

Utjecaj ultrazvuka i kriogenog mljevenja na udjel fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost pogačice lana

Tomšić, Antonija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:960975>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Antonija Tomšić

7354/PT

**UTJECAJ ULTRAZVUKA I KRIOGENOG MLJEVENJA NA
UDJEL FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKU
AKTIVNOST POGAČE LANA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ulja i masti

Mentor: doc. dr. sc. Marko Obranović

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ULTRAZVUKA I KRIOGENOG MLJEVENJA NA UDJEL FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST POGAČE LANA

Antonija Tomšić, 0058210247

Sažetak:

Svrha rada bila je istražiti utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta nakon predtretmana kriogenim mljevenjem na udio fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta pogače lana. Pogača je tretirana ultrazvukom visokog intenziteta (400 W, 24 kHz) pri amplitudama od 60 %, 80 % i 100 % u vremenu od 3, 6 i 9 minuta. Udio fenolnih spojeva u samljevenoj i liofiliziranoj pogači lana određen je HPLC tehnikom, a antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva određena je FRAP metodom. Najefikasnijim se pokazao tretman ultrazvukom visokog intenziteta pri amplitudi 100 % u vremenu od 6 minuta za ekstrakciju glukozida ferulinske kiseline i glukozida *p*-kumarinske kiseline, a za sekoizolarikirezinol diglukozid pri amplitudi 100 % u vremenu od 9 minuta. U ovom radu nije dokazana značajnija korelacija između porasta koncentracije ukupnih fenolnih spojeva i porasta antioksidacijske aktivnosti.

Ključne riječi: pogača lana, kriogeno mljevenje, ultrazvuk, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 31 stranica, 4 slike, 4 tablice, 43 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *doc. dr. sc. Marko Obranović*

Datum obrane: 10. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

THE EFFECT OF ULTRASOUND AND CRYOMILL ON THE CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAXSEED PRESS CAKE

Antonija Tomšić, 0058210247

Abstract:

The aim of this study was to determine impact of high intensity ultrasound after pre-treatment with cryogenic milling on the content of phenolic compounds and antioxidant activity of flaxseed cake extract. The flaxseed cake was treated with high intensity ultrasound (400 W, 24 kHz) at amplitude of 60 %, 80 % and 100 % for 3, 6 and 9 minutes. Phenolic compounds were determined by high performance liquid chromatography and the antioxidant activity of phenolic compounds was determined by the FRAP method. The most effective treatment of high intensity ultrasound for the extraction of ferulic acid glucoside and *p*-coumaric acid glucoside proved to be at 100 % amplitude for 6 minutes, and for secoisolariciresinol diglucoside at 100 % amplitude for 9 minutes. No significant correlation was found between the increase in the concentration of total phenolic compounds and the increase in antioxidant activity.

Keywords: antioxidant activity, cryomill, flaxseed press cake, phenolic compounds, ultrasound

Thesis contains: 31 pages, 4 figures, 4 tables, 43 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Marko Obranović, PhD., Assistant Professor*

Defence date: July 10th 2020

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. LAN.....	2
2.2. LANENO ULJE.....	3
2.2.1. Proizvodnja.....	3
2.2.2. Kemijski sastav.....	3
2.3. LANENA POGAČA.....	4
2.3.1. Proteini.....	5
2.3.2. Polisaharidi.....	5
2.3.3. Fenolni spojevi.....	5
2.3.4. Lignani.....	6
2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST.....	7
2.5. KRIOGENO MLJEVENJE.....	8
2.6. ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA.....	9
2.7. LIOFILIZACIJA.....	10
2.8. FRAP METODA.....	10
2.9. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1. MATERIJAL.....	12
3.2. METODE RADA.....	12
3.2.1. Mljevenje kriomlinom.....	12
3.2.2. Tretiranje uzorka ultrazvukom visokog intenziteta.....	13
3.2.3. Liofilizacija uzoraka.....	14
3.2.4. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva.....	15
3.2.5. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva pomoću HPLC-a.....	16
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti fenolnih spojeva pomoću FRAP metode..	18
3.2.7. Statistička obrada.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. KONCENTRACIJA I SASTAV FENOLNIH SPOJEVA.....	21
4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA.....	25
5. ZAKLJUČAK.....	27
6. LITERATURA.....	28

1. UVOD

Lan (lat. *Linum usitatissimum* L.) je biljka iz porodice *Linaceae*. Stoljećima se uzgajala kao sirovina za izradu tkanine te kasnije za proizvodnju boja, lakova i linoleuma. Zbog brojnih biološki aktivnih komponenti i visoke koncentracije α -linolenske masne kiseline, u posljednja dva desetljeća, lanene sjemenke i ulje zainteresirali su prehrambenu i farmaceutsku industriju. Laneno ulje, vlakna i lignani pokazuju velik potencijal u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, ateroskleroze, različitih vrsta karcinoma, artritisa, osteoporoze te autoimunih i neuroloških poremećaja. Zbog navedenih svojstava, lanene sjemenke smatraju se i funkcionalnom hranom.

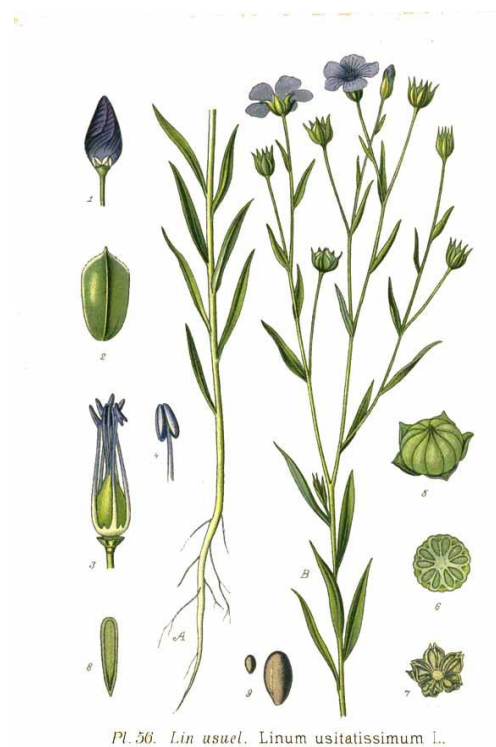
Mnoga istraživanja usmjerena su na razvoj novih, blažih tehnika obrade hrane za koje se pretpostavlja da mogu zamijeniti neke tradicionalne, toplinski temeljene, procese u prehrambenoj industriji. Sačuvana i unaprijeđena aroma, okus, miris, boja, vizualni izgled i nutritivna svojstva samo su neke od značajka tako obrađene hrane. U novije tehnike obrade hrane ubrajaju se između ostaloga i kriogeno mljevenje i ultrazvuk visokog intenziteta koji će biti korišteni i opisani u ovom radu.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj kriogenog mljevenja i ultrazvuka, kao novih tehnologija obrade hrane, na povećanje udjela ekstrahiranih fenolnih spojeva te povećanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lanene pogače.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LAN

Lan (lat. *Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice lanovki (lat. *Linaceae*). Danas je poznato 10 rodova i više od 150 različitih vrsta lana. Zbog dobre prilagodljivosti na različitu klimu, uzgaja se već stoljećima u različitim dijelovima svijeta radi proizvodnje ulja, lakova, boja i tkanine. Najveći usjevi lana nalaze se u Indiji, Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi te Ujedinjenom Kraljevstvu. Usjevi mogu biti usmjereni na proizvodnju vlakana ili sjemenki. Ukoliko su usmjereni na proizvodnju vlakana, biljka ima dužu stabljiku visine 80-120 cm s nekoliko grančica i s malim brojem tobolca koji sadrže sitne sjemenke. Kod usjeva usmjerenih na proizvodnju ulja, stabljika je kraća, visine 60-80 cm, s kraćim granama i mnogobrojnim tobolcima koji sadrže velik broj sjemenki (Przybylski, 2005). Sjemenke lana sadrže približno 20 % proteina, 28 % dijetalnih vlakana i oko 40 % ulja (od čega približno 73 % polinezasićenih masnih kiselina). Jedan su od najbogatijih izvora α -linolenske kiseline. Osim toga, bogate su biološki aktivnim tvarima poput lignana, fenolne kiseline, pigmenta antocijana, flavonola, flavona, fitinske kiseline, vitamina (A i E) i minerala (P, Mg, K, Na, Fe, Cu, Mn i Zn) (Sharav i sur., 2014).



