

# Utjecaj kriogenog mljevenja na glukozinolate u pogači uljane repice

---

Ramljak, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:071873>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-04**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Ivana Ramljak, 939/PI

**UTJECAJ KRIOGENOG  
MLJEVENJA NA  
GLUKOZINOLATE U POGAČI  
ULJANE REPICE**

*Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Klare Kraljić. 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

*Najiskrenije hvala doc.dr.sc. Klari Kraljić na prihvaćanju mentorstva te uloženom trudu, vremenu, susretljivosti i nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se i profesorici prof.dr.sc. Dubravki Škevin, te ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju ulja i masti na savjetima i dobrom raspoloženju.*

*Hvala cijeloj mojoj obitelji, prijateljima i dečku za ljubav, razumijevanje i pomoć.*

*Posebno hvala mom ocu Radoslavu na svemu što čini za mene.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## UTJECAJ KRIOGENOG MLJEVENJA NA GLUKOZINOLATE U POGAČI ULJANE REPICE

Ivana Ramljak, 939/PI

**Sažetak:** Uljana repica je najraširenija uljarica u Europi koja se u posljednje vrijeme dosta istražuje upravo zbog svojih glukozinolata koji su prisutni u sjemenu. Ti glukozinolati posebno su zanimljivi zbog nutritivnih i antikarcinogenih, ali i antinutritivnih i toksičnih svojstava koji utječu na zdravlje čovjeka. Najznačajniji je oksazolidin-2-tion 2-hidroksi-3-butenil glukozinolat ('progoitrin') koji se nakuplja u sjemenu uljane repice, te dovodi do oštećenja jetre i bubrega. Isprobane su različite metode kako bi se uklonili glukozinolati ili se smanjio njihov sadržaj u svrhu minimiziranja štetnog utjecaja na zdravlje životinja. Istraživanja su usmjerena određivanju sastava, količine, raspodjele glukozinolata u biljkama, njihove fiziološke uloge te potencijalnog biološkog djelovanja. Cilj ovog rada je odrediti udio glukozinolata HPLC-metodom, te vidjeti utjecaj kriogenog mljevenja na njihov sastav. Ovom metodom odredio se sadržaj glukozinolata, te se dokazao utjecaj kriogenog mljevenja na smanjenje udjela glukozinolata.

**Ključne riječi:** uljana repica, glukozinolati, HPLC, kriogeno mljevenje

**Rad sadrži:** 42 stranica, 13 slika, 18 tablica, 20 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

**Mentor:** doc.dr.sc. Klara Kraljić

**Pomoć pri izradi:** prof.dr.sc. Dubravka Škevin

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Dubravka Škevin
2. doc.dr.sc. Klara Kraljić
3. prof. dr.sc. Duška Ćurić
4. izv.prof. Dubravka Novotni (zamjena)

**Datum obrane:** 12. srpanj, 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### **THE INFLUENCE OF CRYOGENIC GRINDING ON GLUCOSINOLATES IN RAPESEED MEAL**

Ivana Ramljak, 939/PI

**Abstract:** Rapeseed is the most widely spread oil-plant in Europe, which has recently been investigated quite precisely because of its glucosinolates present in the seed. These glucosinolates are particularly interesting due to nutritional and anti-carcinogenic, but also antinutritive and toxic properties that affect human health. The most significant is oxazolidine-2-thione 2-hydroxy-3-butenyl glucosinolate ('progoitrin') that accumulates in rapeseed oil and leads to liver and kidney damage. Various methods were tested to remove glucosinolates or reduce their content to minimize the adverse effect on animal health. Investigations are focused on determining the composition, amount, distribution of glucosinolates in plants, their physiological role and potential biological activity. The aim of this study was to determine the glucosinolate content by HPLC method, and the influence of cryogenic grinding on their composition. By this method the content of glucosinolates was determined, and the effect of cryogenic grinding on their reduction was demonstrated.

**Keywords:** rapeseed, glucosinolates, HPLC, cryogenic grinding

**Thesis contains:** 42 pages, 13 figures, 18 tables, 20 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. Klara Kraljić, Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD. Dubravka Škevin, Full professor

#### **Reviewers:**

1. PhD. Dubravka Škevin, Full professor
2. PhD. Klara Kraljić, Assistant professor
3. PhD. Duška Ćurić, Full Professor
4. PhD. Dubravka Novotni, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 12 July, 2019.

## Sadržaj:

1.	UVOD .....	2
2.	TEORIJSKI DIO .....	4
2.1.	GLUKOZINOLATI.....	4
2.1.1.	Koncentracija glukozinolata .....	5
2.1.2.	Kemijske i fizikalne osobine.....	5
2.1.3.	Biosinteza .....	7
2.1.4.	Razgradnja glukozinolata.....	9
2.1.5.	Određivanje ukupne koncentracije glukozinolata .....	10
2.1.5.	Određivanje pojedinačnih glukozinolata.....	11
2.1.6.	Mehanizam djelovanja glukozinolata .....	11
2.1.7.	Biološko djelovanje glukozinolata.....	12
2.1.8.	Utjecaj procesiranja na glukozinolate .....	15
2.1.9.	Biološka dostupnost .....	16
2.2.	GLUKOZINOLATI U ULJANOJ REPICI .....	17
2.2.1.	Goitrogeni i antinutritivni učinak- razvoj 00 sorti .....	17
2.2.2.	Metode uklanjanja glukozinolata .....	17
2.3.	KRIOGENO MLJEVENJE .....	19
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	20
3.1.	MATERIJALI.....	20
3.1.1.	Uzorci .....	20
3.1.2.	Reagensi.....	20
3.2.	METODE RADA .....	21
3.2.1.	Priprema uzorka kriomljevenjem.....	21
3.2.2.	Određivanje sastava i koncentracije glukozinolata tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti .....	22
3.2.2.1.	Ekstrakcija glukozinolata .....	22
3.2.2.2.	Priprema sulfataze ( <i>Helix pomatia</i> ):.....	23
3.2.2.3.	Pročišćavanje i enzimska desulfatacija ekstrakata .....	23
3.2.2.4.	Određivanje glukozinolata .....	24
3.2.2.5.	Identifikacija glukozinolata pomoću UV detektora.....	25
3.2.2.6.	Određivanje glukozinolata .....	25
3.2.3.	Validacija metode .....	26
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	28
4.1.	VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE GLUKOZINOLATA U ULJANOJ REPICI HPLC-METODOM .....	28



4.2.	SASTAV I UDIO GLUKOZINOLATA U ULJANOJ REPICI .....	36
4.2.1.	Sjeme uljane repice .....	36
4.2.2.	Pogača uljane repice .....	37
4.3.	UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA KONCENTRACIJU GLUKOZINOLATA .....	39
5.	Zaključak .....	41
6.	Literatura .....	42

# 1. UVOD

Uljana repica (*Brassica napus*) je dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). Latinski naziv roda *Brassica* potječe od grčke riječi *brassein* (kuhati). Ime vrste *napus* dolazi od grčke riječi *napo* (repa). Zbog svoje relativno niske cijene u odnosu na druge uljarice i dobre prilagodljivosti na različite uvjete, najraširenija je uljana kultura u Europi.

Sjeme uljane repice sitno je i okruglo, promjera 1,5 do 2,5 mm. Masa 1000 sjemenki se kreće od 4 do 6 g. Zbog dugog perioda cvjetanja (25 do 30 dana), uljana repica sazrijeva dosta neravnomjerno. Sjemenke sadrže 40-44 % ulja, 18-23 % proteina, 17 % ugljikohidrata, 7 % fenola i 4 % glukozinolata (Ohlson i Anjou, 1979).

U sjemenu se nalaze štetne tvari: glukozinolati, eruka masna kiselina, fitini i tanin. U ovom radu najveća pozornost bit će usmjerena na glukozinolate, sekundarne biljne metabolite koji spadaju u specifičnu skupinu kemijskih spojeva tzv. 'fitokemikalija'. Posljednjih dvadeset godina počinju se intenzivno istraživati zbog svog utjecaja na zdravlje čovjeka, kako pozitivno tako i negativno. Istraživanja su usmjerena određivanju sastava, količine, raspodjele glukozinolata u biljkama, njihove fiziološke uloge te potencijalnog biološkog djelovanja. Značajnu ulogu pri tome imaju metode određivanja ukupnih i pojedinačnih glukozinolata te produkata njihove razgradnje. Posebno su zanimljivi zbog svojih nutritivnih i antikarcinogenih svojstava, ali i antinutritivnih i toksičnih svojstava, kao i zbog osiguravanja karakteristične arome određenog povrća. Sami glukozinolati su fiziološki neaktivni. Tek njihovom razgradnjom oslobađaju se raznovrsni hlapljivi spojevi te nastaje niz različitih biološki aktivnih produkata kao što su: izotiocijanati, cijanidi, oksazolidintioni, nitrili i dr.

Najvažnija primjena uljane repice jest u: proizvodnji ulja, ishrani stoke i proizvodnji biodizela. Osim ulja, ne manje važan proizvod zrna uljane repice su pogače i sačme, koje se sve više koriste u ishrani domaćih životinja. Sadržaj proteina se kreće od 35-38 %, ugljikohidrata 15-16,5 %, sirovih vlakana 11-12,5 %, vlage 8-10 %, pepela 6-6,5 % i ulja 3,7 %. Pogača i sačma uljane repice, tijekom ishrane, nepovoljno djeluje na životinje. Razlog tomu su upravo antinutritivni spojevi glukozinolata koji ometaju dostupnost joda, te su odgovorni za morfološke i fiziološke promjene štitnjače. Zbog toga se istražuju različite metode kojim bi se uklonio ili smanjio sadržaj glukozinolata, kao i minimizirao štetni učinak

na zdravlje životinja. Većina tih metoda uključuje hidrolizu glukozinolata prije ishrane. Ekstruzija, obrada vodom i metalnim otopinama te djelovanje toplinom samo su neke od istraživanih metoda (Tripathi i Mishra, 2007).

Cilj ovog rada je vidjeti utjecaj kriogenog mljevenja na udjel i sastav glukozinolata u pogači uljane repice. Nadalje određivat će se ukupni kao i pojedinačni udio glukozinolata koji bi trebao omogućiti potpuniji i bolji uvid sastava glukozinolata u uljanoj repici. U tome će pomoći razvoj metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za određivanje istih. Očekuje se da će korištenje ove metode omogućiti potpuniji uvid u sastav i udio razgradnih produkata glukozinolata te time doprinijeti proširivanju znanja o glukozinolatima.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. GLUKOZINOLATI

Svijest o zdravoj i pravilnoj prehrani posljednjih godina znatno se povećala ponajviše zbog povezanosti zdravlja i prehrane. Sve je više istraživanja koja dokazuju pozitivan utjecaj tvari prisutnih u voću i povrću na zdravlje ljudi. Neke od tvari koje su intenzivno istraživane su polifenoli, karotenoidi, folati i glukozinolati.

Glukozinolati (tioglukozidi) su jedinstvena i važna skupina sekundarnih metabolita u nekim vrstama biljaka. To je velika skupina spojeva koja sadrži sumpor. Spadaju u specifičnu skupinu kemijskih spojeva tzv. 'fitokemikalija' koja je zastupljena u 16 botaničkih porodica reda Capparales. Za prehranu ljudi najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju kupus, brokula, cvjetača, rotkvica, prokulice, repa. Okarakterizirano je oko 120 različitih glukozinolata, ali samo mali broj je istraživan. Istraživanja glukozinolata u različitom povrću iz porodice Brassicaceae pokazuju da koncentracija glukozinolata varira u širokom rasponu, a ovisi o sorti te okolišnim čimbenicima (Kopjar i sur., 2012).

Glukozinolati su zanimljivi zbog svojih nutritivnih, antinutritivnih, toksičnih i antikarcinogenih svojstava, kao i zbog osiguravanja karakteristične arome određenog povrća. Sami glukozinolati nisu fiziološki aktivni. Tek njihovom razgradnjom (enzimska ili neenzimska: kemijska i toplinska), oslobađaju se raznovrsni hlapljivi spojevi koji pokazuju čitav niz bioloških aktivnosti. Oštećenjem tkiva (tijekom branja, prerade, žvakanja) dolazi do kontakta između enzima mirozinaze i glukozinolata što dovodi do hidrolize glukozinolata. Na taj način nastaje niz različitih biološki aktivnih produkata kao što su: izotiocijanati, cijanidi, oksazolidintioni, nitrili. Mogući mehanizam antikarcinogenog djelovanja glukozinolata tj. njihovih razgradnih produkata uključuje indukciju detoksifikacijskih enzima i inhibiciju aktivnosti promotagenih / prokancerogenih tvari (Kopjar i sur., 2012).

Brojna su istraživanja ukazala na pojavu glukozinolata u povrću, prvenstveno u povrću iz obitelji Brassicaceae (Fahey i sur., 2001). Glavni fokus mnogih prethodnih istraživanja bio je na negativnim aspektima tih spojeva zbog prevalencije određenih antinutritivnih ili goitrogenih glukozinolata u hrani bogatoj proteinima. Postoji, međutim, suprotna i pozitivna strana ove slike predstavljena terapijskim i profilaktičkim svojstvima drugih nutritivnih ili

funkcionalnih glukozinolata. Osim Brassica povrća, glukozinolati su pronađeni u stotinama vrsta, od kojih su mnoge jestive ili mogu predstavljati znatne količine za izolaciju glukozinolata, za biološku procjenu i moguću primjenu kao kemoterapijski ili drugi dijetalni ili farmakološki agensi (Fahey, 2002).

