589.

Fontana R. A., Antonioli, A., Bottini, R. (2013) Grace pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization and biotechnological applications of phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8987-9003.

Ford, J.D., Huang, K.S., Wang, H.B., Davin, L.B., Lewis, N.G. (2001) Biosynthetic pathway to the cancer chemopreventive Secoisolariciresinol diglucoside-hydroxymethylglutaryl esterlinked lignan oligomers in flax seeds *Linum usitatissimum*. *J. Nat. Prod.* **64**, 1388–1397.

Green, S., Chambon, P. (1998) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* **4**, 309–314.

Gui, B., Shim, Y.Y., Dalta, R.S.S., Covello, P.S., Stone, S.L., Reaney, M.J.T. (2012) Identification and quantification of cyclolinopeptides in five flaxseed cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 8571-8579.

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

Hebert-Croteau, N. (1998) A meta-analysis of hormone replacement therapy and colon cancer in women. *Cancer Epidem. Biomar.* **7**, 653–659.

Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T. (2001) In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J. Agr. Food Chem.*, **49**, 3178–3186.

Herchi, W., Sakouhi, F., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Boukhchina, S., Kallel, H., Fernandez-Gutierrez, A. (2011) Changes in the content of phenolic compounds in flaxseed oil during development. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **88**, 1135-1142.

Hu, C., Yuan, Y.V., Kitts, D.D. (2007) Antioxidant activities of the flaxseed lignan SECOisolariciresinol diglucoside, its aglycone SECOisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2219–2227.

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

HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari.

Johnsson, P. (2004) Phenolic compounds in flaxseed. PhD Thesis. University of agricultural sciences Uppsala

Kanu, P. J., Bahsoon, J. Z., Kanu, J. B., Kandeh, J. B. (2010) Nutraceutical importance of sesame seed and oil: a review of the contribution of their lignans, *J. Biomed. Res.* **2**, 4–16.

Kuijsten, A., Arts, I.C.W., Hollman, P.C.H., van't Veer, P., Kampman, E. (2006) Plasma enterolignans are associated with lower colorectal adenoma risk. *Cancer Epidem. Biomar.* **15**, 1132–1136.

Kraushofer, T., Sontag, G. (2002) Determination of some phenolic compounds in flax seed and nettle roots by HPLC with coulometric electrode array detection. *Eur. Food Res. Technol.* **215**, 529–533.

Landete, J. M. (2012) Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res. Int.* **46**, 410-424.

Liggins, J., Grimwood, R., Bingham S. A. (2000) Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Anal. Biochem.* **287**, 102–109.

Low, Y.L., Taylor, J.I., Grace, P.B., Dowsett, M., Scollen, S., Dunning, A.M. (2005) Phytoestrogen exposure correlation with plasma estradiol in postmenopausal women in European prospective investigation of cancer and nutrition norfolk may involve diet gene interactions. *Cancer Epidem. Biomar.* **14**, 213–220.

Mueller, K., Eisner, P., Yoshie-Stark, Y., Nakada, R., Kirchhoff, E. (2010) Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum*), *J. Food Eng.* **98**, 453–460.

Nemes, S. M. (2007) Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Secoisolariciresinol Diglucoside (SDG) from Flaxseed. PhD Thesis. University of McGill

Nemes, S.M., Orsat, V. (2011) Microwave-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside Method Development. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 1219–1227.

Nieh, S. D., Snyder, H. E. (1991) Extraction of oil from soybean flour II — Pilot plant and two-solvent extractions, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 250–253.

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**, 63-79.

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

Oomah, B.D., Giuseppe Mazza, G., Przybylski, R. (1996) Comparison of Flaxseed Meal Lipids Extracted with Different Solvents. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **29**, 654–658.

Pag, A.I., Radu, D.G., Draganescu D., Popa M.I., Sirghie C. (2014) Flaxseed cake – a sustainable source of antioxidant and antibacterial extracts. *Cell Chem. Technol.* **48**, 265-273.

Pali, V., Mehta, N. (2014) Evaluation of Oil Content and Fatty Acid Compositions of Flax (*Linum usitatissimum* L.) Varieties of India. *J. Agr. Sci.* **6**, 198-205.

Pospišil, M. (2013) Ratarstvo II. dio – Industrijsko bilje, Zrinski d.d., Čakovec.

Prasad, K. (1997) Hydroxyl radical-scavenging property of Secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flaxseed. *Mol. Cell Biochem.* **168**, 117–123.

Prasad, K. (2002) Suppression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by Secoisolariciresinol diglucoside (SDG), a new antidiabetic agent. *Int Angiol.* **11**, 107–109.

Przybylski, R. (2005) Flax Oil and High Linolenic Oils. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6. izd., (Shahidi, F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., str. 281-301.

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

Rade, D., Mokrovčak, Ž., Štrucelj, D. (2001) Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida, Durieux, Zagreb.

Ramsay, A., Fliniaux, O., Quéro, A., Molinie, R., Demailly, H., Hano, C., Paetz, C., Roscher, A., Eric Grand, E., Kovensky, J., Schneider, B., Mesnard, F. (2016) Kinetics of the



incorporation of the main phenolic compounds into the lignan macromolecule during flaxseed development. *Food Chem.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.039>

Roncaglia, L., Amarellti, A., Raimondi, S., Leonardi, A., Rossi, M. (2011) Role of bifidobacteria in the activation of the lignan Secoisolariciresinol diglucoside. *Applied Microbiology and Biotechnology*, doi: 10.1007/S00253-011-3338-8

Sathyamoorthy, N., Wang, T.T.Y., Phang, T.M. (1994) Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds. *Cancer Res.* **54**, 957–961.

Sharav, O., Shim, Y. Y., Okinyo-Owiti, D., Sammynaiken, R., Reaney J. T. (2013) Effect of cyclolinopeptides on the oxidative stability of flaxseed oil. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 88-96.

Spingo, G., Faveri, D.M. (2009) Microwave – assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *J. Food Eng.* **93**, 210–217.

Thompson, L.U., Boucher, B.A., Liu, Z., Cotterchio, M., Kreiger, N. (2006) Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans and coumestan. *Nutr. Cancer* **54**, 184–201.

Touillaud, M. S., Pillow, P. C., Jakovljevic, J., Bondy, M. L., Singletary, S. E., Li, D. (2005) Effect of dietary intake of phytoestrogens on estrogen receptor status in premenopausal women with breast cancer. *Nutr. Cancer* **51**, 162–169.

Tsao, R., Deng, Z. (2004) Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr.* **812**, 85-99.

Wang, L., Weller, L. C. (2006) Recent advances in extraction of nutraceutical from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 300-312.

Westcott, N. D., Muir, A. D. (1996) Variation in flaxseed lignan concentration with variety, location and year. In Proc 56th Flax Institute of the United States Conference, Fargo, N.Dak.: Flax Inst. of the United States. str 77–80.

Xie, L.H., Akao, T., Hamasaki, K., Deyama, T., Hattori, M. (2003) Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 508–515.

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

Zhang, Z., Li, D., Zhang, L., Liu, Y., Wang, X. (2013) Heating effect on the DSC melting curve of flaxseed oil. *J. Therm. Anal. Calorim.* **115**, 2129-2135.