Slika 1. Lan (lat. *Linum usitatissimum* L.) (Anonymous 1, 2020)

2.2. LANENO ULJE

2.2.1. Proizvodnja

Lanene sjemenke sadrže veliku količinu ulja, a dobivanje ulja iz sjemenki vrlo često zahtjeva dvostruko prešanje. Prije prešanja, potrebno je očistiti sjemenke i optimirati udio vlažnosti, koja obično iznosi od 9.5 % do 10 %. Regulacijom vlažnosti sjemenka minimizira se stvaranje grudica nakon mljevenja i povećava iskoristivost procesa. Nakon ovih pripremnih koraka provodi se hladno prešanje (Przybylski, 2005). Prema definiciji Pravilnika (2019) hladno prešana ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, samo mehaničkim postupcima, primjerice prešanjem, bez primjene topline. Posljednji koraci su filtracija i pakiranje u struji dušika ili drugih inertnih plinova u boce koje štite od svjetlosti. Nakon toga ulje je spremno za distribuciju. Ukoliko se ulje proizvodi za ne-prehrambenu upotrebu, sjemenke se temperiraju i drobe prolaskom kroz glatke valjke, a nakon toga odlaze u uređaj gdje se griju na temperaturu od 80 do 100 °C kako bi se inaktivirali enzimi i olakšala ekstrakcija ulja tijekom prešanja. Tako zagrijane sjemenke odlaze u prešu gdje se dobiva ulje koje potom odlazi na filtraciju. Pogača koja se dobila nakon prešanja, miješa se s heksanom kako bi se provela dodatna ekstrakcija ulja. Nakon toga potrebno je ukloniti heksan u isparivaču pri temperaturi od 100 °C. Pogača dobivena ovim postupkom dalje se koristi kao hrana za životinje, a dobiveno ulje je potrebno degumirati i rafinirati (Przybylski, 2005).

2.2.2. Kemijski sastav

Laneno ulje karakterizira specifičan sastav masnih kiselina, odnosno sadrži visok udio α -linolenske kiseline (ALA), obično više od 50 %. Omega-3 masne kiseline djeluju povoljno na ljudski organizam pa se zbog toga laneno ulje smatra visokovrijednim uljem. S druge strane, ALA je vrlo podložna oksidaciji, oksidira 20-40 puta brže nego oleinska kiselina i 2-4 puta brže nego linolna kiselina. Navedeno svojstvo pogodno je ako se laneno ulje koristi u proizvodnji plastičnog materijala, lakova i boja jer omogućava brzo sušenje. S druge strane, ukoliko se koristi u prehrambene svrhe predstavlja veliki problem. Laneno ulje sadrži puno niže koncentracije tokoferola od ostalih biljnih ulja i zbog toga ono još lakše podliježe oksidaciji. Najzastupljeniji tokoferol, s 80 %-tnim udjelom, je gama-tokoferol. Najznačajniji antioksidans lanenog ulja je plastokromanol-8, derivat gama tokoferola s dvostruko dužim nezasićenim

lancem. Udio fitosterola u lanenom ulju mnogo je manji nego u drugim biljnim uljima što je i vidljivo u tablici 1. (Przybylski, 2005).

Tablica 1. Kemijski sastav ulja lana, lana s povećanim udjelom linolne masne kiseline (Linola) i ostalih glavnih uljarica (Przybylski, 2005)

tvar	LAN	LINOLA	ULJANA REPICA	SOJA	SUNCOKRET
masne kiseline (%)					
C 16:0	5.3	6.1	3.8	11.2	6.0
C 18:0	3.3	3.8	1.7	4.1	4.0
C 18:1	17.9	15.5	58.2	24.3	16.5
C 18:2	14.7	71.3	20.1	54.6	72.4
C 18:3	58.7	2.0	9.6	8.3	0.5
zasićene masne kiseline	9.0	10.0	6.2	15.6	11.2
mononezasićene masne kiseline	18.1	17.1	64.2	23.4	16.7
polinezasićene masne kiseline	72.9	72.9	29.6	61.0	72.1
tokoferoli (mg/kg)					
alfa	20	15	272	116	613
gama	200	200	423	737	19
delta	7	5	-	275	-
plastokromanol-8	120	110	75	-	-
ukupno	347	330	770	1128	632
fitosteroli (%)					
brasikasterol	1	1	14	-	-
kampesterol	27	23	28	18	7
stigmasterol	8	4	1	15	7
β -sitosterol	50	54	52	54	58
Δ^5 -avenasterol	10	18	5	2	4
ukupni steroli (g/kg)	2,3	2,2	6,9	2,6	3,1

2.3. LANENA POGAČA

Pogača predstavlja kruti ostatak nakon prešanja. Kod hidrauličkih preša ona može biti okrugla ili u obliku kvadra, dok je kod kontinuiranih preša najčešće u obliku nepravilnih krupnih komada. Pogača nakon istovara iz preša može imati veći udio vode što dovodi do ubrzanog kvarenja. Kako bi se izbjeglo kvarenje, važno je udio vode smanjiti na 8 do 12 % te ih prije skladištenja ohladiti. Lanena pogača u prosjeku sadrži 11-14 % vode, 30-34 % proteina, 6-9 % masti, 31-35 % ekstrahiranih tvari bez dušika i 9-10 % celuloze (Škevin, 2019). Do nedavno, lanena pogača koristila se isključivo u ishrani životinja. Zbog ograničenosti bioloških resursa,

porasta svjetske populacije, produženja životnog vijeka, zadovoljavanja sve viših zahtjeva potrošača i sprečavanja zagađenja životne sredine koje donose nusproizvodi prehrambene industrije, procesi valorizacije obnovljivih biomaterijala postaju sve važniji. Uljne pogače mogu se koristiti u proizvodnji: hrane za životinje, umjetnih gnojiva, enzima, antibiotika, biopesticida, biosorbenta, vlakana, proteina, polifenola i biodegradabilne ambalaže (Krimer Malešević, 2017).

2.3.1. Proteini

Lanena pogača predstavlja bogat izvor aminokiselina, osobito glutamina, arginina, valina, leucina, tirozina i fenilalanina. S druge strane, koncentracije lizina, metionina i cisteina su u deficitu. Dodatkom proteina izoliranih iz lanene pogače u proizvod povećava se viskoznost, čvrstoća, trajnost proizvoda i omogućuje se bolje vezanje vode (Oomah i Mazza, 1993). Ukupni udio dušika u lanenim sjemenkama iznosi 3,25 g/100 g sjemenki (Goyal i sur., 2014). Udenigwe i Aluko (2010) dokazali su da proteini lanene pogače sadrže specifične bioaktivne peptide koji smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti.

2.3.2. Polisaharidi

Lanena pogača sadrži topljiva i netopljiva dijetalna vlakna. Udio topljivih prema netopljivima varira između 20:80 i 40:60. U posljednjih nekoliko godina, vlakna topljiva u vodi zainteresirala su farmaceutsku industriju, a raznovrsni drugi polisaharidi prehrambenu industriju gdje se koriste kao aditivi za zgušnjavanje i emulzije (Goyal i sur., 2014). Netopljiva vlakna olakšavaju probavu i sprječavaju opstipaciju jer smanjuju vrijeme prolaska hrane kroz crijeva. S druge strane, vlakna topljiva u vodi pomažu u održavanju normalne razine glukoze u krvi i snižavanju razine kolesterola u krvi (Greenwald i sur., 2001).

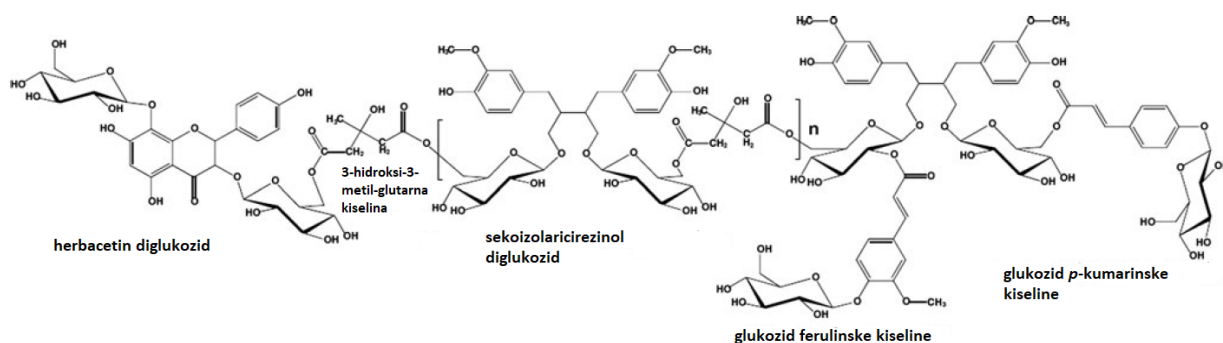
2.3.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi u prirodi prisutni su u gotovo svim biljkama (voće, povrće, žitarice, uljarice...) i namirnicama biljnog podrijetla (čaj, kava, pivo, vino, čokolada...) te predstavljaju najveću skupinu sekundarnih metabolita. Premda se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva

(preko 8000 spojeva), gledano s kemijskog stajališta, osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranog benzenskog prstena. Biljni polifenoli uključuju fenolne kiseline, flavonoide, tanine i lignane. Od ukupne količine hranom unesenih fenolnih spojeva u organizam, jedna trećina su fenolne kiseline, a dvije trećine su flavonoidi (Dai i Mumper, 2010). Fenolni spojevi u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta, štite ih od infekcija mikroorganizama (antibiotsko djelovanje) i UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose gorčini, boji, okusu, mirisu i oksidacijskoj stabilnosti. Brojna istraživanja dokazala su protuupalna, protualergijska i protukancerogena svojstva fenolnih spojeva (Berend i Grabarić, 2008). Krimer Malešević (2017) navodi kako polifenoli nisu ravnomjerno rasprostranjeni u biljnim tkivima. Mjesto njihovog nalaženja nije znak da se biosinteza odigrala samo u tom dijelu biljke, već se oni mogu transportirati unutar biljke na druga mjesta.