#### 2.1.1. Koncentracija glukozinolata

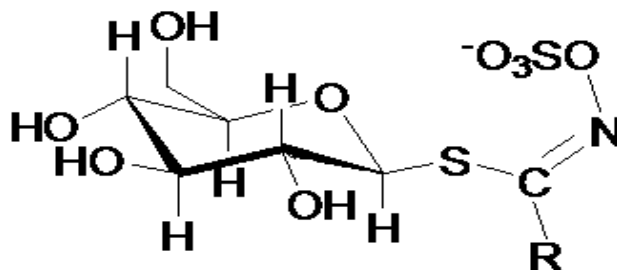
Glukozinolati se nalaze u svim dijelovima biljke u različitim koncentracijama i oblicima. Kod većine biljaka najveća količina glukozinolata zabilježena je u sjemenu. Sadržaj glukozinolata u nekim dijelovima biljki roda Brassica iznosi oko 1 % s obzirom na masu suhe tvari, iako sadržaj može biti promjenjiv i dostići čak 10 % u sjemenu. Najčešće biljka sadrži 2-5 različita glukozinolata, međutim može ih biti i znatno više (npr. kod biljke *Arabidopsis thaliana* identificirana su čak 34 različita glukozinolata). Koncentracija i vrsta glukozinolata u biljci ovise o biljnoj vrsti i starosti, dijelu biljke iz kojeg su izolirani, prisutnosti štetnika, nutrijentima, klimi i ostalim uvjetima za vrijeme rasta biljke (Mithen i sur., 2000).

#### 2.1.2. Kemijske i fizikalne osobine

Prva opažanja o jedinstvenim svojstvima glukozinolata i izotiocijanata zabilježeni su početkom 17. stoljeća kao rezultat pokušaja razumijevanja kemijskog podrijetla oštrog okusa sjemenke gorušice. Otkriće i rana povijest glukozinolata i sudjelovanje enzima mirozinaze ( $\beta$ -tioglukozidaze) u njihovu pretvorbu u izotiocijanate, predmet su zanimljivih i znanstvenih istraživanja. Pri imenovanju glukozinolata najčešće se koriste trivijalna imena nastala od latinskog imena biljke iz koje je glukozinolat prvi put izoliran i dodavanjem prefiksa "gluko" i sufiksa "in". 1961. godine. Ettliger i Dateo predložili su današnju polusustavnu nomenklaturu po kojoj se nazivu "glukozinolat" dodaje prefiks koji se odnosi na sustavnu nomenklaturu bočnog lanca R (npr. benzil glukozinolat). Glukozinolati poznati po trivijalnim imenima sinigrina (2-propenil ili alilglukozinolat) i sinalbin (4-hidroksibenzil glukozinolat) izolirani su početkom 1830-ih iz crnih (*Brassica nigra*) i bijelih (*Sinapis alba*) sjemenki gorušice.

Prva opća, iako neispravna, struktura tih spojeva predložena je krajem devetnaestog stoljeća od Gadamera (1897), koji je zaključio da je bočni lanac povezan s dušikom umjesto ugljikovog atoma "NCS" skupine. Unatoč određenim poteškoćama, ta se struktura smatrala

ispravnom sve do 1956. kada su Ettlinger i Lundeen istaknuli nedostatke Gadamerove strukture kako bi objasnili određene karakteristike tih spojeva, predložili sada točnu strukturu (Slika 1) i prvi opisali kemijsku sintezu glukozinolata (Fahey i sur., 2001).



Slika 1. Opća formula glukozinolata (Fahey i sur., 2001)

Po kemijskoj strukturi, glukozinolati su  $\beta$ -tioglukozid-N-hidroksisulfati kod koji je glukoza i sulfatna skupina vezana na aglukon, koji se sintetizira iz aminokiselina i njihovih analoga. Zajednička temeljna struktura glukozinolata sadrži  $\beta$ -D-tioglikoznu skupinu, sulfatne skupine koja je preko C=N skupine vezana za ostatak molekule (sulfoniranog oksima) i bočnog lanca (označenog s R u općoj strukturalnoj formuli) po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju (Mithen i sur., 2000).

Do 2001. godine identificirano je oko 120 glukozinolata. U međuvremenu su intenzivirana istraživanja glukozinolata što je rezultiralo povećanjem broja identificiranih struktura pa je danas poznato oko 200 glukozinolata, koji se dijele u 3 glavne skupine (Tablica 1): alifatska skupina koja ima alkilni ili alkenilni bočni lanac (sinigrin, progolijin), aromatska skupina (glukonasturciti) i indolna (heterociklička) skupina (glukobrasicin, neoglucobrasicin) (Mithen i sur., 2000).

Tablica 1. Podjela glukozinolata (Zekić, 2013)

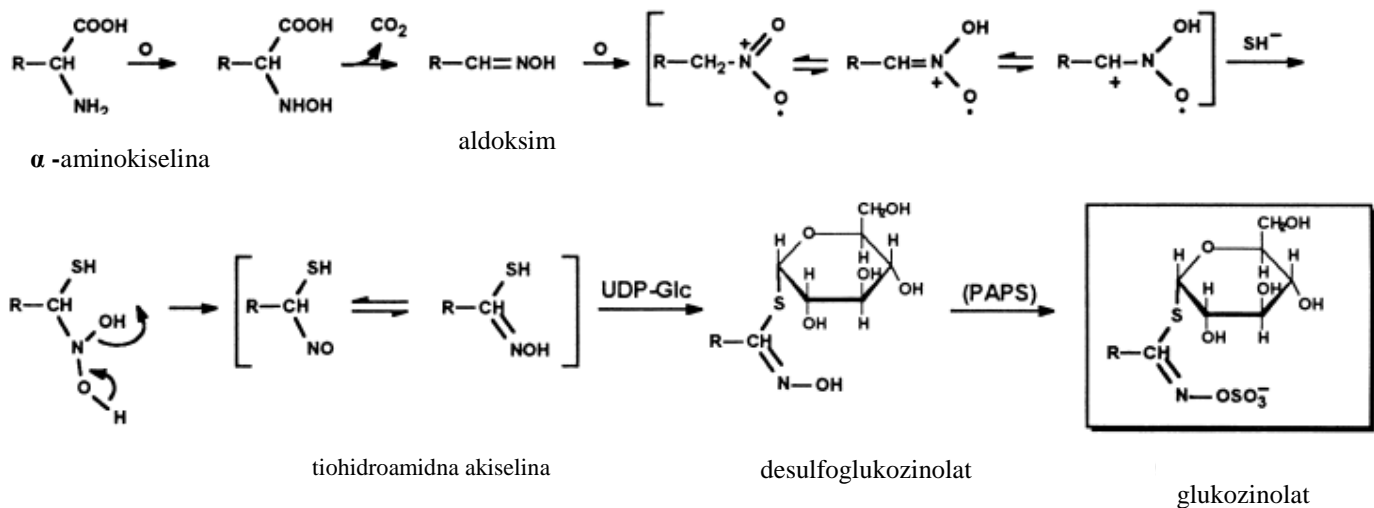
	Trivijalno ime glukozinolata	Nomenklatura bočnog lanca (R)
Alifatski	Glukoiberin	3-(metilsulfinil)propil
	Progoitrin	2-hidroksi-3-butenil
	Sinigrin	2-propenil
	Glukonapoleiferin	2-hidroksi-4-pentenil
	Glukorafanin	4-(metilsulfinil)butil
	Glukoalisin	5-(metilsulfinil)pentil
	Glukobrasikanapin	4-pentenil
	Glukokeirolin	3-(metilsulfonil)propil
	Glukoiberverin	3-(metiltio)propil
	Glukonapin	3-butenil
Aromatski		
	Glukosinalbin	<i>p</i> -hidroksibenzil
	Glukotropaeolin	benzil
	Glukonasturtin	2-feniletil
Heterociklični		
	4-Hidroksiglukobrasicin	4-hidroksiindol-3-ilmetil
	Glukobrasicin	indol-3-ilmetil
	4-Metoksiglukobrasicin	4-metoksiindol-3-ilmetil
	Neoglukobrasicin	1-metoksiindol-3-ilmetil

### 2.1.3. Biosinteza

Biosinteza glukozinolata (Slika 2) može se razmotriti u tri faze: (1) produžetak lanca aminokiselina, (2) sinteza glukozinolata iz aminokiseline i (3) modifikacija lanaca.

- 1) Glukozinolati, s obzirom na biosintetsko podrijetlo, mogu se podijeliti na glukozinolate nastale iz uobičajenih aminokiselina i glukozinolate nastale iz aminokiselina modificiranih produljenjem bočnog lanca. Modifikacija aminokiseline sastoji se od produljenja (elongacije) lanca alifatske ili aromatske aminokiseline umetanjem metilenske skupine u njihove bočne lance, što predstavlja prvi stupanj u biosintezi. U modifikaciju aminokiselina su uključeni različiti enzimi.

- 2) Drugi stupanj je metabolička modifikacija aminokiseline (biosinteza glukona), ili njenog derivata produljenog lanca, koja se odvija preko niza međuprodukata koji su identični za sve glukozinolate. Prvi korak u tom procesu je pretvorba aminokiseline u aldoksim koju kataliziraju različiti enzimi. Međuprodukti između aldoksima i tihidroksimata još uvijek nisu identificirani. Konačni korak drugog stupnja biosinteze je glukozilacija i nastajanje desulfoglukozinolata te sulfatacija do glukozinolata.
- 3) Nastali osnovni glukozinolat podliježe nizu daljnjih sekundarnih modifikacija bočnog lanca (R) koje uključuju reakcije oksidacije, hidroksilacije i acilacije. Bočni lanac glukozinolata koji potječu od aminokiseline metionina posebno je sklon daljnjim modifikacijama (oksidacija atoma sumpora u metiltioalkilnom bočnom lancu u metilsulfinilalkil ili metilsulfonilalkil). Metilsulfinilalkil bočni lanci mogu se dalje modificirati oksidacijskim cijepanjem u alkenil i hidroksialkenil lance. Ove reakcije su biološki i biokemijski važne jer utječu na smjer hidrolize glukozinolata i aktivnost razgradnih produkata hidrolize (Mithen i sur., 2000).



Slika 2. Biosinteza glukozinolata (Fahey i sur., 2001)



#### 2.1.4. Razgradnja glukozinolata

Glukozinolati se razgrađuju na sastavne dijelove hidrolizom (enzimskom ili kemijsko), ali i pod utjecajem povišene temperature (toplinski).

##### 1. Kemijska hidroliza

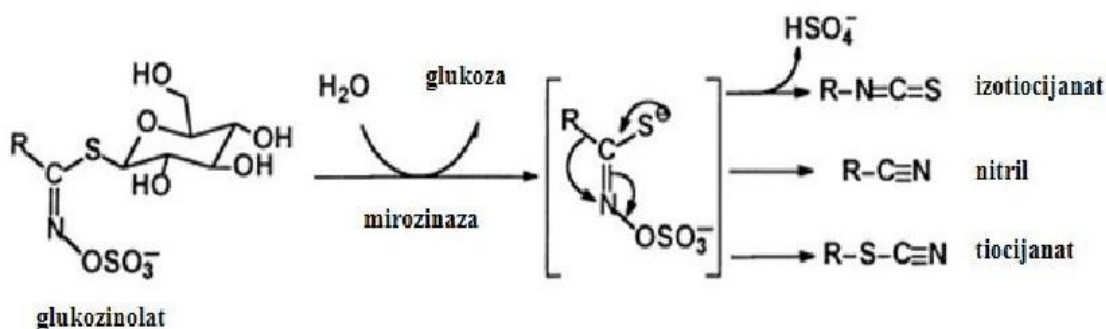
Kemijskom (neenzimskom) razgradnjom glukozinolata nastaju različiti produkti ovisno o uvjetima. Tako, pri povišenoj temperaturi i u jako kiselim uvjetima glukozinolati se razgrađuju na karboksilnu kiselinu i glukozu, a u lužnatim uvjetima nastaju aminokiseline i tioglukoza (Mithen i sur., 2000).

##### 2. Enzimska hidroliza

Glavni uzročnik hidrolize glukozinolata je mirozinaza. To je trivijalno ime za enzim tioglukozid-glukohidrolazu, točnije grupu enzima koji kataliziraju hidrolizu glukozinolata. Kinetika enzimske reakcije razlikuje se od vrste do vrste, pa čak i unutar pojedine vrste. Godinama se raspravljalo o unutarstaničnoj lokalizaciji mirozinaze, posebice u odnosu na lokalizaciju glukozinolata. Nakon dugih istraživanja dokazano je kako se glukozinolati i mirozinaze nalaze odvojeni. Enzimi se nalaze u unutrašnjosti mirozinskih zrnaca, glavnih organelamirozinskih stanica, dok su glukozinolati smješteni u proteinskim tijelima (vakuolama) u nemirozinskim stanicama. Enzimskom hidrolizom glukozinolata nastaju glukoz - glukon i nestabilni međuprodukt – aglukon. Kada se stanice biljke oštete npr. rezanjem ili žvakanjem, mirozinaza dolazi u kontakt s glukozinolatima te dolazi do hidrolize. Aktivnost mirozinaze rezultira odcjepljenjem glukoz tako što se u reakciji hidrolize cijepa veza sumpor - glukoz (tioglukozidna veza) te se oslobađaju glukoz, sulfat i aglukon. Oslobodeni aglukon je nestabilan te se spontano pregrađuje dajući različite razgradne produkte odgovorne za karakterističan okus i miris ovih biljaka. Nastali aglukon se spontano modificira i to najčešće u izotiocijanat. Razgradnja glukozinolata prikazana je na slici 3.