2.3.4. Lignani

Lanene sjemenke smatraju se jednim od najbogatijih biljnih izvora lignana. Gledano s kemijske perspektive, lignani su izgrađeni od dimera cimetine kiseline s dibenzilbutanskim kosturom (Essam i sur., 2012). Oni predstavljaju jednu od najvažnijih grupa fitoestrogena, a mogu se pronaći u uljaricama, orašastim plodovima, sojinim proizvodima i u žitaricama. Kod žitarica koncentrirani su u površinskom sloju dok kod uljarica u ljusci. Prosječna koncentracija lignana u proizvodima biljnog podrijetla kreće se do 2 mg lignana po 100 g uzorka, a kod lanenih sjemenki ona može iznositi oko 300 mg lignana po 100 g uzorka. Makromolekula lignana izolirana iz lana sastoji se od sekoizolarikirezinol diglukozida (SDG), 3-hidroksi-3-metil-glutarne kiseline (HMGA), glukozi-*p*-kumarinske kiseline, glukozi ferulinske kiseline i flavonoid herbacetin diglukozida. Najvažniji, ujedno i najzastupljeniji dio molekule lignana, sekoizolarikirezinol diglukozid (SDG), u probavnom traktu pretvara se u prihvatljivije oblike lignana za ljude - enterodiol i enterolakton. Ovi oblici lignana u ljudskom organizmu posjeduju antioksidacijsku i slabu estrogensku ulogu koja štiti organizam od kardiovaskularnih bolesti i određenih vrsta karcinoma. Zbog povoljnog utjecaja lignana na ljudski organizam, prehrambena industrija se usmjerava na istraživanje novih metoda za njihovu ekstrakciju i analizu (Nemes i Orsat, 2012). Prema Goyalu i suradnicima (2014) udio sekoizolarikirezinol diglukozida u lanenim sjemenkama iznosi 294-700 mg/100 g, matairezinola 0,55 mg/100 g, larikirezinola 3,04/100 g i pinorezinola 3,32/100 g. Udio lignana u lanu razlikuje se ovisno o vrsti sorte, mjestu uzgoja i klimatskim uvjetima (Johnsson, 2004).



Slika 2. Struktura makromolekule lignana u lanenim sjemenkama (Peterson i sur., 2010)

2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidansi su tvari koje sprječavaju oksidaciju spojeva podložnih oksidaciji kao što su lipidi, proteini, deoksiribonukleinska kiselina (DNK) ili ugljikohidrati, a u biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala kada su oni u štetnom suvišku. U okviru sigurnosti hrane, antioksidansi se definiraju kao supstance koje produžuju rok trajanja namirnica štiteći ih tako od kvarenja uzrokovanog procesima oksidacije koji u konačnici dovode do užglosti masti, promjene boje ili gubitaka nutritivne vrijednosti. Antioksidansi se mogu podijeliti na više načina: na egzogene i endogene, na prirodne i sintetske, na enzimske i neenzimske i na antioksidanse topljive u vodi ili u mastima. Mogu nastati u stanici ili se u organizam unose hranom, u obliku vitaminskih ili sličnih suplemenata. Djeluju na način da stabiliziraju ravnotežu nesparenih elektrona i neutraliziraju potencijalno štetno djelovanje slobodnih radikala, a da pri tome sami ne postanu nestabilni. Također posjeduju mogućnost popravljivanja oštećenja u stanici nastalih djelovanjem radikala (Krimer Malešević, 2017).

Istraživanja su dokazala da antioksidansi iz prehrambenih izvora imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, a među njima se najviše ističu fenolni spojevi (Fang i sur., 2002). Lanene sjemenke obiluju fenolnim spojevima, osobito lignanima. Pošto su oni hidrofilni spojevi i slabo se otapaju u ulju, zaostaju u lanenoj pogači. Upravo zbog tog razloga istraživanja prehrambene i farmaceutske industrije usmjerena su na njihovu ekstrakciju iz pogače. Krimer Malešević (2017) ističe kako se *p*-hidroksibenzojeva kiselina i njeni derivati izolirani iz lanene pogače mogu koristiti kao dijetalni antioksidansi, prirodne arome i konzervansi, a da kavaska kiselina može selektivno blokirati biosintezu leukotriena koji sudjeluje u autoimunim bolestima poput astme i alergijskih reakcija. Zbog toga je, ekstrakcija bioaktivnih komponenti prvi korak

u proizvodnji dodataka prehrani, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Fenolni spojevi mogu biti ekstrahirani iz svježih, zamrznutih ili osušenih biljnih preparata. Najčešće je prije ekstrakcije potrebno zdrobiti, samljeti i homogenizirati biljni uzorak koji se prethodno osušio na zraku ili se podvrgnuo sušenju zamrzavanjem. Općenito, uzorci koji su sušeni zamrzavanjem sadrže veće količine fenolnih spojeva od onih koji su sušeni prirodnim strujanjem zraka (Dai i Mumper, 2010).

2.5. KRIOGENO MLJEVENJE

Kriogeno mljevenje je postupak mljevenja u kojem se tretirani materijal smrzava u tekućem dušiku na temperaturu do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kriogeno mljevenje relativno je nova i nedovoljno istražena tehnologija u prehrambenoj industriji. Mljevenje uz primjenu kriogenog hlađenja uglavnom se primjenjivalo za usitnjavanje sjemenki različitih začina s ciljem poboljšanja njihove kvalitete (Singh i Goswami, 1999). Ova metoda mljevenja sve veću primjenu pronalazi u farmaceutskoj industriji te u proizvodnji začina i proizvoda od žitarica zbog mogućnosti proizvodnje prahova iznimno malih čestica pri čemu je očuvan njihov izvorni bioaktivni sastav (Benković i sur., 2018).

Proces započinje tako da se materijal koji se melje šalje iz spremnika u dozator, a odatle u pužni prijenosnik. U pužnom prijenosniku osnovni materijal prska se tekućim dušikom kroz specijalno izrađene dizne, materijal se hladi i dozira u mlin, unoseći nisku temperaturu u proces mljevenja. Temperaturna sonda, kontrolni i sigurnosni ventil za tekući dušik trenutno prate i reguliraju količinu tekućeg dušika koja je neophodna za održavanje zadanog radnog režima. Pri dovoljno niskim temperaturama čestice postaju lako lomljive te se smanjuje mehanička energija potrebna za njihovo usitnjavanje (Kostić, 2017).

Ovim postupkom mljevenja olakšava se fragmentacija čestica i pruža mogućnost očuvanja termolabilnih spojeva. Takvim smanjenjem veličine čestica u probavnom sustavu dolazi do povećanja biorasploživosti kao i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta bioaktivnih spojeva. Smanjenje veličine čestica može poboljšati interakciju spoj-otapalo što dovodi do bolje ekstrakcije (Habuš, 2018). Prednost kriogenog mljevenja je u tome što je drobljeni proizvod iste kvalitete kao i originalni, no nedostatak je visoka cijena takvog proizvoda (Kostić, 2017).

2.6. ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA

Procesiranje hrane ultrazvukom relativno je novo područje, koje je naglo uznapredovalo u posljednjih nekoliko godina u različitim oblicima tehnologije i istraživanja. Ultrazvuk predstavlja frekvenciju zvuka koja se nalazi između 18 i 100 kHz. Ultrazvuk se, s obzirom na pojavu kavitacije, može provoditi ispod i iznad praga kavitacije. Za primjenu u prehrambenoj i kemijskoj tehnologiji naročito su važni procesi koji se zasnivaju na pojavi kavitacije (Režek Jambrak i sur., 2010).

Kada se neka tekućina podvrgne dovoljno snažnim vibracijama, odnosno kada su amplitude nastalog tlaka veće od hidrostatskog, tekućina se razbija i dolazi do kavitacije. To se očituje u svojevrsnom vrenju s ekstremno malim mjehurićima, koje je još poznato pod pojmom hladnog vrenja. Rad proizveden kavitacijom posljedica je šoka valova do kojeg dolazi pri kolapsu mjehurića. Intenzitet tog šoka valova ovisi o značajkama tekućine, početnom polumjeru mjehurića i primijenjenoj frekvenciji (manje frekvencije proizvode valove većeg intenziteta) (Lovrić, 2003).