Glukozinolati se često nazivaju i prekursorima izotiocijanata i tiocijanata, spojeva koji sadrže sumpor te nitrila i indola, spojeva koji ne sadrže sumpor u svojoj strukturi. Pri tom su izotiocijanati i indoli najpoznatiji biološki aktivni spojevi koji nastaju enzimskom hidrolizom glukozinolata. Hoće li nastati izotiocijanati ili nitrili ovisi o specifičnosti (vrsti) glukozinolata, dijelu biljke gdje se glukozinolati nalaze, tretiranju biljke prije hidrolize te uvjetima tijekom

hidrolize (posebice o pH vrijednosti). Izotiocijanti obično nastaju pri pH 5-7 Lossenovom pregradnjom, dok nitrili uglavnom nastaju kada se hidroliza provodi u kiselim uvjetima (pH=4). U prisustvu iona željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nitrili su glavni razgradni produkti pri svim pH vrijednostima. Nastajanje tiocijanata je također moguće, a ono ovisi o strukturi bočnog lanca aglukona (npr. alil, benzil) (Mithen i sur., 2000).



Slika 3. Razgradnja glukoziolata

#### 2.1.5. Određivanje ukupne koncentracije glukoziolata

Dob biljke glavna odrednica kvalitativnog i kvantitativnog sastava glukoziolata. Tako sjemenke ili mlade klice brokule (*Brassica oleracea*) mogu sadržavati 70-100  $\mu\text{mol}$  ukupnih glukoziolata po gramu, dok kasne vegetativne biljke reproduktivnog stadija iste sorte obično sadrže samo 1-4  $\mu\text{mol}$  ukupnih glukoziolata po gramu. Okolišni faktori također imaju značajni utjecaj na koncentraciju specifičnih glukoziolata u uzgojnim biljkama i mogu utjecati na raspodjelu glukoziolata u biljnim organima (Fahey i sur., 2001). Na primjer, sadnice rotkvice pokazale su pet puta veću koncentraciju u kotiledonima nego u korijenima, dok je veća koncentracija glukoziolata tijekom berbe bila prisutna u korijenu, a u listovima je nađena mala količina ( $<1 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (Verkerk, i dr., 2009). Glukoziolati daju ekvimolarne količine glukoze nakon hidrolize s mirozinazom i metode temeljene na određivanju enzimatski oslobođene glukoze su se pokazale relativno brzim i jednostavnim za primjenu. Ukupni sadržaj glukoziolata u uzorcima hrane, može se mjeriti određivanjem količine glukoze otpuštene nakon tretmana s enzimom, ali u ukupnu količinu se mora uzeti bilo koja endogena glukoza. Da bi se ovo postiglo, ekstrakcija glukoziolata se može izvesti selektivnim čišćenjem koje eliminira slobodnu glukozu i druge posredne spojeve, nakon čega je moguće kontrolirano enzimsko otpuštanje vezane glukoze (Mithen i sur., 2000).

### 2.1.5. Određivanje pojedinačnih glukozinolata

Tekućinska i plinska kromatografija derivatiziranih glukozinolata je tradicionalna metoda za identificiranje i kvantificiranje pojedinačnih spojeva. Izvorno su glukozinolati ekstrahirani kipućom vodom, derivatizirani i odvojeni izotermnom kromatografijom. Veliki pomak u analizi glukozinolata postignuto je uvođenjem enzimatskedesulfatacije na koloni upotrebom aril sulfataze (Mithen i sur., 2000).

Neki glukozinolati, osobito indoli, su termalno nestabilni i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je postala poželjna metoda za određivanje sastava glukozinolata. Visoka učinkovitost tekućinske kromatografije (HPLC) ima prednost izravnom određivanju glukozinolata. Jedan od glavnih problema u analizi glukozinolata je nedostatak odgovarajućih standarda. Jedini komercijalno dostupni glukozinolati su benzil glukozolatolat (glukotropaeolin) i 2-propenil glukozolatolat (sinigrin) (Mithen i sur., 2000).

### 2.1.6. Mehanizam djelovanja glukozinolata

Glukozinolati i njihovi razgradni produkti djeluju tako što modificiraju enzime Faze I i Faze II koji su vrlo bitni za obranu tijela od kancerogenih tvari. Zbog toga se glukozinolati smatraju indirektnim antioksidansima, jer modificiraju aktivnost kancerogenih tvari tako što utječu na aktivnost enzima metabolizma. Enzimi Faze I (enzimi citokrom P450) povećavaju reaktivnost tvari topljivih u mastima, te se kao posljedica tog procesa formiraju neke reaktivne molekule koje mogu biti toksičnije od polazne molekule. Reakcijama oksidacije i redukcije dolazi do nastajanja vrlo reaktivnih intermedijera koji lako oštećuju DNK, RNK i proteine. Glutation-S-transferaza, aldehid reduktaze, S-metil transferaze, N-acetiltransferaze spadaju u enzime Faze II, te povećavaju topljivost u vodi i izlučivanje tih molekula iz tijela. Najveću pažnju, zbog indukcije enzima II, dobili su izotiocijanati (4-metilsulfinilbutil se smatra najučinkovitijim induktorom). Također *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su da izotiocijanati mogu utjecati na različite stadije nastajanja karcinoma različitim mehanizmima djelovanja uključujući modifikaciju enzima Faze I i Faze II (Kopjar i sur., 2012).

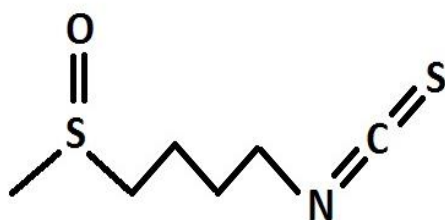
### 2.1.7. Biološko djelovanje glukozinolata

#### a) Na životinje

Kada je u pitanju ishrana životinja, poznato je da hrana za životinje sadrži velike količine uljane repice kao i visoki udio glukozinolata. Glukozinolati sami po sebi nisu odgovorni za negativan utjecaj na zdravlje životinja, ali njihovi razgradni produkti jesu. Toksični utjecaj može se pripisati nastajanju izotiocijanata, tiocijanata, nitrila i 5-viniloksazoldin-2-tiona (goitrin). Prva istraživanja glukozinolata bila su usmjerena na goitrogene učinke razgradnih produkata glukozinolata kod životinja hranjenih sačmom uljane repice. Goitrogeni spojevi inhibiraju funkciju štitnjače uzrokujući njenu atrofiju i gušavost. Kako bi se spriječilo nastajanje razgradnih produkata pokušava se inaktivirati mirozinaza kroz predtretman repice prije same proizvodnje ulja. Takva kontrola sadržaja razgradnih produkata je djelomična jer se razgradnja odvija i pomoću bakterijske tioglukozidaze koja se nalazi u probavnom traktu. Danas se za ishranu životinja uzgajaju uglavnom sorte uljane repice s vrlo niskim sadržajem glukozinolata (Kopjar i sur., 2012).

#### b) Na ljude

Ljudska prehrana nudi veću i raznoliku skupinu bioaktivnih biljaka i ljudi često ne shvaćaju da su mnogi lijekovi izvedeni iz spojeva koji su izvorno bili otkriveni u biljnoj hrani. Predstavnici Brassicaceae kao što su prokulica, kupus, brokula i cvjetača od posebne su važnosti. Brojne epidemiološke studije pokazuju da Brassica povrće općenito, a posebno brokula, štite ljude od raka jer su bogati izvori glukozinolata te posjeduju visok sadržaj flavonoida, vitamina i mineralnih hranjivih tvari. Brojna istraživanja brokule usredotočena su na njezinu bioaktivnu komponentu sulforafan (Moreno i sur., 2006). Sulforafan (Slika 4) je aktivan biljni spoj koji se nalazi u porodici krstašica, a ima snažno preventivno djelovanje u sprječavanju raka, promiče zdravlje srca, usporava starenje i djeluje kao snažan nootropik, zaustavljajući razne upalne čimbenike u tijelu, između ostalog. Sulforafan spada u skupinu biljnih tvari pod nazivom izotiocijanati koji imaju visoku biološku aktivnost. Sulforafan je najjači pokretač detoksifikacijskih enzima jetre i djeluje zaštitno na zdrava tkiva. 7 do 30 mg ove tvari na dan dnevno poboljšava funkciju mozga što se očituje u boljoj društvenoj interakciji i verbalnoj komunikaciji, te smanjenju ponavljajućih ponašanja kod osoba s autizmom. Slično djelovanje ima i kod osoba sa shizofrenijom (Šajina, 2014).



Slika 4. Struktura sulforafana

Tijekom posljednjih 20 godina dobivaju se uvjerljivi dokazi koji povezuju povećanu potrošnju voća i povrća, osobito krstašica, sa smanjenjem učestalosti mnogih vrsta raka. Unos od oko dvije porcije po danu križnog povrća može dovesti do čak 50 % smanjenja relativnog rizika od određenih vrsta raka. Barem se neka od kemoterapijskih aktivnosti ovih povrća široko vjeruje da su posljedica njihovog sadržaja manjih dijetnih komponenti kao što su glukozinolati. Određeni glukozinolati induciraju enzime faze II detoksikacije kod sisavaca. Enzim mirozinaza - aktiviran u oštećenim biljnim tkivima i prisutan u mikroflori ljudskog probavnog trakta - pretvara ove glukozinolate na brojne spojeve uključujući tiocijanate, nitrile i izotiocijanate. Nekoliko primjera ovih studija za sprečavanje raka slijedi:

(1) Zhang (1992) i Prester (1993) dokazali su da sulforafan podiže razinu enzima faze II sisavaca pomoću aktivacije transkripcije posredovanom s ARE (Antioxidant Response Element). Sulforaphane smanjuje incidenciju, odgađa izgled i smanjuje veličinu tumora u tumorskom modelu tumora štakora, služi kao indirektni antioksidant, vrši selektivne citostatske i citotoksičke učinke na stanice ljudskih karcinoma debelog crijeva invitro, inhibira citokrom P450, a posebno CYP2E1 i inducira zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu u ljudskim stanicama raka debelog crijeva invitro.

(2) Istraživanjem Morse-a i suradnika (1993) pokazalo se da fenetil izotiocijanat inhibira indukciju raka pluća i jednjaka kod modela štakorskog i mišjeg tumora. Ti učinci dobro su povezani sa smanjenjem formiranja adukta karcinogena i DNA i snažno predloženo inhibiranje citokroma P450 kao mehanizma djelovanja. Analogni učinak na metabolizam NNK opažen je kod pušača koji su konzumirali potočarku, kao i značajno povećanje glukuronidacije nikotinskih metabolita, što upućuje na indukciju fuzijskog izotiocijanata u ljudskom djelovanju enzima detoksikacijske faze II UDP-glukuronoze (Fahey i sur., 2001).

Brassica povrće sadrži glukozinolate, čiji su produkti metabolizma snažni modulatori enzima koji metaboliziraju ksenobiotik koji štite DNA od oštećenja. Velike varijacije sadržaja i sastava glukozinolata kod tih vrsta prikazano je u Tablici 2. Visoki unos crvenog povrća povezan je s smanjenim rizikom od raka, osobito pluća i onih gastrointestinalnog trakta. Epidemiološka literatura pruža skromnu potporu hipotezi da visoki unos Brassica povrća smanjuje rizik od raka prostate. Rezultati provedenih *in vitro* i *in vivo* studija pokazali su da izotiocijanati koji nastaju razgradnjom glukozinolata utječu na mnoge stupnjeve razvoja raka, uključujući i modulaciju faza I i II detoksikacija enzima. Oni funkcioniraju kao direktni ili kao indirektni antioksidansi preko indukcije enzima faze II, moduliraju signalizaciju stanica, indukciju apoptoze, kontrolu staničnog ciklusa i smanjenje *Helicobacter* infekcija (Moreno i sur., 2006). No s obzirom na istraživanja o negativnom utjecaju glukozinolata na zdravlje životinja, potrebno je i kod ljudi voditi računa o dozama glukozinolata i njihovih razgradnih produkata. Na primjer, indol-3-karbinol može i inhibirati i potaknuti kancerogenezu. Također je utvrđeno i da benzil i alilizotiocijanati imaju i antikancerogeno djelovanje, ali i genotoksično i potencijalno kancerogeno djelovanje (Kopjar i sur., 2012).