Ultrazvuk se u prehrambenoj industriji učinkovito koristi u procesima zamrzavanja, rezanja, sušenja, temperiranja, sterilizacije, pasterizacije, homogenizacije te emulgiranja. Osim u preradi hrane, rabi se kao ne destruktivna i brza analitička metoda kojom se dobivaju podaci o fizikalno-kemijskim svojstvima hrane (kemijski sastav, struktura, fizikalno stanje, molekularna svojstva, fazne promjene, temperatura, otkrivanje prisustva stranih materijala, mjerenje brzine protoka, mjerenje debljine materijala, određivanje profila sedimentacije i emulgiranja, mjerenje veličine čestica, difuzija, zbijanje i razrjeđivanje, kavitacije). Kao analitički instrument ultrazvuk također može poslužiti za kontinuirano praćenje navedenih svojstava hrane on-line tijekom procesa. Osim toga, često se primjenjuje za ekstrakciju različitih spojeva iz hrane (enzimi, proteini, metali, elementi u tragovima, minerali, bioaktivni spojevi) i u reaktorskom inženjerstvu za ubrzavanje kemijskih reakcija i modifikaciju enzimske aktivnosti (Režek Jambrak i sur., 2010).

Primjenom ultrazvuka znatno se skraćuje trajanje procesa obrade proizvoda (na nekoliko sekundi ili minuta s visokom učinkovitošću) uz reduciranje troškova i pojednostavljenje upravljanja procesa dajući veću čistoću konačnog proizvoda uz smanjenje otpadnih tvari (Chemat i sur., 2010).

2.7. LIOFILIZACIJA

Liofilizacija je relativno novi postupak dehidracije namirnica. Tijekom II. svjetskog rata značajnije se proširila u SAD-u i Velikoj Britaniji, gdje su se proizvodile vrijedne namirnice za potrebe vojske. Dugo se smatralo da je ovaj postupak prihvatljiv samo za dehidraciju biološkog materijala poput krvi, plazme i nekih antibiotika.

U prehrambenoj industriji, liofilizacija predstavlja jedinstven postupak sušenja namirnica u zamrznutom stanju. Sastoji se od nekoliko značajnijih koraka koji obuhvaćaju operacije zamrzavanja, dehidracije (sublimacijom i desorpcijom) te kondicioniranja. Princip na kojemu se zasniva liofilizacija definira se na sljedeći način: iz prethodno zamrznutog proizvoda voda se uklanja sublimacijom leda, tj. neposrednim prijelazom iz čvrstog u plinovito stanje. To se realizira podvrgavanjem zamrznutog proizvoda djelovanju topline pod odgovarajućim podtlakom (vakuumom). Budući da se uklanjanje vode vrši sublimacijom leda, taj postupak je okarakteriziran i time što je isključena migracija topljivih sastojaka (šećera, kiselina, mineralnih soli, aminokiselina...) prema površini proizvoda. Na taj način je isključeno stvaranje krute površinske kore koja usporava dehidraciju i koja redovito predstavlja mjesto najintenzivnijih degradacijskih pojava. Osim toga, kako se molekule vode izdvajaju iz krute strukture koja se postupno pretvara u fino-poroznu, onemogućeno je aglomeriranje molekula proteina, a primjenom niskih temperatura znatno su usporene kemijske reakcije. Prednosti liofilizacije su: velika trajnost, održanje strukture i vanjskog oblika, dobra topljivost proizvoda u prahu, dobra rekonstrukcija kod ponovnog primanja vode, porozna struktura pogodna za bubrenje, male promjene boje, arome i okusa te minimalan gubitak vode. Osim navedenih prednosti, smanjenjem težine smanjuju se i troškovi transporta i skladištenja (Lovrić, 2003).

2.8. FRAP METODA

FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) temelji se na mogućnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju reducira žuti kompleks Fe^{3+} -TPTZ (Fe^{3+} -2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazin) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+} -TPTZ. Intenzitet nastale plave boje mjeri se spektrofotometrijski pri 593 nm te je intenzitet obojenja proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa. Prednosti FRAP metode su brzina i jednostavnost analize, robusnost i pristupačnost. Samo provođenje testa nije skupo i ne zahtjeva nikakvu

specijalnu opremu, osim spektrofotometra. Nedostatak FRAP metode je da će svaka komponenta, neovisno o tome ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, a posjeduje niži standardni potencijal od redoks-pare (Fe^{3+} -TPTZ)/(Fe^{2+} -TPTZ), dovesti do redukcije kompleksa i tako povećati FRAP vrijednost uzorka (Mandić, 2017).

2.9. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili skraćeno HPLC (engl. *High performance liquid chromatography*) jedna je od osnovnih instrumentalnih tehnika koja je danas nezaobilazni dio svakog analitičkog laboratorija. Razvila se sredinom 70-ih godina prošlog stoljeća, a vrlo često se koristi za identifikaciju, kvantifikaciju i pročišćavanje smjese spojeva. HPLC metoda ima široku primjenu pa se tako koristi u: analizi hrane (pesticidi, toksini, antibiotici, boje, zaslađivači, hormoni, vitamini...), farmaceutici (određivanje koncentracije aktivnih komponenti u lijekovima, vrijeme poluraspada, kontrola kvalitete...), medicini (određivanje metabolita u biološkim tekućinama), analizi tvari u okolišu (pesticidi, eksplozivi, fenoli, policiklički aromatski ugljikovodici...), forenzici (droga, steroidi, psihoterapeutski lijekovi...) i organskoj kemiji (Radojčić Redovniković, 2016). Osnovni dijelovi uređaja za HPLC su: spremnik mobilne faze, visokotlačna crpka, sustav za unošenje uzorka, pretkolona, kolona, detektor i uređaj za snimanje i integriranje (Djaković, 2018).

U osnovi, kromatografija podrazumijeva razdvajanje složenih smjesa na pojedinačne komponente, odnosno spojeve. Kod tekućinske kromatografije eluiranje se vrši mobilnom fazom (otapalom), a stacionarnu fazu čini čvrsta tvar ili tanki tekući film vezan na čvrsti inertni nosač. Razdvajanje pojedinačnih spojeva temelji se na činjenici da analit iz otopine započinje interakciju s stacionarnom i mobilnom fazom zbog razlika u adsorpciji, raspodjeli među fazama ili veličini tvari koja se razdvaja, što utječe na njegovo vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni (Radojčić Redovniković, 2016).

Prednosti HPLC-a su mnogobrojne, a neke od njih su: brza i precizna kvantitativna analiza, visoka osjetljivost, automatizirana analiza, može se koristiti različita količina uzorka i prilagodljivost metode ovisno o vrsti uzorka (Djaković, 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Pogača lana proizvedena je laboratorijskim dvostrukim hladnim prešanjem (veće iskorištenje ulja iz pogače) na pužnoj preši (Komet, model CA/53, Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka) na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu iz sjemena lana kupljenog na tržištu. Nakon prešanja pogača je mljevena 12 minuta na kriomlinu (Retsch+Apollo, Han, Njemačka) koji je bio spojen s spremnikom za tekući dušik i potom skladištena pri temperaturi od – 18 do – 20 °C do analiza.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Mljevenje kriomlinom

Aparatura i pribor:

- vibracijski kriomlin sa spremnikom za tekući dušik (Retsch+Apollo, Haan, Njemačka)
- tehnička vaga (KERN KB2000-2N Balingen, Njemačka)
- metalna žlica

Opis postupka:

Uzorak pogače lana prebaci se u posudu za mljevenje uz dodatak 12 malih metalnih kuglica promjera 10 mm. Posuda se umetne u cilindar, zatvori čepom i dobro stegne odvijačem kako ne bi došlo do curenja uzorka prilikom analize. Vrijeme mljevenja bilo je 12 min. Optimiranje postupka mljevenja uzorka lanene pogače napravljeno je u diplomskom radu Kuraica (2019). Uzorci pogače nakon usitnjavanja skladišteni su u zamrzivaču na – 20 °C do daljnjih analiza.

Prije početka mljevenja uz hlađenje, otvori se ventil za dovod dušika i namjestite se željeni parametri: predhlađenje, vrijeme mljevenja, broj kriociklusa (u ovom istraživanju 1) i frekvencija (30 Hz). Tlak dušika na izlazu iz spremnika tijekom cijelog procesa održavan je na 1,3 bara zbog optimizacije. Nakon provedenog mljevenja, uzorak se vadi iz posude, a cilindar je potrebno odmah zatvoriti kako bi se spriječio ulazak vlage.

3.2.2. Tretiranje uzorka ultrazvukom visokog intenziteta

Aparatura i pribor:

- ultrazvučni uređaj (LAUDA MC 250, LAUDA-Brinkmann, Njemačka)
- tehnička vaga
- staklena laboratorijska čaša od 250 mL
- metalna žličica
- menzura
- termometar
- pH-metar
- plastične čaše s poklopcem

Reagensi:

- destilirana voda

Opis postupka:

Izvaže se 10 g uzorka (lanena pogača prethodno samljevena na kriomlinu) na tehničkoj vagi u laboratorijsku čašu od 250 mL. U čašu se doda 80 mL destilirane vode, uzorak se miješa sa staklenim štapićem tako dugo dok se ne razbiju grudice, a nakon toga se štapić još ispere s 20 mL destilirane vode. Izmjeri se pH i temperatura uzorka prije tretiranja ultrazvukom. Ultrazvučna sonda uroni se 1-2 cm u uzorak, namjesti se amplituda (60 %, 80 % ili 100 %) i snaga (za sve uzorke iznosi 400 W) i prema propisanom vremenu (3, 6 ili 9 min) provodi se tretiranje ultrazvukom. Izmjeri se pH i temperatura uzorka nakon tretiranja ultrazvukom. Ukupno se tretira 13 uzoraka. Prema planu izvođenja eksperimenta ekstrakcije fenolnih spojeva iz pogače lana (tablica 2.) korišten je računalni program Design Expert i eksperimentalni dizajn Box Benhken s varijacijom amplitude i vremena. Uzorci su opisani s temperaturom i pH vrijednošću prije i nakon tretmana ultrazvukom. Svaki uzorak se prelije na približno tri jednaka dijela u 3 plastične posude s poklopcem. Uzorci se čuvaju u zamrzivaču na – 80 °C do početka liofilizacije. Opis uzoraka s temperaturom i pH vrijednošću prije i nakon tretmana ultrazvukom prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Plan eksperimenta ekstrakcije fenolnih spojeva iz pogače lana

Br. uzorka	Naziv uzorka	Vrijeme (min)	Amplituda (%)	Početna temperatura (°C)	Završna temperatura (°C)	pH_{prije}	pH_{nakon}
1	A	6	80	22,5	67,0	6,83	6,19
2	B	3	60	23	48,4	6,56	6,35
3	C	3	100	23,8	58,3	6,56	6,25
4	D	6	100	23,7	77,5	6,42	6,02
5	E	3	80	23,6	59,5	6,41	6,3
6	F	6	80	23,4	70,0	6,34	6,14
7	G	9	80	23,4	82,6	6,41	5,9
8	H	6	80	23,9	65,0	6,3	6,10
9	I	6	80	23,5	81,1	6,41	6,25
10	J	6	80	23,8	73,1	6,41	6,10
11	K	6	60	23,1	65,1	6,47	6,07
12	L	9	100	23,6	86,1	6,37	5,92
13	M	9	60	23,1	75,3	6,51	6,05

3.2.3. Liofilizacija uzoraka

Aparatura i pribor:

- liofilizator (Alpha 1-4 LSC Plus, Martin Christ, Njemačka)
- metalna špatula

Opis postupka:

Liofilizator se prije stavljanja uzoraka pokrene u dvije faze - prva faza je smrzavanje, a druga zagrijavanje. Na tri police unutar liofilizatora postavi se po osam otvorenih plastičnih čaša s uzorcima te uređaj ponovo počinje raditi u dvije faze - prva faza jedno minutnog smrzavanja i druga faza tri minutnog zagrijavanja. Proces liofilizacije traje 46 sati. Nakon završetka procesa otpusti se vakuum te se izvade uzorci, a uređaj se postavi na odmrzavanje uz otvoreni ventil za vodu. Uzorci se homogeniziraju pomoću metalne špatule, a nakon toga se pohrane u zamrzivač na – 80 °C.

3.2.4. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva

Aparatura i pribor:

- analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- centrifuga (Rotina 380, Hettich, Njemačka)
- epruvete
- metalna žličica
- mikropipeta
- mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor (MW-ER-01, Lab-Kits, Kina)
- odmjerna tikvica od 100 mL
- pipeta i propipeta
- plastične kivete
- stakleni lijevak
- šprice i PVDF filter (Kromafil, Macherey-Nagel, Dúren, Njemačka)
- tresilica (Vortex 4 Basic, Hettich, Njemačka)

Reagensi:

- otapalo MetOH: 0,1 M NaOH
- 100 % - tni metanol, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Opis postupka:

0,5 g svakog liofiliziranog uzorka odvaže se pomoću analitičke vage u plastičnu kivetu. Uzorci se iz kiveta prebace u epruvetu, a zatim se doda 10 mL otapala MetOH: 0,1 M NaOH. Uzorak se stavi na vortex 10-15 sekundi, a potom se stavi u mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor i tretira 360 sekundi pri uvjetima: snaga 300 W, maksimalna temperatura 120 °C, isključen ultrazvuk. Nakon toga se tretirani uzorak prelije natrag u kivetu, a epruveta se ispere s metanolom. Kivete se stave u centrifugu na 15 min i 5000 okretaja. Pomoću lijevka tekući dio uzorka prelije se u odmjernu tikvicu i nadopuni se do crte otapalom MetOH: 0,1 M NaOH. Alikvot se pomoću šprice iz odmjerne tikvice profiltrira u vijalicu kroz PVDF filter veličine pora 0,2 µm. Pripremljeni ekstrakti služe za određivanje fenolnih spojeva na HPLC sustavu te se do analize čuvaju u zamrzivaču na – 20 °C.

3.2.5. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva pomoću HPLC-a

Sastav i koncentracija fenolnih spojeva u uzorcima lanene pogače određeni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *HPLC*) pomoću Agilent Technologies HPLC serije 1200 s binarnom pumpom, autosamplerom i DAD detektorom (Santa Clara, SAD). Razdvajanje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz lanene pogače provedeno je pri 30 °C na Phenomenex C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm × 4,6 mm, 2,6 μm, 100 Å). Uvjeti korištene metode optimirani su u diplomskom rada Cvitanić (2016). Količina injektiranog uzorka iznosi 5 μL, a kao mobilne faze korištene su (mobilna faza A) i 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B). Protok mobilnih faza tijekom trajanja analize iznosio je 0,9 mL/ min, a primijenjeni gradijent prikazan je u tablici 3. Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su DAD detektorom na 280 i 330 nm. Tokom trajanja analize snimani su spektri u ultraljubičastom području, od 200 do 400 nm.

Aparatura i pribor:

- HPLC uređaj (Agilent Technologies HPLC serija 1200, Santa Clara, SAD)
- vijalice

Reagensi:

- 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi
- 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu

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

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26.1	90	10
28	90	10

Fenolni spojevi pogače lana identificirani su usporedbom spektra i retencijskih vremena detektiranih spojeva i standarda. Kvantifikacija fenolnih spojeva u ekstraktu provedena je pomoću internog standarda (formula [1]), tj. 3,5 dikloro-4-hidroksibenzojeve kiseline. Iz koncentracije (x) izračunata je koncentracija fenolnih spojeva u odvažanim uzorcima pogače prema formuli [2]:

$$x = \frac{A \times c_{i.s.}}{A_{i.s.}} \quad [1]$$

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg/mL)

c_{i.s.} - koncentracija razrijeđenog internog standarda (mg/mL)

A - površina ispod pika spoja

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

$$c \text{ (spoja)} = \frac{x \times V}{m} \times 100 \quad [2]$$

c - koncentracija spoja u odvažanom uzorku (mg/100 g)

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg/mL)

V - volumen ekstrakta (mL)

m - masa uzorka korištena za ekstrakciju (g)

3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti fenolnih spojeva pomoću FRAP metode

Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva određena je FRAP metodom. U ispitivanim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena je pomoću metode prema Benzie i Strain (1996), uz modifikacije. Mehanizam se zasniva na redukciji žutog kompleksa Fe^{3+} -TPTZ u plavo obojeni kompleks Fe^{2+} -TPTZ pomoću antioksidanasa iz ekstrakta. Apsorbancija se mjerila pri 593 nm, a rezultati su izraženi kao mg Trolox ekvivalenta (TE)/100 g uzorka. Kvantifikacija se provela na temelju jednadžbe baždarnog dijagrama preuzetog iz diplomskog rada Kuraica (2019), a napravljenog na računalu u programu Microsoft Office Excel na osnovi vrijednosti dobivenih mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija razrijeđenih otopina u vodi topljivog analoga vitamina E, Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina).