Tablica 2. Koncentracija glukozinolata prisutnih u povrću (Verkerk i sur., 2009)

Vrsta	Glukozinolati	Količina (u 100 g)
<b>Repa (<i>Brassica rapa</i>)</b>	Ukupni	53,3 mg
	Alifatski: <i>Progoitrin</i>	0,1-20,5 mg
	Aromatski	15,1 mg
	Indolni	10,2 mg
<b>Rotkvica (<i>Raphanus sativus</i>)</b>	Ukupni	87,6-332,8 mg
	Alifatski: <i>Dehidroerucin</i> <i>Glukorafanin</i>	56,1-310 mg 1,6-15 mg
<b>Crveni kupus (<i>Brassica oleracea</i>)</b>	Ukupni	30,1-98,3 mg
	Alifatski: <i>Glukoraganin</i> <i>Sinigrin</i> <i>Glukoiberin</i>	4-18,2mg 3-16.7 mg 4-13,6 mg
	Indolni	11,7-35,5 mg
<b>Kelj (<i>Brassica oleracea convar</i>)</b>	Ukupni	61,4-72,2 mg
	Alifatski: <i>Glukoiberin</i> <i>Sinigrin</i>	10,4-21,2 mg 15,5-18,6 mg
	Indolni	18-43,3 mg
<b>Cvjetača (<i>Brassica oleracea var. botrytis</i>)</b>	Ukupni	19,5-42,6 mg
	Alifatski: <i>Glukoibervirin</i> <i>Sinigrin</i> <i>Glukoiberin</i>	0,6-2,9 mg 1,4-5,9 mg 0,5-6,6 mg
	Indolni	15,2-24,9 mg

#### 2.1.8. Utjecaj procesiranja na glukozinolate

Povrće iz porodice Brassicaceae neizbježno se podvrgava stresu tijekom žetve, obrade i kuhanja prije konzumacije. Ti raznovrsni stresovi kojim se biljka izlaže utječu na količinu razgradnih produkata glukozinolata. Tako da bilo koji proces koji narušava integritet stanice dovodi do degradacije glukozinolata. Prije konzumiranja, Brassica biljke, se obično sjeckaju. Rezanje svježeg biljnog tkiva stvara optimalne uvjete za mirozinazu tako da se može očekivati visok

stupanj glukozinolne hidrolize. Proces koji ima najviše utjecaja na sadržaj kako glukozinolata tako i drugih 'fitokemikalija' je kuhanje. Učinku kuhanja na glukozinolate posvećena je relativno veliku pažnju. Tijekom kuhanja sadržaj glukozinolata se obično znatno smanjuje. Procesi koji se odvijaju tijekom kuhanja su: inaktivacija mirozinaze te degradacija glukozinolata i njihovih razgradnih produkata zbog djelovanja topline. Kuhanjem se smanjuje udio glukozinolata za oko  $30 \pm 60$  %, ovisno o metodi. Također toplinskom degradacijom i ispiranjem dolazi do gubitka glukozinolata. Rezanje nekih vrsta povrća iz porodice Brassicaceae i skladištenje na zraku uzrokovali su povećanje sadržaja glukozinolata, posebice indolglukozinolata, ali ti rezultati su pokazali velike varijacije ovisno o načinu tretiranja (Kopjar i sur., 2012).

#### 2.1.9. Biološka dostupnost

Razumijevanje i poznavanje biodostupnosti glukozinolata bitno je za razumijevanje njihovog mehanizma djelovanja. Mnoge tvari da bi dobile određenu aktivnost moraju doći do ciljanog tkiva, tj. biti biodostupne u tijelu. Prvi važan korak biodostupnosti je oslobađanje aktivnog sastojka. Ako je mirozinaza prisutna u hrani onda se hidroliza glukozinolata odvija u tankom crijevu. Ukoliko je ista deaktivirana prilikom kuhanja onda se hidroliza odvija u debelom crijevu uz pomoć bakterijskih enzima (Mithen i sur., 2000).



## 2.2.GLUKOZINOLATI U ULJANOJ REPICI

Prisutnost glukozinolata u sjemenu uljane repice značajno smanjuju kvalitetu pogače koja zaostaje nakon izdvajanja ulja. Razlog tome je prisustvo određenih vrsta glukozinolata koji degradiraju do goitrogenih proizvoda. Najznačajniji takav je oksazolidin-2-tion 2-hidroksi-3-butenil glukozinolat ('progoitrin') koji se nakuplja u sjemenu uljane repice. Osim izmjena veličine, strukture i funkcija štitnjače, hranjenje repicom može dovesti do oštećenja jetre i bubrega. Točan uzrok tome nije posve razumljiv, ali može biti povezan ili s prisutnošću glukozinolata u nativnom stanju ili njihova razgradnja do nitrila u probavnom traktu (Mithen i sur., 2000).

### 2.2.1. Goitrogeni i antinutritivni učinak- razvoj 00 sorti

Hidroliza  $\beta$ -hidroksialkenil glukozinolata (npr. progoitrin i epi-progolijin), dovodi do  $\beta$ -hidroksialkenil izotiocijanata. Ti spojevi cikliziraju se u oksazolidin-2-tionide koji mogu imati goitrogene učinke kod sisavaca - prvo zapaženi kod zečeva od strane Webster i Chesney (1930). Nastojanja da se izbjegne goitrogenost repice (*Brassica napus*), jednog od najznačajnijih usjeva u uljarstvu, dovela su do vrlo uspješnog razvoja uljarica "Canola" (00 sorta). Canola razvijena je 1970-ih programom uzgoja biljaka namijenjen razvoju sorata uljane repice s niskom razinom glukozinolata i eruične kiseline. Oznaka "Canola" nije specifična, niti se odnosi ni na jednu vrstu. Sada se uzgajaju dvije vrste Canola: kratkih sezona, žutog sjemena, poljska (*Brassica rapa*) i druga vrsta dugih sezona, crnog sjemena (*Brassica napus*). Canola sjeme sadrži oko 40 % ulja i po propisima ovo ulje mora sadržavati <2 % eruka masne kiseline. Pogača, kojom se hrane životinje, mora imati <30  $\mu$ mol glukozinolata po gramu obroka.

### 2.2.2. Metode uklanjanja glukozinolata

Isprobane su različite metode kako bi se uklonili glukozinolati ili bi se smanjio njihov sadržaj u svrhu minimaliziranja štetnog utjecaja na zdravlje životinja. Jedne od takvih metoda su: mikronizacija, ekstrudiranje, tretman vodom i otopinom metala, fermentacija čvrstog ili polučvrstog supstrata i tretman toplinom (Kokić i Palić, 2012).

### *Mikronizacija i ekstrudiranje*

Proces mikronizacije sačme uljane repice u trajanju od 90 sekundi na 195°C je efikasan u smanjenju sadržaja glukozinolata. Razgradnja glukozinolata se povećala s povećanom vlagom i razdobljem izlaganja mikrovalnom grijanju (Tripathi i Mishra, 2007). Mikronizacijom je uklonjeno 370  $\mu\text{mol mmol}^{-1}$  ukupnih glukozinolata, svi izotiocijanati, a ostali su tragovi oksazolidintiona. Ekstrudiranje sačme uljane repice je efikasnije u uklanjanju glukozinolata od mikronizacije. Postupak suhe ekstruzije snizio je sadržaj ukupnih glukozinolata u rasponu 10–15 % (u rasponu od 193-428  $\text{mol mmol}^{-1}$ ) (Tripathi i Mishra, 2007). Vlažno ekstrudiranje sačme uljane repice sa visokim sadržajem glukozinolata uz upotrebu amonijaka (temperatura od 150°C, brzina obrtaja puža 200 obrt/min, koncentracija amonijaka 2 %), dovelo je do značajnog smanjenja (670  $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ ) u ukupnom sadržaju glukozinolata (Kokić i Palić, 2012).

### *Tretman vodom i otopinom metala*

Tretiranje sačme uljane repice sa bakar sulfatom bilo je efikasno u smanjenju ukupnih glukozinolata. 1 kg sačme uljane repice natopljen u 2 litre otopine bakar sulfata i sušeno na 60°C. Smanjenje glukozinolata bio je u iznosu od 900  $\mu\text{mol mmol}^{-1}$  (Kokić i Palić, 2012).

### *Fermentacija čvrstog ili polučvrstog supstrata („Solid-state“ fermentacija)*

Fermentacija čvrstog ili polučvrstog supstrata sačme uljane repice (sterilizirana na 121 °C u trajanju od 15 minuta; sačma:voda u odnosu 1:3, na 25°C pod aerobnim uvjetima, 10 dana) dovela je do inaktivacije mirozinaze i smanjenja ukupnih glukozinolata od 431  $\mu\text{mol mmol}^{-1}$  (Vig i Walia, 2001). Do kompletne degradacije glukozinolata došlo je poslije 60-96 h (Kokić i Palić, 2012).

### *Utjecaj topline*

Utjecaj topline utječe na smanjenje sadržaja glukozinolata u sačmi uljane repice. Vlažno zagrijavanje pod pritiskom je efikasnije od suhog zagrijavanja. Za prehranu životinja, zagrijavanje je ograničeno 30 minuta na 100°C. Ovaj nivo zagrijavanja smanjuje koncentraciju ukupnih glukozinolata za 500  $\mu\text{mol mmol}^{-1}$  i održava kvalitetu proteina. Rezultati takvih tretmana na smanjenje glukozinolata su promjenjivi, što može da bude posljedica različite osjetljivosti različitih glukozinolata. 4-hidroksiglukobrasicin je osjetljiviji na djelovanje topline nego alifatski glukozinolati progoitrin i glukonapin (Kokić i Palić, 2012).

### 2.3.KRIOGENO MLJEVENJE

Kriogenija je znanost o proučavanju materijala pri niskim temperaturama prilikom kojih se svojstva materijala značajno mijenjaju, te važna tehnika koja je u prošlosti dovela do nekih glavnih otkrića. Riječ "kriogenika" dolazi od grčke riječi "kryos", što znači hladno (Kalia, 2010).

Može se reći da je kriogenija grana inženjerstva u kojoj se proizvodi i primjenjuje niska temperatura od apsolutne nule (-273,15° C) do -150 °C (Goswami, 2017). Dokazano je da je ova tehnika učinkovita u poboljšanju fizičkih i mehaničkih svojstava raznih materijala (Kalia, 2010). No, kao i svaka operacija, osim prednosti ima i nedostataka. Međutim, razumnom aplikacijom mogu se smanjiti nedostaci, te maksimizirati korist (Goswami, 2017).

Kriogeno (krio) mljevenje je tehnološki proces kojim se melje određena sirovina na temperaturama znatno nižim od 0 °C pri čemu se uzorak hladi kriogenicima, tj. kriogenim tekućinama, kao što su tekući helij, tekući neon, tekući argon, tekući kisik ili tekućim dušikom do oko -200 °C i čini ga lomljivijim i sklonijim fragmentaciji. Tekući dušik ima prednost pred ostalima jer je inertan (Mamilović, 2018). Tekući dušik cirkulira kroz sustav i kontinuirano se nadopunjuje iz sustava za automatsko popunjavanje u točnom iznosu koji je potreban za održavanje temperature na -196 °C. Snažno utjecaj loptica za mljevenje rezultira savršenom učinkovitosti mljevenja. Sustav automatsko popunjavanje izbjegava izravni kontakt s tekućim dušikom i čini takvo mljevenje vrlo sigurnim (Kalia, 2010). Prednost kriogenog mljevenja je to što se boja i druga svojstva proizvoda neće mijenjati, njihov okus i nutritivna vrijednost neće biti izgubljeni (Goswami, 2017). Kriogenim mljevenjem moguće je postići veličinu čestica od 50 µm, što je mljevenjem u okolišnim uvjetima moguće postići samo u nekoliko ponovljenih mljevenja (Mondragón i sur., 2013).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1.MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci

Kao sirovina u ovom radu korišteno je sjeme uljane repice uzgojeno 2016./2017. godine na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za određivanje glukozinolata korištena je pogača uljane repice koja je dobivena dvostrukim prešanjem na pužnoj preši u laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Prije izdvajanja ulja prešanjem, sjeme je kondicionirano kroz 30 minuta na  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  pomoću kondicionera. Dobivena pogača samljevena je na mlinu s diskovima i do daljnjih analiza skladištena na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.2. Reagensi

Korišteni reagensi bili su priznate analitičke sposobnosti, HPLC stupnja čistoće.

**Metanol**- 70% otopina (J. T. Baker)

**Natrijev acetat**-  $0,02\text{ mol L}^{-1}$  pri pH 4,0

**Natrijev acetat**-  $0,2\text{ mol L}^{-1}$  otopina

**Imidazol**-  $6\text{ mol L}^{-1}$  otopina (Sigma-Aldrich)

**Interni standard**-sinigrinmonohidrat (Sigma-Aldrich; kalijev alilglukozolatmonohidrat,  $M_r=415,49$ ),  $6\text{ mol L}^{-1}$  otopina (otopljen u mravljoj kiselini)

### 3.2.METODE RADA

#### 3.2.1. Priprema uzorka kriomljevenjem

Za potrebe istraživanja izvagano je 8 grama uzorka pogače uljane repice koje je mljeveno kugličnim mlinom CryoMill, sa i bez hlađenja tekućim dušikom uz pomoć 12 kuglica promjera 10 mm. Mljevenje se radilo dvije, četiri, osam i dvanaest minuta. Dobilo se 9 uzoraka (Tablica 3), četiri bez hlađenja i četiri sa hlađenjem, te kontrolni uzorak pogače uljane repice koji nije bio dodatno usitnjen. Nakon usitnjavanja uzorci su skladišteni u zamrzivaču na -18 °C.

Tablica 3. Kriogeno mljevenje uzorka (Mamilović, 2018)

OZNAKA	KRIOGENO MLJEVENJE (Da/Ne)	PRET-HLAĐENJE	TRAJANJE CIKLUSA MLJEVENJA (min)
P (kontrolni)	Ne	/	0
2BH	Ne	/	2
4BH	Ne	/	4
8BH	Ne	/	8
12BH	Ne	/	12
2H	Da	Da	2
4H	Da	Da	4
8H	Da	Da	8
12H	Da	da	12

CryoMill (Retsch + Apollo, Haan, Njemačka) (Slika 5), je uređaj koji provodi kriogeno mljevenje koji je posebno dizajniran za mljevenje na vrlo niskim temperaturama. Spada u skupinu kugličnih mlinova koji se inače koriste za fino usitnjavanje veličine čestica tvrdih i krhkih materijala. Frekvencija kugličnog mlina je bila 30 Hz, a tlak dušika na izlazu spremnika je održavan na 1,3 bara radi optimizacije procesa (Mamilović, 2018).



Slika 5. Vibracioni kriomlin + spremnik za tekući dušik

### 3.2.2. Određivanje sastava i koncentracije glukozinolata tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti

#### 3.2.2.1. Ekstrakcija glukozinolata

Ekstrakcija je provedena po protokolu navedenom u metodi ISO 9167-1:2011 za detekciju sadržaja različitih glukozinolata u uljanoj repici. Kao interni standard koristio se sinigrinmonohidrat.

U dvije epruvete označene s A i B preneseno je po 200 mg izvagane na točnost od 0,1 mg, pripremljenog ispitivanog uzorka. Epruvete su postavljene u vodenu kupelj na 75 °C i ostavljene 1 minutu da se uzorak ugrije. Nakon toga, u svaku epruvetu dodalo se 2 mL ključale otopine 70%-tnog metanola te se zatim odmah u epruvetu A dodalo 200  $\mu\text{l}$  5  $\text{mmol L}^{-1}$  otopine internog standarda, a u epruvetu B 200  $\mu\text{l}$  20  $\text{mmol L}^{-1}$  otopine internog standarda. Grijanje se nastavilo na 75 °C sljedećih 10 minuta, protresajući epruvete u jednakim intervalima (svakih 2 minute). Sadržaj svake tube pomiješao se i centrifugirao na akceleraciji od 5000g- 3 minute. Supernatant tekućine iz svake tube prenesen je na dvije druge epruvete s oznakom A' i B'.

Dvjema tubama koje sadrže čvrsti ostatak dodalo se 2 mL ključale otopine metanola i ponovno se zagrijavalo 10 minuta u vodenoj kupelji na 75°C, protresajući epruvete u jednakim intervalima (svako 2 minute). Zatim se centrifugiralo 3 minute i dodao supernatant

tekućine iz dvije epruvete u odgovarajući supernatant tekućina. Volumeni kombiniranih ekstrakta prilagodili se na približno 5 mL sa vodom te se promiješalo. Ovi ekstrakti se mogu čuvati 2 tjedna u mraku u zamrzivaču na  $-18^{\circ}\text{C}$  (ISO 9167, 2011).

#### 3.2.2.2. Priprema sulfataze (*Helix pomatia*):

U odmjernu tikvicu od 10 mL otopi se 75 mg enzima sulfataze u 40%-tnom etanolu i ostavi stajati na sobnoj temperaturi 10 minuta. Slijedi centrifugiranje pri 5000 okretaja u minuti kroz 15 minuta pri čemu se odvoji supernatant od taloga. Iz supernatanta se uz pomoć 96%-tnog etanola (da se dobije ukupna koncentracija 70 %-tnog etanola) istaloži sulfataza te se ponovnim centrifugiranjem odvoje talog (sulfataza) iz supernatanta. Talog se resuspendira u 5 mL deionizirane  $\text{H}_2\text{O}$ . Te su razdijeljeni po 1 mL u svaku vijalicu. Razrijeđena otopina čuva se pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.2.3. Pročišćavanje i enzimska desulfatacija ekstrakata

Pročišćavanje i enzimska desulfatacija odvijalo se na ionsko izmjenjivačkim smolama. Kolona se postavila na postolje manifolda (J.T.Baker, spe-12G). 0,6 mL dobro izmiješane suspenzije ionske izmjenjivačke smole prenijelo se na svaku kolonu i pustilo da se slegne. Pipete su isprane s 2 mL imidazol formata i dva puta s 1 mL vode. 1 mL ekstrakta je preneseno radi pripremanja kolona bez ometanja površine smole i pušteno da se isprazni. Dodano je dva puta po 1 mL pufera natrijevog acetata  $0,02 \text{ mol}^{-1}$ , dopuštajući da se pufer isprazni nakon svakog dodavanja. Zatim je koloni dodano 75  $\mu\text{L}$  razrijeđene otopine pročišćene sulfataze te ostavljeno preko noći na sobnoj temperaturi (slika 6).



Slika 6. Priprema kolona ionskih izmjenjivača

Postaviti epruvetu ispod kolone i ostavi se preko noći da sakupi eluat. Sutradan, eluat desulfoglukosinolat dobiva se sa dvije porcije vode od 1 ml, dopuštajući vodu da se isprazni nakon svakog dodavanja. Dobro promiješati eluat. Ako se odmah ne koristi za kromatografiju, onda ga skladištiti u zamrzivaču u tami na  $-18^{\circ}\text{C}$  do tjedan dana.

#### *3.2.2.4. Određivanje glukozinolata*

Određivanje glukozinolata radi se koristeći obrnutu fazu HPLC-a (Agilent Technologies serija 1200 s binarnom pumpom, autosamplerom i DAD detektorom, Santa Clara, SAD) sa gradijentom eluiranja i detekcijom ultraljubičastog zračenja.

Najprije prilagoditi kromatografiju kako bi se dobilo:

- brzina protoka mobilne faze, ovisno o prirodi kolone, općenito reda od  $1 \text{ mL min}^{-1}$
- temperatura kolone od  $30^{\circ}\text{C}$
- visina duljina detekcije 229 nm
- količina injektiranog uzorka-  $5 \mu\text{L}$

Gradijent: Mobilna faza A – voda, pročišćena prolazom kroz filtere malih pora pod djelovanjem vakuuma

Mobilna faza B – acetonitril, 20 %-tna otopina u pročišćenoj vodi.

Eluacijski gradijent koji odgovara upotrijebljenoj koloni Lichrosorb RP18 kolona,  $\leq 5 \mu\text{m}$  (150 mm x 4,6 mm):

- Propustiti 100 % eluenta (sredstvo za ispiranje) A 1 minutu.
- Primijeni linearni gradijent ispiranja kroz 20 min dok se ne dobije 0 % eluenta A i 100 % eluenta B
- Primijeni linearni gradijent ispiranja kroz 5 min dok se ne dobije 100 % eluenta A i 0 % eluenta B
- Propusti 100 % eluenta A 5 min da se uspostavi ravnoteža



### 3.2.2.5. Identifikacija glukozinolata pomoću UV detektora

Za UV detekciju polifenola korišten je DAD detektor (Agilent Technologies 1200 Series (Slika 7)). Tijekom cijelog vremena trajanja analize snimani su UV spektri na 229 nm.



Slika 7. Prikaz DAD detektora (Agilent Technologies)

### 3.2.2.6. Određivanje glukozinolata

Nakon što su glukozinolati prikazani u obliku pikova, u razmatranje su uzeta retencijska vremena (RT) i površina pikova (A). Količina svakog glukozinolata, izražena je u mikromolima po gramu suhe tvari proizvoda, jednako je:

$$\frac{A_g}{A_s} \times \frac{n}{m} \times K_g \times \frac{100}{100 - w}, \text{ gdje je:}$$

$A_g$  = pik (vrh) područja, jedinice integratora, koji odgovara desulfoglukosinolatu

$A_s$  = pik (vrh) područja, jedinice integratora, koji odgovara desulfosinigrinu

$K_g$  = faktor odgovora za desulfoglukozinolat (Tablica 4)

$m$  = masa uzorka, u gramima

$n$  = količina internog standarda, u mikromolima (za sinigrin monohidrat 5 mmol L<sup>-1</sup> iznosi 1,0416 μmol, a za sinigrin monohidrat 20 mmol L<sup>-1</sup> iznosi 4,1916 μmol)

$w$  = sadržaj vlage i hlapljivih tvari izražen u postotku mase ispitivanog uzorka

Tablica 4. Faktor odgovora za određeni desulfoglukosinolat

Desulfoglukosinolat	Faktor odgovora (Kg)
Desulfoglukoiberin	1,07
Desulfoprogoitrin	1,09
Desulfoepi-progoitrin	1,09
Desulfosinigrin	1
Desulfoglukoaraphanin	1,07
Desulfoglukonapoleiferin	1
Desulfoglukoalisin	1,07
Desulfoglukonapin	1,11
Desulfo-4-hidroksiglukobrasicin	0,28
Desulfoglukobrasicanapin	1,15
Desulfoglukotropaeolin	0,95
Desulfoglukobrasicin	0,29
Desulfoglukonasturtin	0,95
Desulfo-4-metoksiglukobrasicin	0,25
Desulfoglukobrasicin	0,2
Drugi glukozinolati	1

### 3.2.3. Validacija metode

#### ***Definicija metode - svrha i namjena***

Provedena je validacija metode ISO 9167-1:2011 koja određuje metodu za detekciju sadržaja različitih glukozinolata u uljanoj repici koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti. U svrhu validacije metode, ispitana je selektivnost, linearnost, točnosti i preciznost.

#### ***Parametri validacije***

##### Selektivnost:

Selektivnost je mogućnost metode da pod određenim uvjetima točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata koje možemo očekivati u matriksu uzorka. Selektivnost metode određena je pregledom kromatograma glukozinolata koja je analizirana pod zadanim uvjetima metode.

### Linearnost:

Linearnost se određuje mjerenjem odaziva metode na različite poznate koncentracije referencijskog materijala. Test linearnosti obično se provodi na pet koncentracijskih razina u željenome radnom području metode. Rezultati se procjenjuju matematički i grafički. U takvu svrhu pripremljene su dvije koncentracije internog standarda sinigrina  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  i  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ . Zatim se pripremi 5 kolona od kojih se u dvije stavila koncentracija internog standarda od  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  i to 100 i 200 mikrolitara, te u tri koncentracija od  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  volumena 100, 200 i 300 mikrolitara. Linearnost metode izražena je baždarnim dijagramom koji opisuje odnos između koncentracije glukozinolata i njihovih površina.

### Preciznost:

Preciznost se može razmotriti na tri razine: ponovljivost, srednja preciznost (robusnost) i reproducibilnost. Prilikom obrade rezultata određena je ponovljivost i preciznost metode. Ponovljivost metode određena je višestrukim ispitivanjem uzorka pri čemu su mjerenja provedena u istom danu, s ciljem održavanja istih uvjeta mjerenja. Obradeni su rezultati te je izračunata srednja vrijednost i relativna standardna devijacija vrijednosti.

### Točnost:

Točnost metode predstavlja bliskost rezultata dobivenih ovom metodom u odnosu na pravu vrijednost. Rezultat kojim se procjenjuje točnost metode izražava se kao postotak iskorištenja (recovery). Za određivanje točnosti koristila se certificirana uljana repica ERM-European Reference Materials sa Instituta za određivanje materijala i mjerenja (Institute for Reference Materials and Measurements), čiji su parametri prikazani u tablici 5. Europski referentni materijal ERM<sup>®</sup> -BC190 izvorno je certificiran kao BCR-190R. Proizvedeno je i certificirano u skladu s načelima utvrđenima u tehničkim smjernicama.

Tablica 5. Parametri certificirane uljane repice

ULJANA REPICA (RAPESEED/COLZA)		
PARAMETAR	CERTIFICIRANA VRIJEDNOST <sup>1</sup>	NEPOUZDANOST <sup>2</sup>
Ukupni glukozinolati (GSL)	$23 \text{ mmol kg}^{-1}$	$4 \text{ mm kg}^{-1}$
Sumpor (S)	$4,72 \text{ g kg}^{-1}$	$0,22 \text{ g kg}^{-1}$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Uljana repica jedna je od najznačajnijih uljarica u svijetu i prvenstveno se uzgaja za proizvodnju ulja. Ulje uljane repice koristi se u prehrani, ali i u tehničke svrhe kao biogorivo, za proizvodnju maziva i slično. Nusproizvod proizvodnje repičinog ulja, ovisno o procesu proizvodnje, su pogača ili sačma koje se prvenstveno koriste za ishranu stoke. No takva uporaba je ograničena prisutnošću antinutritivnih komponenti kao što su glukozinolati koji utječu na nutritivnu vrijednost pogače. Zato se rade istraživanja kako bi se koncentracija glukozinolata smanjila do prihvatljivog nivoa. Tri glavna glukozinolata uljane repice su glukonapin, glukobrasikanapin i progoitrin čijom razgradnjom nastaju raznovrsni hlapljivi spojevi (Vermorel i sur., 1986).