Aparatura i pribor:

- analitička vaga Mettler (točnost $\pm 0,01$ g)
- magnetna miješalica s keramičkom grijaćom pločom (C – MAG HS 7, IKA, Njemačka)
- mikrokivete
- mikropipeta volumena 100 μ L i 1000 μ L
- odmjerne tikvice volumena 10 mL i 100 mL
- spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
- staklene čaše volumena 50 mL
- termometar (ETS – D5, IKA, Njemačka)
- vodena kupelj

Reagensi:

- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), (Sigma Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- 20 mM željezovog klorida heksahidrat ($FeCl_3 \times 6H_2O$), (Gram-mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska) - 0,541 g $FeCl_3 \times 7 H_2O$ otopi se u 100 mL destilirane vode
- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline HCl (Carlo Erba, Val de Reuil Cedex, Francuska) - 343 μ L 12 M HCl (konc. HCl = 37 %), razrijedi se u odmjerneji tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake

- 10 mM otopina TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazin) u 40 mM HCl-u - 0,312 g TPTZ-a, (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Njemačka) se otopi u odmjernoj tikvici od 100 mL s 40 mM HCl-om, te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake
- 300 mM acetatni pufer, pH 3,6-3,1 g natrijevog acetata trihidrata (Iach-Ner, Neratovice, Češka) otopi se u 16 mL ledene octene kiseline (Macron, Center Valley, SAD) u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake
- 100 % - tni metanol (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

Opis postupka:

Pripremi se smjesa reagensa za FRAP metodu koja sadrži: 2,5 mL (20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$) + 2,5 mL (10 mM TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazin)u 40 mM HCl) + 25 mL 300 mM acetatnog pufera. Smjesa se zagrije na 37 °C neposredno pred upotrebu i održava se na toj temperaturi pomoću magnetne miješalice s keramičkom grijaćom pločom u koju je uronjeni termometar. Potom se pripremi slijepa proba na način da se u mikrokivetu odpipetira 10 μ L otapala MeOH : 0,1 mL NaOH i 1 mL FRAP smjese reagensa. U drugu mikrokivetu odpipetira se 10 μ L uzorka i 1 mL FRAP smjese reagensa. Pomoću štoperice uključi se odbrojavanje od 4 minute, a uzorak se stavi u mrak. Zadnjih 15 sekundi mikrokivete sa slijepom probom i uzorkom stave se u UV/Vis spektrofotometar i izmjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm. Za svaki uzorak provedena su dva paralelna mjerenja. Za određivanje udjela fenola u ekstraktu izrađen je baždarni dijagram od svježije otopine Trolox-a u metanolu određenog raspona koncentracija (Slika 3). Za izračun koncentracija fenolnih spojeva u ekstraktu i odvaganoj uzorku korištene su formule [3] i [4], a rezultati su izraženi kao mg Trolox ekvivalenta (TE)/100 g uzorka.

$$x = \frac{y-b}{a} \quad [3]$$

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg/mL)

y - apsorbancija uzorka

a - nagib pravca iz baždarnog dijagrama

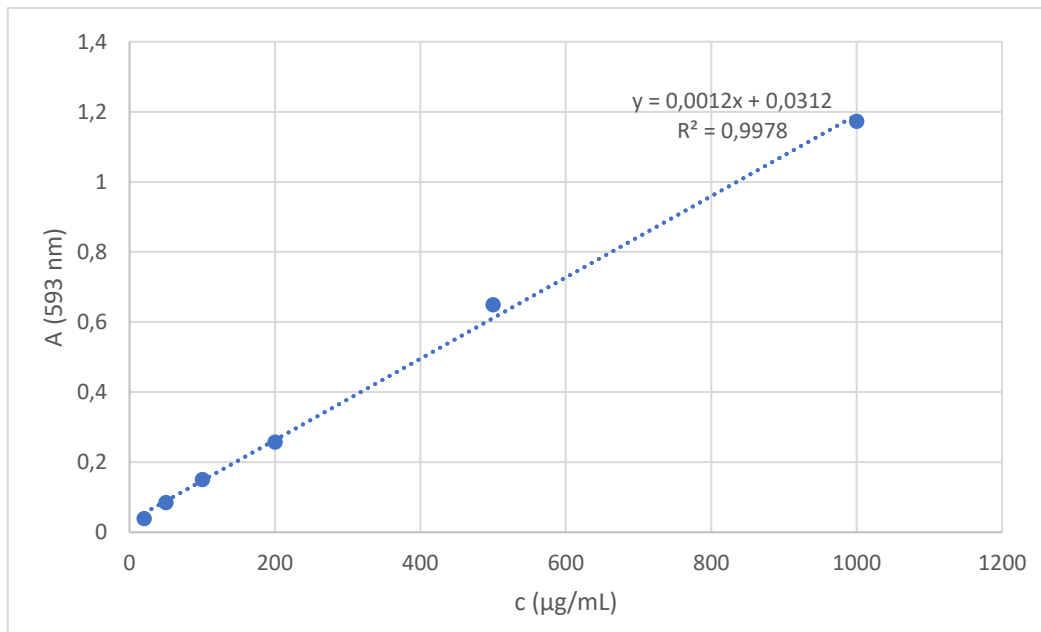
$$c (\text{spoja}) = \left(\frac{x \times V}{m} \right) \times 100 \quad [4]$$

c - koncentracija spoja u odvaganoj uzorku (mg/100 g)

x - koncentracija spoja u ekstraktu (mg/mL)

V - volumen ekstrakta (mL)

m – masa uzorka korištenog za ekstrakciju (g)



Slika 3. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A) o koncentraciji (c) Trolox otopine raspona 10-1000 µg/mL

3.2.7. Statistička obrada

Za statističku obradu dobivenih rezultata analize korišten je Microsoft Excel 2013 (Microsoft, 2013). Faktorska analiza varijance (ANOVA) provedena je kako bi se odredio utjecaj dvije nezavisne varijable (amplituda i vremena tretmana UZV) na udio polifenola.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zbog vrlo visokog udjela lignana i fenolnih kiselina, pogača lana izabrana je kao materijal istraživanja ovog eksperimentalnog rada. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj kriogenog mljevenja i ultrazvuka, kao novih tehnologija obrade hrane, na povećanje udjela ekstrahiranih fenolnih spojeva te povećanje antioksidacijske aktivnosti lanene pogače.

U ovom poglavlju rada prikazani su rezultati HPLC analize, tj. sastav i koncentracija fenolnih spojeva te njihova antioksidacijska aktivnost koja je određena FRAP metodom.

4.1. KONCENTRACIJA I SASTAV FENOLNIH SPOJEVA

U ljusci lanenih sjemenki nalazi se makromolekularni kompleks koji se sastoji od lignana (sekoizolarikirezinol diglukozid, SDG), flavonola (herbacetin diglukozid, HDG) i hidrokscinaminskih kiselina (*p*-kumarinska, kafeinska i glukozid ferulinske kiseline). Ovaj makromolekularni kompleks značajan je zbog antioksidacijskih i kemopreventivnih svojstava (Corbin i sur., 2015).

Sastav fenolnih spojeva u uzorcima pogače lana tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta nakon ekstrakcije mikrovalovima određen je HPLC metodom, a rezultati su prikazani u tablici broj 4. Od fenolnih spojeva identificirani su sekoizolarikirezinol diglukozid, glukozid ferulinske kiseline i glukozid *p*-kumarinske kiseline.

Prema literaturnim navodima, najdominantniji fenolni spoj u pogači lana je lignan sekoizolarikirezinol diglukozid (Al-Jumaily i sur., 2012; Kraushofer i Sontag, 2002). SDG čini oko 62 % makromolekule, glukozid ferulinske kiseline oko 9 %, a glukozid *p*-kumarinske kiseline 12 % (Struijs i sur., 2009). U ovom eksperimentalnom radu također najveći udio fenolnih spojeva čini sekoizolarikirezinol diglukozid. Najviša koncentracija SDG-a zabilježena je kod uzorka L (ultrazvuk pri amplitudi 100 % u vremenu od 9 minuta) gdje je iznosila 256,3 mg/100 g, a najmanja koncentracija kod uzorka G (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 9 minuta) u iznosu od 209,8 mg/100 g. U odnosu na kontrolni uzorak P, porast koncentracije SDG-a zabilježen je jedino kod uzorka L (0,2 %) dok je kod svih ostalih uzoraka zabilježen pad koncentracija (najveći pad kod uzorka G od 17,98 %). U istraživačkom radu Beejmohuna i suradnika (2007) koristeći se ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom i mikrovalovima dobivena je koncentracija SDG-a u iznosu od 1560 mg/100 g.

Lanene sjemenke predstavljaju jedan od najbogatijih biljnih izvora SDG-a. U istraživačkom radu Nemes i Orsat (2012) provedena je usporedba koncentracija SDG-a izoliranih iz različitih sjemenki – lanene sjemenke sadržavale su 1460 - 1890 mg SDG/100 g sjemenki, sjemenke sezama 18 - 189 mg SDG/100 g sjemenki, chia sjemenke 99 – 129 mg SDG/100 g sjemenki, suncokretove sjemenke 4,6 mg SDG/100 g sjemenki i badem 2,9 mg SDG/100 g sjemenki.

Što se tiče glukozida ferulinske kiseline, najveći porast koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak P zabilježen je kod uzorka D (ultrazvuk pri amplitudi 100 % u vremenu od 6 min) u iznosu od 32,6 mg/100 g, odnosno porast koncentracije za 49,54 %. U ostalim analiziranim uzorcima također je došlo do rasta koncentracije iste kiseline. Najveći porast koncentracije spoja glukozid *p*-kumarinske kiseline imao je također uzorak D (ultrazvuk pri amplitudi 100 % u vremenu od 6 min) i to za 39,69 % u odnosu na kontrolni uzorak P. Kao i kod glukozida ferulinske kiseline, svi ostali uzorci imali su rast koncentracije ovog spoja. U istraživačkom radu Beejmohuna i suradnika (2007) koristeći se ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom i mikrovalovima dobivena je koncentracija ferulinske kiseline u iznosu 370 mg/100 g dok je koncentracija *p*-kumarinske kiseline iznosila 280 mg/100 g. Kraushofer i Sontag (2002) u svom radu su kao metodu ekstrakcije koristili alkalnu i enzimsku hidrolizu te su kao rezultat dobili oko 150 mg/100 g *p*-kumarinske kiseline i oko 100 mg/100 g ferulinske kiseline.

Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ovom radu iznosi 498,4 – 594,6 mg/100 g. Udio ukupnih fenola pogače lana tretirane samo kriogenim mljevenjem u diplomskom radu Kuraica (2019) iznosi 497,6 – 564,9 mg/100 g. U diplomskom radu Alilović (2019) obrađena je slična tematika, odnosno ispitan je utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta i kriogenog mljevenja na antioksidacijska svojstva pogače uljane repice pri čemu je koncentracija ukupnih fenola iznosila 1721,14 - 2256,59 mg/100 g. Cvitanić (2016) je u svom radu ispitala utjecaj mikrovalno-ultrazvučne ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva komine masline te je kao rezultat dobila 132,89 – 1363,39 mg/100 g.

Zbirno gledajući, koncentracija ukupnih fenolnih spojeva naspram kontrolnog uzorka P povećala se u uzorcima C, F, H, I, J, L i M, najviše u uzorku L (ultrazvuk pri amplitudi 100 % u vremenu od 9 minuta) i to za 3,44 %. Kod uzoraka A, B, D, E, G i K došlo je do smanjenja koncentracije pri čemu se najveći pad dogodio kod uzorka G (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 9 minuta) u iznosu od 13,29 %. Tijekom provođenja eksperimentalnog dijela, radi ljudske pogreške, došlo je do gubitka male količine uzorka G (nakon centrifugiranja, u fazi prelijevanja uzorka iz kivete u odmjernu tikvicu) samim time vjerojatno i određene količine fenolnih spojeva. Nadalje, povećanje temperature tijekom ultrazvuka pogoduje procesu ekstrakcije, ali može dovesti i do hidrolize i oksidacije fenolnih spojeva (Prior i sur., 2005). Ova

konstatacija potvrđena je i u ovom radu. Temperatura uzorka G nakon tretmana ultrazvukom bila je među najvišima (82,6 °C) zbog čega je vjerojatno došlo do hidrolize i oksidacije fenolnih spojeva i tako uzrokovalo najveći pad u konačnim rezultatima. S druge strane, uzorku L izmjerena je najviša temperatura nakon provedenog ultrazvuka (86,1 °C) pri čemu je u ovom slučaju temperatura pogodovala samoj ekstrakciji te je tako posljedično dobiven najveći porast ukupnih fenolnih spojeva.

Povezanost između vremena trajanja tretmana ultrazvuka i koncentracije ukupnih fenolna nije utvrđena u ovom radu. U istraživanju Carrea i sur. (2012) također je utvrđeno da vrijeme trajanja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na ekstraktima grožđa značajno ne utječe na prinos fenolnih spojeva. Ponekad kraće vrijeme tretmana ultrazvuka nije dovoljno da bi se razorile stijenke stanica i tako oslobodili fenoli iz staničnih dijelova. S druge strane, produljenjem vremena tretiranja može doći do degradacije fenolnih spojeva. Stoga je potrebno optimirati uvjete ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta.

Udio fenolnih spojeva važan je pokazatelj nutritivne vrijednosti i oksidacijskih promjena. Sastav i koncentracija fenolnih spojeva u lanenim sjemenkama ovise o sorti, području uzgoja, klimi, količini padalina i načinu dobivanja ulja, odnosno tehnološkim uvjetima (Alu'datt i sur., 2013). Kraushofer i Sontag (2002) također navode kako način ekstrakcije predstavlja bitan faktor u dobivanju konačne količine fenolnih spojeva.

Tablica 4. Sastav i koncentracija (mg/100 g) fenolnih spojeva u pogači lana mljevenoj s hlađenjem i tretiranoj ultrazvukom

FENOLNI SPOJ [mg/100 g]	UZORAK													
	P	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
SDG	255,8 ± 0,4	248,8 ± 0,2	246,1 ± 2,5	249,9 ± 0,6	237,7 ± 0,5	212,8 ± 0,1	247,3 ± 0,4	209,8 ± 0,5	253,1 ± 0,7	245,3 ± 0,2	248,6 ± 0,8	223,6 ± 0,3	256,3 ± 0,8	249,1 ± 0,3
glukozid-ferulinske kiseline	21,8 ± 0,2	27,6 ± 0,2	27,7 ± 0,3	28,2 ± 0,5	32,6 ± 0,2	29,0 ± 0,2	29,8 ± 0,4	28,3 ± 0,2	27,9 ± 0,3	30,0 ± 0,2	31,7 ± 0,3	31,0 ± 0,3	29,8 ± 0,2	31,8 ± 0,2
glukozid- <i>p</i> - kumarinske kiseline	25,7 ± 0,2	30,2 ± 0,4	30,6 ± 0,1	30,8 ± 0,4	35,9 ± 0,1	32,5 ± 0,1	33,3 ± 0,2	31,7 ± 0,3	31,0 ± 0,4	33,5 ± 0,2	35,6 ± 0,4	34,9 ± 0,3	33,7 ± 0,1	35,7 ± 0,3
neidentificirani spojevi	271,5 ± 1,5	248,2 ± 0,2	257,1 ± 2,7	271,2 ± 0,7	252,9 ± 0,5	234,1 ± 0,2	268,8 ± 0,5	228,6 ± 0,6	275,0 ± 0,8	266,8 ± 0,2	268,0 ± 0,8	246,8 ± 0,3	274,8 ± 0,3	264,3 ± 2,1
UKUPNO	574,8 ± 2,4	554,7 ± 0,2	561,5 ± 5,4	580,1 ± 0,4	559,1 ± 0,8	508,4 ± 0,0	579,2 ± 1,4	498,4 ± 1,6	587,0 ± 2,1	575,7 ± 0,9	583,9 ± 2,4	536,2 ± 1,2	594,6 ± 1,1	581,0 ± 2,9

4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA

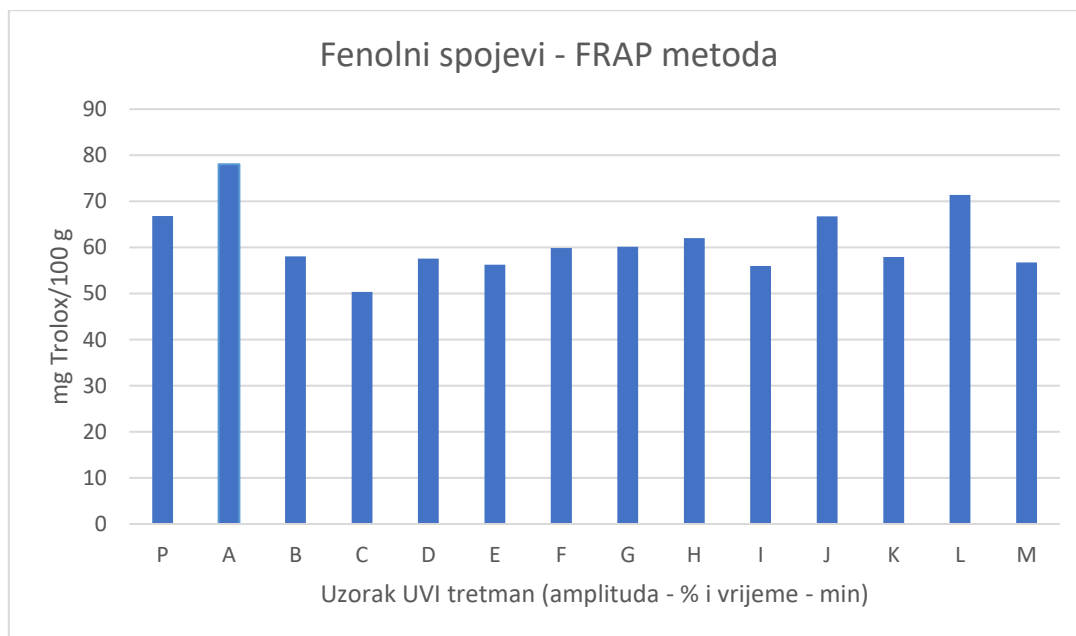
Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva određena je pomoću FRAP metode. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva određuje se pomoću baždarnog dijagrama pripremljenog od svježe Trolox otopine određenog raspona koncentracija. Rezultati FRAP metode prikazani su na slici 4, a antioksidacijska aktivnost izražena je kao mg Trolox/100 g uzorka.

Povećanje antioksidacijske aktivnosti uočeno je samo u A i L uzorcima. U odnosu na kontrolni uzorak P, najveću antioksidacijsku aktivnost ima uzorak A (ultrazvuk pri amplitudi 80 % u vremenu od 6 minuta) koja iznosi 78,05 mg Trolox/100 g uzorka, odnosno predstavlja povećanje za 16,82 %. Ostali uzorci bilježe pad antioksidacijske aktivnosti pri čemu je najveći pad opažen pri C uzorku koji je bio tretiran ultrazvukom pri amplitudi od 100 % u vremenu od 3 minute (pad od 24,64 % u odnosu na kontrolni uzorak P).