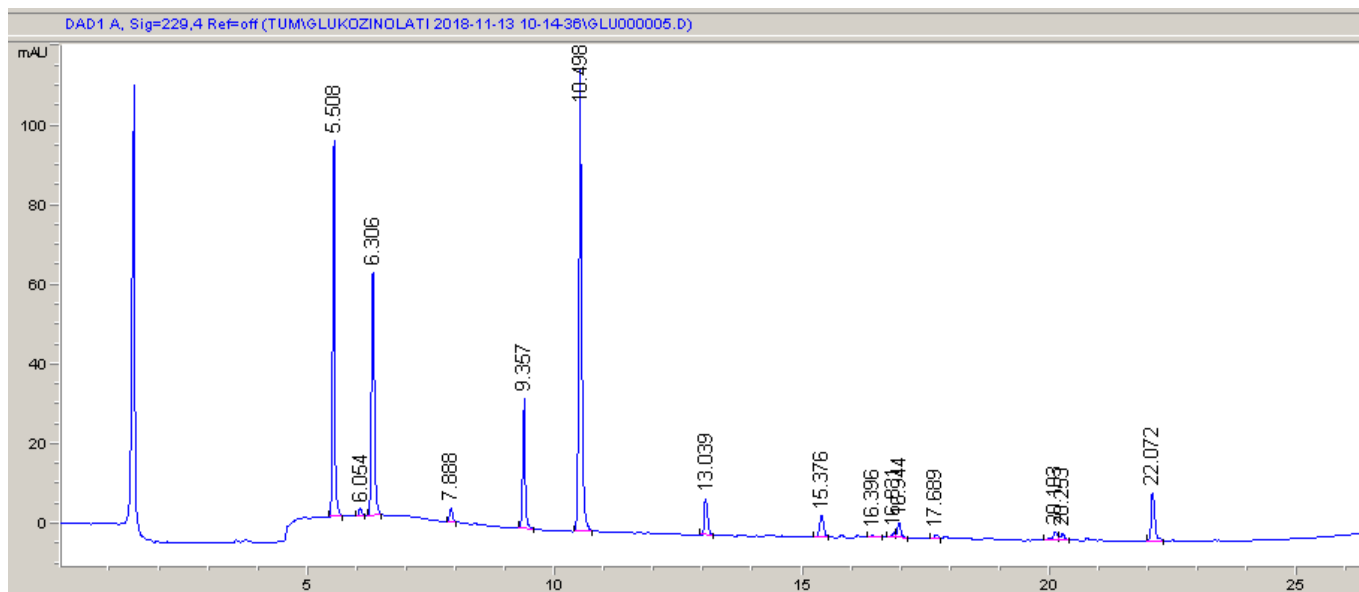
U ovom radu najprije određena je metoda kojom se istraživala koncentracija ukupnih i pojedinačnih glukozinolata. Također cilj ovog rada bio je vidjeti utjecaj dodatne obrade uljane repice na sastav i udio glukozinolata. U tu svrhu korišteno je kriogeno mljevenje s tekućim dušikom.

### **4.1.VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE GLUKOZINOLATA U ULJANOJ REPICI HPLC-METODOM**

Za identifikaciju i određivanje glukozinolata u uljanoj repici izabrana je metoda za detekciju sadržaja različitih glukozinolata u uljanoj repici koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti koja je opisana u normi ISO 9167-1:2011.

Analitičke metode trebaju biti validirane kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. To je postupak kojim se dokazuje da odabrana metoda služi svrsi koja joj je namijenjena. U svrhu validacije metode za određivanje glukozinolata u uljanoj repici ispitani su selektivnost, linearnost, točnost i preciznost.

Selektivnost je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja (Velagić, 2016.). Dobra selektivnost metode postignuta je optimiranjem parametra kromatografije i parametara detektora. Pregledom kromatograma (slika 8) može se utvrditi vrlo dobro razdvajanje pikova, te izlazak standarda uvijek u isto vrijeme.



Slika 8. Kromatogram pikova glukozinolata

Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Određuje se izradom kalibracijskog pravca u osam točaka. Iz konstruiranog pravca izračuna se koeficijent korelacije. Pripremljene su otopine sa dvije različite koncentracije standarda u volumenima od 100, 200 i 300  $\mu\text{L}$ , koje su injektirane dva puta i propuštene kroz kolonu. Na kromatogramu zabilježena su retencijska vremena i površine pikova (tablica 6).

Koncentracija sinigrina dobivena je iz mase sinigrina i molarne mase, gdje je:

$$m(\text{sinigrin monohidrat } 5 \text{ mmol L}^{-1}) = 0,0207 \text{ g}$$

$$M(\text{sinigrin monohidrat}) = 397,46 \text{ g mol}^{-1}$$

$$n(\text{sinigrin monohidrat } 5 \text{ mmol L}^{-1}) = m / M = 52,08 \text{ } \mu\text{mol}$$

Budući da je sinigrin pripremljen u volumetrijskoj tikvici od 10 mL slijedi da je koncentracija jednaka:

$$c = 52,08 \text{ } \mu\text{mol} / 10 \text{ mL} = 5,208 \text{ mmol L}^{-1}$$

Isti izračun vrijedi za sinigrin monohidrat 20  $\text{mmol L}^{-1}$  gdje je dodana masa jednaka  $m = 0,0833 \text{ g}$ .

Kada se te koncentracije i volumen od 10 mL stave u omjer sa volumenima od 100, 200 i 300  $\mu\text{L}$  dobiju se koncentracije sinigrina u dodanim volumenima koji su korišteni za prikazivanje grafa linearnosti (tablica 7).

Tablica 6. Retencijsko vrijeme i površina pika sinigrina

Koncentracija sinigrina	Volumen	Retencijsko vrijeme (RT)	Površina pika (A)
5,208 mmol L <sup>-1</sup>	100 μL	6,275	92,4
5,208 mmol L <sup>-1</sup>	100 μL	6,32	92,8
5,208 mmol L <sup>-1</sup>	200 μL	6,269	295,1
5,208 mmol L <sup>-1</sup>	200 μL	6,267	294,6
20,958 mmol L <sup>-1</sup>	100 μL	6,636	699
20,958 mmol L <sup>-1</sup>	100 μL	6,273	668,1
20,958 mmol L <sup>-1</sup>	200 μL	6,495	1175,2
20,958 mmol L <sup>-1</sup>	300 μL	6,96	1530,2
20,958 mmol L <sup>-1</sup>	300 μL	6,283	1403,3

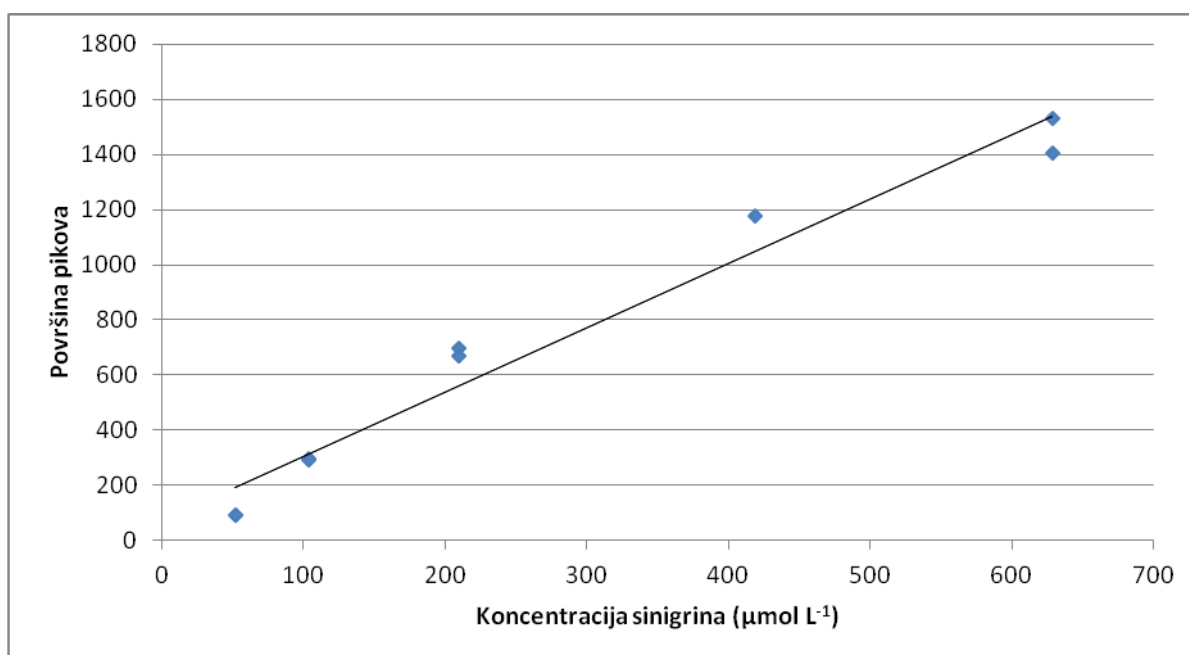
Tablica 7. Koncentracija standarda

Volumen	Koncentracija sinigrina (μmol L <sup>-1</sup> )
100 μL	52,08
100 μL	52,08
200 μL	104,16
200 μL	104,16
100 μL	209,58
100 μL	209,58
200 μL	419,16
300 μL	628,74
300 μL	628,74

Kalibracijska krivulja prikazuje ovisnost površina pikova internog standarda i njegovih koncentracija dobivenih u kromatogramima (slika 9). Jednadžba pravca dobivena je linearnom regresijom te je prikazana u tablici 8. Područje metode u kojem je određena linearnost za sinigrin bilo je u rasponu koncentracija od 52,08 μmol L<sup>-1</sup> do 628,74 μmol L<sup>-1</sup> (tablica 7). Iz grafičkog prikaza ovisnosti površine o koncentraciji pripremljene otopine sinigrina linearnost se najbolje pokazala u točkama 104,16 μmol L<sup>-1</sup> i 628,74 μmol L<sup>-1</sup> što potvrđuje i koeficijent korelacije koji iznosi 0,965.

Tablica 8. Rezultati zavisnosti površine pika sinigrina o koncentraciji pripremljene otopine

Jednadžba pravca	$y = 2,339x + 68,54$
Nagib	2,339
Odsječak	68,54
Koeficijent korelacije	0,965



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti površine pika sinigrina o koncentraciji pripremljene otopine.

Točnost je stupanj podudaranja između stvarne i vrijednosti dobivene primjenom analitičkog postupka određeni broj puta. Za određivanje točnosti korištena je certificirana uljana repica sa Instituta za određivanje materijala i mjerenja čiji su parametri prikazani u tablici 5. Uzorci su podvrgnuti HPLC analizi, očitane su površine ispod kromatografske krivulje i izračunata je točnost.

U tablici 9 prikazane su količine pojedinačnih glukozinolata, prosječna vrijednost 5 mjerenja kao i standardna te relativna standardna devijacija. Iz tablice se vidi malo odstupanje ukupnih glukozinolata u odnosu na parametre certificirane uljane repice gdje ukupna količina glukozinolata iznosi  $23 \text{ mmol kg}^{-1}$ , što govori da je točnost unutar same metode relativno dobra. Ta odstupanja mogu biti rezultat različite preciznosti uređaja i uvjeta mjerenja. Također, razlog tomu može biti različita dob biljke, kao i okolišni uvjeti, odnosno faktori koji utječu na ukupni sastav glukozinolata..

Tablica 9. Udio pojedinačnog glukozinolata u certificiranoj uljanoj repici ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )

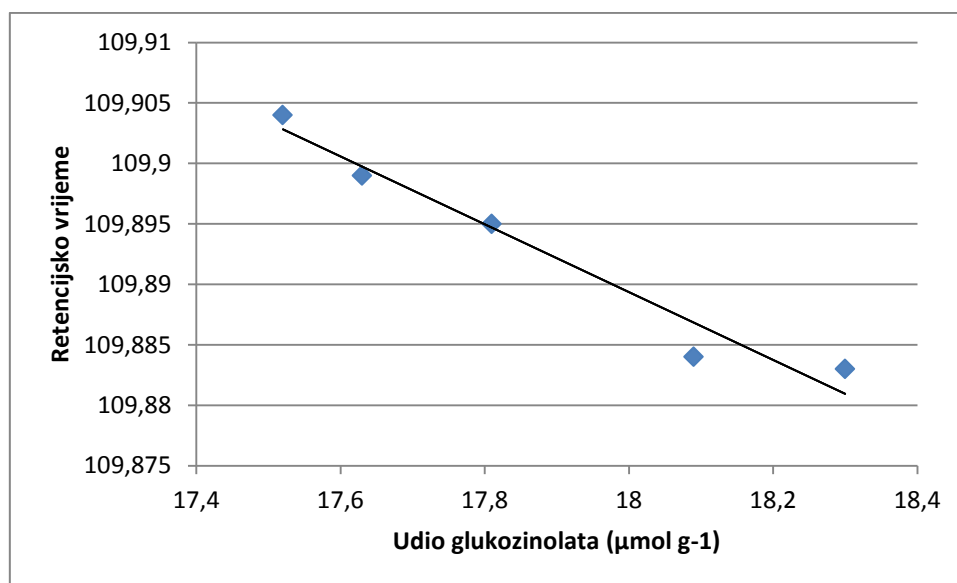
Glukozinolat	S	SD	RSD
Glukoiberin	0,00	0	0,00
Progoitrin	9,46	0,40	4,23
Epi-progoitrin	0,16	0,08	49,14
Glukorafanin	0,00	0	0,00
Glukonapoleiferin	0,33	0,01	2,71
Glukonapin	4,15	0,65	15,64
4-hidroksiglukobrasicin	4,01	0,30	7,52
Glukobrasikanapin	1,41	0,22	15,56
Glukobrasicin	0,20	0,03	13,13
4-metoksiglukobrasicin	0,09	0,02	17,80
Glukobrasicin	0,41	0,12	29,66
<b>UKUPNO</b>	<b>20,21</b>	<b>1,44</b>	<b>7,14</b>

Točnost je također izražena kao točnost retencijskog vremena i točnost injektiranja za uzorak koji je injektiran 5 puta. Retencijska vremena tih uzoraka prikazana su u tablici 10, kao i udio glukozinolata. Točnost je prikazana grafički (slika 10) linearnom regresijom, te su rezultati prikazani u tablici 11. Relativno dobar koeficijent korelacije od 0,958 potvrđuje točnost. Malo odstupanje vidi se u drugom mjerenju koje odgovara retencijskom vremenu od 109,884 min, što može biti rezultat pogreške prilikom mjerenja.