Zanimljivo je uočiti kako uzorak L koji ima najveći udio ukupnih fenolnih spojeva te najveći udio SDG-a ima i jednu od najvećih antioksidacijskih aktivnosti. Rezultati dobiveni FRAP metodom nisu u skladu s literaturnim navodima koji ukazuju na postojanje statistički značajne korelacije između porasta koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu pogače lana i porasta antioksidacijske aktivnosti (Pag i sur., 2014; Zanwar i sur., 2010). Najveći doprinos antioksidacijskoj aktivnosti daje SDG, a u manjoj količini i fenolne kiseline, posebice *p*-kumarinska i ferulinska kiselina te flavonoidi (Yuan i sur., 2008). U svim uzorcima udio neidentificiranih spojeva manji je od udjela zbroja tri glavna fenolna spoja (SDG, glukozida *p*-kumarinske i glukozida ferulinske kiseline), no unatoč tome nije zabilježen porast antioksidacijske aktivnosti u svim uzorcima. S obzirom da je porast antioksidacijske aktivnosti zabilježen samo kod dva uzorka, nije moguće utvrditi trend po kojem se povećava vrijednost antioksidacijskog kapaciteta. Kriogeno mljevenje trebalo bi utjecati na smanjenje veličine čestica pogače, odnosno povećanje ukupne aktivne površine, što bi za posljedicu imalo povećanje koncentracije sterola, fenolnih spojeva te antioksidacijske aktivnosti.

Rezultati FRAP-a mogu varirati ovisno o vremenu trajanja analize. Najniža antioksidacijska aktivnost određena je pri vremenu trajanja tretmana ultrazvuka od 3 minute. S druge strane, najviša aktivnost zabilježena je pri vremenu od 6 i 9 minuta. Brzo reagirajući fenoli koji vežu željezo ili se razgrađuju na spojeve s manjom reaktivnošću, najbolje se analiziraju u kratkim retencijskim vremenima, a fenolni spojevi koji reagiraju sporije zahtijevaju duže retencijsko vrijeme (Prior i sur., 2005). Kuraica (2019) navodi kako antioksidacijska aktivnost lanene

pogače raste porastom vremena mljevenja te je veća za uzorke koji su bili kriogeno mljeveni u odnosu na uzorke mljevene pri sobnoj temperaturi.



Slika 4. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva određena FRAP metodom

5. ZAKLJUČAK

- Ultrazvuk visokog intenziteta je djelovao na porast koncentracije glukozida ferulinske kiseline i glukozida *p*-kumarinske, dok značajniji učinak ekstrakcije sekoizolarikirezinol diglukozida (SDG) nije ostvaren.
- Ultrazvuk visokog intenziteta pri amplitudi 100 % u vremenu od 6 min pokazao se kao najefikasniji tretman za ekstrakciju glukozida ferulinske kiseline i glukozida *p*-kumarinske kiseline, a za sekoizolarikirezinol diglukozid pri amplitudi 100 % u vremenu od 9 minuta.
- Uzorak s najvećim udjelom ukupnih fenolnih spojeva te najvećim udjelom SDG-a ima i jednu od najvećih antioksidacijskih aktivnosti.

6. LITERATURA

Alilović V. (2019) Utjecaj kriomlina i ultrazvuka na antioksidacijsku aktivnost pogače uljane repice. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Al-Jumaily E., Al-Shimary A. O. A., Shubbr E. K. (2012) Extraction and Purification of lignan compound from flax seed *Linum usitatissimum*. *Asian Journal of Plant Science and Research* **2** (3): 306-312.

Alu'datt M. H., Rababah T., Ereifej K., Alli I. (2013) Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. *Food Chemistry* **139** (1-4): 93-99.

Anonymous 1 (2020) Lan (lat. *Linum usitatissimum* L.) <<https://www.alamy.com/stock-photo/linum-usitatissimum-illustration.html>> Pristupljeno 16. ožujka 2020.

Beejmohun V., Fliniaux O., Grand É., Lamblin F., Bensaddek L., Christen P., Mesnard F. (2007) Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* **18** (4): 275-282.

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

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

Berend S., Grabarić Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **59**: 205-212.

Carrea C., Ruiz-Rodríguez A., Palma M., Barroso C. G. (2012) Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica chimica acta* **732**: 100-104.

Chemat F., Huma Z., Kamran Khan M. (2010) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonic Sonochemistry* **18** (2011): 813-835.

Corbin C., Fidel T., Leclerc E. A., Barakzoy E., Sagot N., Falguières A., Renouard S., Blondeau J., Ferroud C., Doussot J., Lainé E., Hano C. (2015) Development and validation of an efficient

- ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry* **26**: 176-185.
- Cvitanić M. (2016) Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-Biotehnološki fakultet.
- Dai J., Mumper R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**: 7313-7352.
- Djaković S. (2017) HPLC. Nastavni materijal. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Essam F. A., Ali O. A. A., Esmail K. S. (2012) Extraction and Purification of lignan compound from flax seed *Linum usitatissimum*. *Asian Journal of Plant Science and Research* **2** (3): 306-312.
- Fang Y., Yang S., Wu G. (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* **18**, 872-879.
- Goyal A., Sharma V., Upadhyay N., Gill S., Sihag M. (2014) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of Food Science and Technology* **51**(9): 1633-1653.
- Greenwald P., Clifford C. K., Milner J. A. (2001) Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer* **37**:948–965.
- Habuš M. (2018) Utjecaj kriomljevenja na veličinu čestica i bioaktivne spojeve prosija prosa. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Johnsson P. (2004) Phenolic compounds in flaxseed. PhD Thesis. University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Kostić M. (2017) Liquid nitrogen application for cryogenic grinding and obtaining fine powder of rubber, thermoplastics, spices or pharmaceutical products. *Zbornik Međunarodnog kongresa o procesnoj industriji- Processing* **23**: 2-5.
- Kraushofer T., Sontag G. (2002) Determination of some phenolic compounds in flax seed and nettle roots by HPLC with coulometric electrode array detection. *European Food Research and Technology* **215**: 529-533.
- Krimer Malešević V. (2017) Fenolni potencijal uljanih pogača. Doktorski rad. Novi Sad: Tehnološki fakultet.

Kuraica I. (2019) Utjecaj kriomljevenja na sastav fenola, sterola i antioksidacijsku aktivnost pogače lana. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Lovrić T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, 1. izdanje, Hinus. 282. str.

Mandić V. (2017) Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Microsoft Inc. (2013) Microsoft Excel, verzija 2013

Nemes S. M., Orsat V. (2012) Evaluation of a Microwave-Assisted Extraction Method for Lignan Quantification in Flaxseed Cultivars and Selected Oil Seeds. *Food Analytical Methods* **5**: 551-563.

Oomah B. D., Mazza G. (1993) Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry* **48**: 109–114.

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

Peterson J., Dwyer J., Adlercreutz H., Scalbert A., Jacques P., McCullough M. L. (2010) Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews* **68**: 571-603.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2019) *Narodne novine* **11** (NN 11/2019)

Prior R. L., Wu X., Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (10): 4290-4302.

Przybylski R. (2005) Flax Oil and High Linolenic Oils. Bailey`s Industrial Oil and Fat Products, 6. izd., Bailey A. E., John Wiley & Sons, Inc. str. 281-298.

Radojčić Redovniković I. (2016) HPLC niskomolekulskih spojeva. Nastavni materijal. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Režek Jambrak A., Lelas V., Herceg Z., Badanjak Sabolović M., Werner Z. (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kemija u industriji* **59** (4): 169-177.

Sharav O., Shim Y. Y., Okinyo-Owiti D., Sammynaiken R., Reaney J. T. (2014) Effect of cyclolinopeptides on the oxidative stability of flaxseed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 88-96.

Singh K. K., Goswami T. K. (1999) Design of a cryogenic grinding system for spices. *Journal of Food Engineering* **39** (4), 359 - 368.

Struijs K., Vincken J. P., Doeswijk T. G., Voragen A. G., Gruppen H. (2009) The chain length of lignan macromolecule from flaxseed hulls is determined by the incorporation of coumaric acid glucosides and ferulic acid glucosides. *Phytochemistry* **70** (2): 262-269.

Škevin D. (2019) Pogače, sačme i sirovo ulje. Nastavni materijal. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Udenigwe C. C., Aluko R. E. (2010) Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high Fischer ratio peptide mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58** (8): 4762–4768.

Yuan J. P., Li X., Xu S. P., Wang J. H., Liu X. (2008) Hydrolysis kinetics of secoisolariciresinol diglucoside oligomers from flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 10041-10047.

Zanwar A. A., Hegde M. V., Bodhankar S. L. (2010) In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Linum usitatissimum*. *Pharmacology* **1**: 683-696.

Izjava o izvornosti

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

Antonija Tomšić

ime i prezime studenta