Tablica 10. Retencijsko vrijeme glukozinolata ovisno o broju injektiranja i udjela glukozinolata

Broj injektiranja	Udio glukozinolata ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	Ukupno retencijsko vrijeme (min)
1	18,3	109,883
2	18,09	109,884
3	17,81	109,895
4	17,63	109,898
5	17,52	109,904



Slika 10. Grafički prikaz točnosti retencijskog vremena

Tablica 11. Rezultat točnosti retencijskog vremena

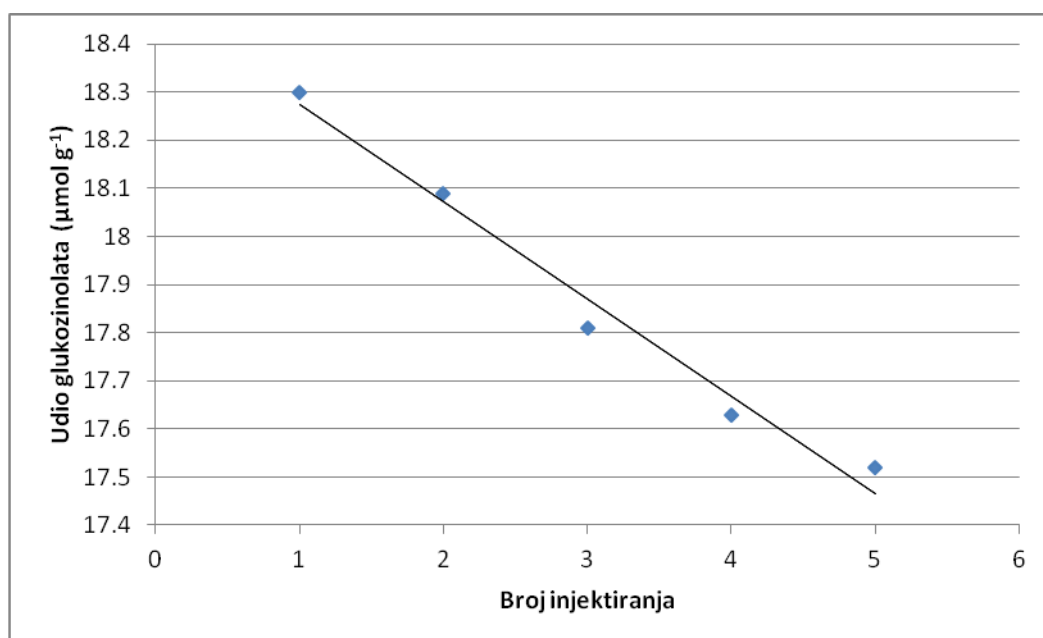
Jednadžba regresijskog pravca	$y = -0,028x + 110,3$
Nagib	-0,028
Odsječak	110,3
Koeficijent korelacije	0,958
Broj mjerenja	5

Točnost injektiranja zapravo odgovara ponovljivosti metode. Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument i laboratorij) u kratkom vremenskom periodu (Velagić, 2016).

Uzorak je injektiran 5 puta te je rezultat je prikazan grafički (slika 11) kao odnos broja injektiranja i koncentracije, što je prikazano u tablici 12.

Tablica 12. Odnos broja injektiranja i udjela glukozinolata

Broj injektiranja	Udio glukozinolata ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )
1	18,3
2	18,09
3	17,81
4	17,63
5	17,52



Slika 11. Grafički prikaz točnosti injektiranja

Jednadžba pravca dobivena je linearnom regresijom te je prikazana u tablici 13. Iz grafičkog prikaza zavisnosti broja injektiranja i udjela glukozinolata vidljiva je ponovljivost ove metode kao i točnost, što potvrđuje i koeficijent korelacije koji iznosi 0,978.

U ISO 9167-1:2011 (E) stoji da apsolutna razlika između dva nezavisna pojedinačna rezultata ispitivanja, dobivena istom metodom na identičnom ispitnom materijalu u istom laboratoriju od strane istog operatora koji koristi istu opremu u kratkom vremenskom razmaku, ne smije biti veća od  $2 \mu\text{mol g}^{-1}$  za sadržaj glukozinolata manje od  $20 \mu\text{mol g}^{-1}$ , i  $4 \mu\text{mol g}^{-1}$  za sadržaj glukozinolata unutar raspona od  $20 \mu\text{mol g}^{-1}$  do  $35 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Budući da sadržaj glukozinolata

u ovom radu iznosi  $20,21 \mu\text{mol g}^{-1}$  i apsolutna razlika ne prelazi  $1 \mu\text{mol g}^{-1}$  što je u dozvoljenim intervalima, dobra ponovljivost je potvrđena.

Tablica 13. Rezultati točnosti i ponovljivosti injektiranja

Jednadžba regresijskog pravca	$y = -0,202x + 18,47$
Nagib	-0,202
Odsječak	18,47
Koeficijent korelacije	0,978
Broj mjerenja	5

Preciznost pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri istim uvjetima. Obično se provodi pet ili više mjerenja na 2-3 različite koncentracije. Izražava se kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Može biti iskazana kao repetabilnost (ponovljivost), međupreciznost i obnovljivost (reproducibilnost) (Velagić, 2016).

Ponovljivost je ispitana uzastopnim injektiranjem uzoraka usporedivši retencijska vremena standarda poznatih koncentracija koje se nalazi unutar koncentracijskog područja linearnosti. Izračunata je i RSD vrijednost koja je sa rezultatima prikazana u tablici 14. Iz rezultata se vidi da odstupanja u retencijskim vremenima nema, te da je RSD vrijednost unutar zadanih granica prihvatljivosti ( $\leq 0,5\%$ ), što pokazuje dobru ponovljivost.

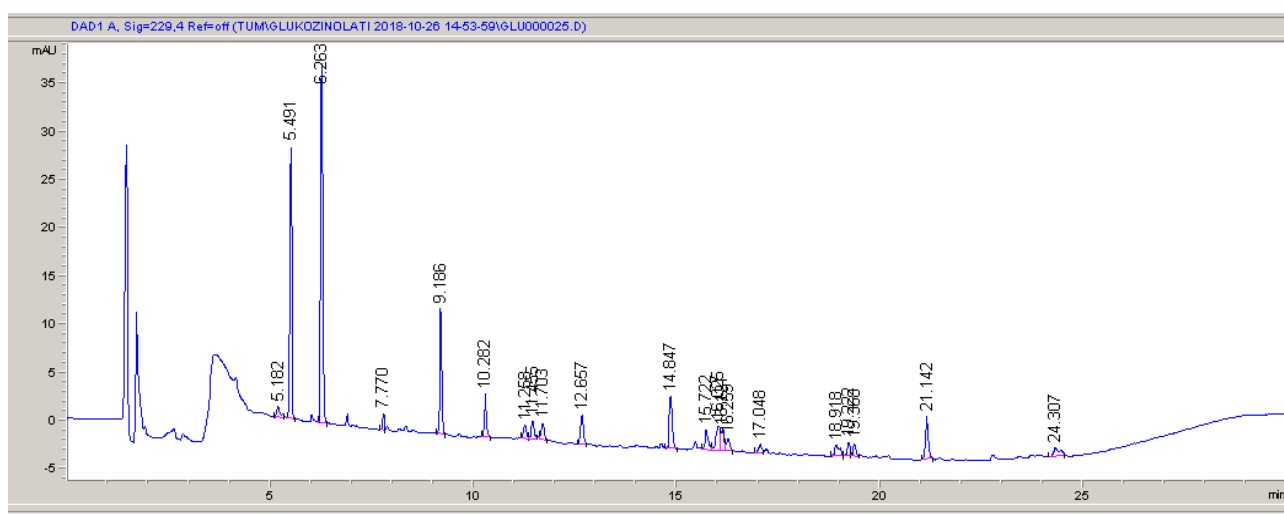
Tablica 14. Podaci o ponovljivosti mjerenja za standard sinigrin

Broj injektranja	Retencijsko vrijeme sinigrina (min)	Površina ispod pika
1	6,31	228,36
2	6,31	228,03
3	6,31	228,73
4	6,31	228,70
5	6,31	228,69
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>6,31</b>	<b>228,50</b>
<b>RSD %</b>	<b>0,01</b>	<b>0,13</b>

## 4.2.SASTAV I UDIO GLUKOZINOLATA U ULJANOJ REPICI

### 4.2.1. Sjeme uljane repice

Na slici 12 prikazan je kromatogram sastava glukozinolata snimljen DAD detektorom na 229 nm. Iz rezultata vidljivo je kako su u sjemenu uljane repice detektirani sljedeći glukozinolati: glucoiberin, progoitrin, epi-progoitrin, glukorafanin, glukonapoleiferin, glukonapin, 4-hidroksiglukobrasicin, glukobrasikanapin, glukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin i glukobrasicin. Ti su spojevi identificirani usporedbom njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima standarada, te također usporedbom UV spektara snimljenih DAD detektorom. Ove glukozinoliate prisutne u Brassica povrću dokazao je i Heaney 1980. godine u svom radu „*The Analysis of Glucosinolates in Brassica Species Using Gas Chromatography*“. Također snimljen je i standard sinigrin monohidrat koji se uvijek javlja oko 6,3 min. U tablici 15 prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije glukozinolata u sjemenu uljane repice.



Slika 12. Kromatogram sastava glukozinolata sjemena uljane repice

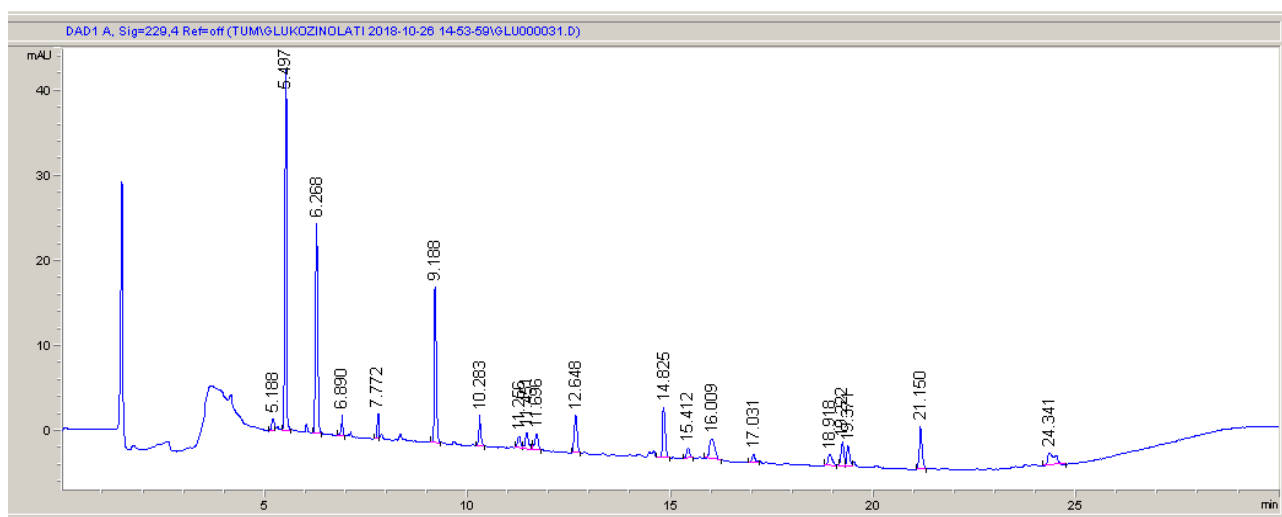
Pojedinačni glukozinolati na kromatogramu određeni su usporedbom kromatograma koji je prikazan u metodi ISO 9167-1:2011. Heaney je 1980. godine u svom radu „*Glucosinolates in Brassica vegetables*“ dokazao kako su u Brassica povrću najzastupljeniji spojevi progoitrin, glukonapin, glukobrasicin i sinigrin. Ova istraživanja to i potvrđuju, pa je tako iz rezultata vidljivo da je najzastupljeniji spoj u sjemenu uljane repice progoitrin sa  $4,95 \mu\text{mol g}^{-1}$  što čini 49,28 % od ukupnih glukozinolata, za kojim slijedi glukonapin u količini od  $2,67 \mu\text{mol g}^{-1}$  (26,53 %). Ostali glukozinolati prisutni su u količinama manjim od  $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ .

Tablica 15. Glukozinolati u sjemenu uljane repice ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )

Glukozinolat	S	SD
Glukoiberin	0,24	0,12
Progoitrin	4,95	0,49
Epi-progoitrin	0,06	0,15
Glukorafanin	0,12	0,12
Glukonapoleiferin	0,28	0,03
Glukonapin	2,67	0,29
4-hidroksiglukobrasicin	0,28	0,07
Glukobrasikanapin	0,77	0,14
Glukobrasicin	0,32	0,17
4-metoksiglukobrasicin	0,14	0,19
Glukobrasicin	0,23	0,09
<b>UKUPNO</b>	<b>10,05</b>	<b>0,91</b>

#### 4.2.2. Pogača uljane repice

U tablici 16 prikazan je sastav i udio glukozinolata u pogači uljane repice. Iz rezultata se vidi da su najzastupljeniji glukozinolati progoitrin i glukonapin, kao i kod sjemena, sa udjelom od 49,20 % i 28,61 %. Sastav glukozinolata u sjemenu i pogači nije se znatno promijenio. Ono što se može primjetiti iz tablica je epi-progoitrin koji u pogači nije identificiran, dok u sjemenu zauzima udio od 0,63 %. Također može se primjetiti povećanje glukobrasikanapin u pogači na 7,82 %. Na slici 13 prikazan je kromatogram pogače uljane repice što potvrđuje te rezultate.



Slika 13. Kromatogram sastava glukozinolata pogače uljane repice

Tablica 16. Glukozinolati u pogači uljane repice ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )

Glukozinolat	S	SD
Glukoiberin	0,12	0,17
Progoitrin	6,88	0,68
Epi-progoitrin	0,00	0,00
Glukorafanin	0,51	0,04
Glukonapoleiferin	0,44	0,06
Glukonapin	4,00	0,01
4-hidroksiglukobrasicin	0,30	0,08
Glukobrasikanapin	1,09	0,04
Glukobrasicin	0,25	0,02
4-metoksiglukobrasicin	0,11	0,01
Glukobrasicin	0,28	0,06
<b>UKUPNO</b>	<b>13,98</b>	<b>0,78</b>

Usporedbom tablica 15 i 16 može se vidjeti povećan udio glukozinolata na strani pogače, što je bilo i za očekivati. Rezultat tomu je izdvajanje ulja koje je prisutno u sjemenu. Također povećan udio glukozinolata može se pripisati djelovanju mirozinaze koja nije aktivna u

sjemenu, ali razaranjem strukture dolazi do njezine aktivacije i djelovanja na glukozinolate. Iako rezultati pokazuju povećanje udjela glukozinolata na strani pogače, može se primjetiti kako su se pojedini glukozinolati u pogači smanjili u odnosu na njihov udio u sjemenu. Za primjer može se uzeti glucoiberin čiji se udio u pogači smanjio za 50 %. Ovo smanjenje glucoiberina primjetio je i Heaney 1980. godine, što on pripisuje velikoj nestabilnosti ovog glukozinolata.

### 4.3.UTJECAJ KRIOMLJEVENJA NA KONCENTRACIJU GLUKOZINOLATA

Mljevenja uljane repice provedeno je na kriomlinu sa i bez hlađenja u intervalima od 2, 4, 8 i 12 minuta. Veličina čestica određena je metodom laserske difrakcije (Tablica 17), a prikazana je vrijednostima parametara raspodjele veličine čestica - D [3,2], d (0,1), d (0,5), d (0,9), što je opisano u diplomskom radu „*Utjecaj kriomljevenja na udio sterola i prehrambenih vlakana pogače uljane repice*“, Mamilović 2018.

Tablica 17. Parametri raspodjele veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) uzoraka mljevenih bez (BH) i uz primjenu kriogenog hlađenja (H) 2, 4 8 ili 12 minuta u odnosu na kontrolni uzorak pogače (Mamilović, 2018).

Uzorak*	Parametri raspodjele veličine čestica (mm)				
	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)	D [3,2]	Raspon
P (kontrolni)	128,22 ± 3,84	393,63 ± 8,96	881,57 ± 19,66	238,82 ± 6,04	1,91 ± 0,01
2BH	60,05 ± 0,31	273,04 ± 2,20	770,90 ± 6,22	130,55 ± 0,93	2,60 ± 0,01
4BH	48,48 ± 1,04	229,43 ± 7,13	698,35 ± 20,30	108,55 ± 2,09	2,83 ± 0,01
8BH	41,32 ± 0,45	202,42 ± 5,01	669,70 ± 13,56	95,12 ± 1,14	3,10 ± 0,04
12BH	33,50 ± 0,42	174,85 ± 4,98	615,21 ± 10,57	79,65 ± 1,07	3,33 ± 0,04
2H	39,56 ± 2,87	164,20 ± 2,83	360,35 ± 1,51	83,10 ± 4,24	1,95 ± 0,04
4H	35,54 ± 0,10	137,36 ± 0,13	288,23 ± 1,12	75,05 ± 0,20	1,84 ± 0,01
8H	20,73 ± 0,37	92,31 ± 0,22	204,87 ± 0,67	49,84 ± 0,54	1,99 ± 0,02
12H	13,80 ± 0,17	61,78 ± 1,22	148,80 ± 0,98	34,28 ± 0,52	2,19 ± 0,03

\*Opis uzoraka se nalazi u Tablici 3.

Prema podacima prikazanim u tablici 17 primijeti se kako parametri veličine čestica, tj. vrijednosti  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$ ,  $d(0,9)$  i  $D[3,2]$  smanjuju s dužim vremenom trajanja mljevenja (Mamilović, 2018).

Povećanjem vremena trajanja mljevenja smanjuje se i udio glukozinolata prisutnih u uljanoj repici (tablica 18). Usporedivši te rezultate sa rezultatima pogače uljane repice tablica 16, vidljivo je da kriomljevenje utječe na smanjenje udjela glukozinolata.

Tablica 18. Udio glukozinolata dobivenih kriomljevenjem sa hlađenjem (H) i bez hlađenja (BH) ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )

Glukozinolat	Vrijeme mljevenja (min)							
	2BH	4BH	8BH	12BH	2H	4H	8H	12H
Glukoiberin <sup>§</sup>	0,71	0,07	0,07	0,05	0,08	0,00	0,04	0,04
Progoitrin <sup>*</sup>	5,04	5,15	5,21	4,84	5,86	4,44	5,08	5,02
Epi-progoitrin <sup>§</sup>	0,00	0,07	0,07	0,00	0,08	0,00	0,07	0,08
Glukorafanin <sup>*</sup>	0,44	0,23	0,28	0,32	0,26	0,20	0,28	0,19
Glukonapoleiferin <sup>§</sup>	0,17	0,35	0,36	0,33	0,40	0,30	0,35	0,34
Glukonapin <sup>*</sup>	2,94	2,45	2,36	2,52	2,86	2,13	2,38	2,60
4-hidroksiglukobrasicin <sup>§</sup>	0,31	0,17	0,19	0,17	0,16	0,10	0,25	0,22
Glukobrasikanapin <sup>*</sup>	0,84	0,73	0,66	0,70	0,82	0,57	0,71	0,75
Glukobrasicin <sup>§</sup>	0,28	0,13	0,12	0,13	0,08	0,11	0,16	0,01
4-metoksiglukobrasicin <sup>§</sup>	0,10	0,07	0,10	0,11	0,06	0,04	0,10	0,06
Glukobrasicin <sup>§</sup>	0,31	0,15	0,08	0,14	0,17	0,11	0,12	0,08
<b>Ukupno</b>	<b>11,13</b>	<b>9,58</b>	<b>9,49</b>	<b>9,30</b>	<b>10,83</b>	<b>8,00</b>	<b>9,54</b>	<b>9,38</b>

\*- vrijeme mljevenja ima utjecaja na koncentraciju glukozinolata, način mljevenja nema

§- vrijeme i način mljevenja nemaju utjecaja na koncentraciju glukozinolata

Ako usporedimo sastav glukozinolata u sjemenu i pogači sa sastavom glukozinolata nakon kriomljevenja, može se uočiti da nema velikih odstupanja. Iz navedenih rezultata vidljivo je da način mljevenja ne igra toliku ulogu u smanjenju udjela glukozinolata, budući da je na kraju mljevenja, sa i bez hlađenja, udio glukozinolata ostao isti ( $9,3 \mu\text{mol g}^{-1}$ ). Povećanjem vremena mljevenja udio glukozinolata smanjio se za nešto više od  $1,5 \mu\text{mol g}^{-1}$ .

Također stavimo li u korelaciju veličinu čestica  $d(0,5)$ , sa vremenom mljevenja dobit ćemo pozitivnu i relativno jaku vrijednost od 0,48, što znači da smanjenje veličine čestica uzoraka mljevenih bez (BH) i uz primjenu kriogenog hlađenja (H) uječe na smanjenje udjela glukozinolata. Isto vrijedi i za specifičnu površinu čestica  $D(3,2)$ , gdje koeficijent korelacije iznosi 0,47.



## 5. Zaključak

Na osnovu dobivenih rezultata i provedene rasprave izvedeni su slijedeći zaključci:

1. Validacijom odabranih parametara (selektivnosti, linearnosti, točnosti i ponovljivosti) pokazalo se da metoda zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti te da je prikladna za određivanje glukozinolata uljane repice.
2. Razlika u koncentracijama glukozinolata sjemena i pogače je relativno mala. Veći udio ima pogača, što se i očekivalo s obzirom na razaranje strukture sjemena.
3. Mljevenje utječe na smanjenje udjela glukozinolata. Usporedbom uzorka sa 2 i 12 minuta mljevenja, koncentracija glukozinolata se smanjila za 20 %. Iz toga se može zaključiti kako s povećanjem vremena mljevenja dolazi do smanjenja udjela glukozinolata. Također na to smanjenje utječu i parametri veličine čestica koji se smanjuju dužinom trajanja mljevenja. Da bi se ovi rezultati potvrdili potrebno je provesti dodatna istraživanja, uključiti i uzorke s većim trajanjem mljevenja, kao i neke druge metode kako bi se došlo do željenih rezultata.

## 6. Literatura

Heaney, R. K., Fenwick, G. R. (1980) Glucosinolates in Brassica Vegetables. Analysis of 22 Varieties of Brussels Sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *J Sci Food Agr*, **31** (8), 785-793

Heaney, R. K., Fenwick, G. R. (1980) The analysis of glucosinolates in Brassica species using gas chromatography. Direct determination of the thiocyanate ion precursors, glucobrassicin and neoglucobrassicin. *J Sci Food Agr*, **31**(6), 593–599.

Fahey, J. W. (2002) Dietary Phytochemical Delivery: Glucosinolates/Isothiocyanates. *Nutr Today*, **37** (5), 214-217.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Paul, T. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56** (1), 5-51.

Goswami, T. K. (2017) Recent Trends of Application of Cryogenics in Food Processing and Preservation. *J Food Nutr Popul Health*, **1**, 1-4.

ISO 9167-1:2011, Rapeseed - Determination of glucosinolates content - Part 1: Method using high-performance liquid chromatography

Kalia, S. (2010) Cryogenic Processing: A Study of Materials at Low Temperatures. *J Low Temp Phys*, **158** (5-6), 934-945

Kokić, B., & Palić, D. (2012) Glukozinolati uljane repice kao antinutritivni faktori u ishrani životinja. *Ratar. i Povrt.*, **49**(1), 113-118.

Kopjar, M., Šubarić, D., & Piližota, V. (2012) Glukozinolati: Biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, **1** (1), 22-35.

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

Mithen, R. F., Dekker, M., Verkerk, R., & Rabot, S. (2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J Sci Food Agr*, **80**, 967-984.

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

Moreno, D., Carvajal, M., López-Berenguer, C., & García-Viguera, C. (2006) Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Eur Ceram Soc*, **41**(5), 1508-1522.

Ohlson, R., & Anjou, K. (1979) Rapeseed Protein Products. *J Am Oil Chem Soc*, **53**, 431-437.

Šajina, M. (2014) Sulforafan, <https://nutricionizam.com/sulforafan/>. Pristupljeno 24.travanj 2019.

Tripathi, M., & Mishra, A. (2007) Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim Feed Sci Tech*, **132**(1-2), 1-27.

Velagić, D. (2016.) Razvoj LC/MS metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., Schrijver, R., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., Dekker, M. (2009) Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Mol Nutr Food Res*, **53**, 219-265.

Vermorel, M., Heaney, R. K., & Fenwick, G. R. (1986) Nutritive Value of Rapeseed Meal: Effects of Individual Glucosinolates. *J Sci Food Agr*, **37** (12), 1197-1202.

Zekić, M. (2013) Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae. Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.

## 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.

---

Ime i prezime studenta