

Probavljivost i antioksidacijska aktivnost hidrolizata pogača uljarica

Barišić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:562818>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Marija Barišić

1118/PI

**PROBAVLJIVOST I
ANTIOKSIDACIJSKA
AKTIVNOST HIDROLIZATA
POGAČA ULJARICA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr.sc. Sandre Balbino.

Diplomski rad izrađen je 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

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Sandri Balbino na strpljenju, svoj pruženoj pomoći, pristupačnosti i prenesenom znanju prilikom izrade ovoga rada. Zahvaljujem se također svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju ulja i masti i Laboratorija za kemiju i tehnologiju žitarica koji su pomogli prilikom izrade rada te na prijateljskom i pozitivnom okruženju.

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci, razumijevanju i pruženoj pomoći tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za kemiju i tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PROBAVLJIVOST I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST HIDROLIZATA POGAČA ULJARICA

Marija Barišić, 1118/PI

Sažetak: *Pogače buče, kao i pogače uljane repice, nastaju kao nusproizvodi prilikom proizvodnje ulja te sadrže visok udio proteina i antioksidanasa. Kako bi se povećala iskoristivost nusproizvoda, a i smanjila količina otpada, povećava se broj istraživanja koja se provode u svrhu povećanja upotrebe nusproizvoda iz prehrambenih industrija u proizvodnji funkcionalno obogaćenih proizvoda. Cilj ovoga rada bio je provesti enzimsku hidrolizu pogača uljarica (pogača buče i uljane repice) te hidrolizatima ispitati stupanj hidrolize, antioksidacijsku aktivnost (FRAP i DPPH metodom), te odrediti in vitro probavljivost proteina. Provedena enzimska hidroliza s proteazom na pogačama uljarica, pri istim uvjetima hidrolize, pokazala je različiti utjecaj na pogače buče i uljane repice. Hidrolizati proteina pogače uljane repice pokazuju znatno veću antioksidacijsku aktivnost od hidrolizata pogače buče, dok hidrolizati pogače buče pokazuju veću probavljivost proteina od hidrolizata pogače uljane repice.*

Ključne riječi: hidroliza, pogača buče, pogača uljane repice, antioksidacijska aktivnost, probavljivost

Rad sadrži: 46 stranice, 17 slika, 3 tablice, 54 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *prof. dr. sc. Sandra Albino*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 29. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

DIGESTIBILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HYDROLYZATE CAKE OILSEEDS

Marija Barišić 1118/PI

Abstract: *Pumpkin cakes, as well as rapeseed cakes, are formed as by-products in oil production and contain a high proportion of protein and antioxidants. In order to increase the usability of by-products, and to reduce the amount of waste, the number of studies conducted to increase the use of by-products from the food industry in the production of functionally enriched products is increasing. The aim of this study was to perform enzymatic hydrolysis of oilseeds (pumpkin and oilseed rape) and to examine the degree of hydrolysis, antioxidant activity (FRAP and DPPH method), and to determine in vitro digestibility of proteins. Conducted enzymatic hydrolysis with protease on oilseed cakes, under the same hydrolysis conditions, showed different effects on pumpkin and oilseed rape cakes. Rapeseed cake protein hydrolysates show significantly higher antioxidant activity than pumpkin cake of proteins hydrolysates, while pumpkin cake hydrolysates show higher digestibility of proteins than rapeseed cake hydrolysates.*

Keywords: hydrolysis, pumpkin cake, rapeseed cake, antioxidant activity, digestibility

Thesis contains: 46 pages, 17 figures, 3 tables, 54 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Sandra Balbino, Full professor*

Reviewers:

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

Thesis defended: 29 September 2021

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BUČA	2
2.2. POGAČA BUČE	3
2.3. ULJANA REPICA.....	4
2.4. POGAČA ULJANE REPICE	5
2.5. KRIOGENO MLJEVENJE	6
2.6. PROTEINI	7
2.6.1. Hidroliza proteina	7
2.7. GLJIVIČNA PROTEAZA A.....	8
2.8. ANTIOKSIDANSI	8
2.8.1. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti	9
2.8.2. DPPH	9
2.8.3. FRAP	11
2.9. LIOFILIZACIJA.....	12
2.10. PROBAVLJIVOST	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Uzorci.....	13
3.1.2. Kemikalije i standardi	13
3.1.3. Aparatura.....	14
3.2. METODE RADA	15
3.2.1. Kriogeno mljevenje.....	15
3.2.2. Ekstrakcija ulja po Soxhletu.....	15
3.2.3. Određivanje proteina metodom po Kjeldahlu	16
3.2.4. Hidroliza uzoraka	17
3.2.5. Određivanje stupnja hidrolize	18
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	19
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	20
3.2.8. Liofilizacija hidroliziranih uzoraka.....	21
3.2.9. Određivanje probavljivosti.....	21
3.2.10. Statistička analiza	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. ODREĐIVANJE PROTEINA	23
4.2. REZULTATI HIDROLIZE PROTEINA.....	24
4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST HIDROLIZIRANIH POGAČA ULJARICA	28
4.3.1. DPPH	28
4.3.2. FRAP	30
4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA PROBAVLJIVOSTI	35
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

U današnje vrijeme globalnog rasta stanovništva i ubrzanog načina života raste svijest o dobrobitima zdrave prehrane. Ljudi sve više posežu za nutritivno obogaćenim i funkcionalnim proizvodima. Povećana potreba za hranom rezultira sve većom proizvodnjom, a prilikom proizvodnje i prerade hrane nastaje velika količina nusprodukata koji se koriste kao stočna hrana, izvor fitonutrijenata i prirodnih antioksidanasa i sirovine za proizvodnju biogoriva.

Nusproizvodi prehrambene industrije poput tropa jabuke, nusproizvodi iz prerade šećerne repe i pivski trop bogati su izvor polifenola, β -glukana i vlakana. Međutim, velike količine nusprodukata i dalje završe kao otpad koji osim gospodarskog gubitka predstavlja i ekološki problem. S ciljem da se smanji količina otpada iz industrija i poveća iskoristivost nusprodukata u proizvodnji hrane posljednjih nekoliko godina provedena su brojna istraživanja. U radu Tarek-Tilistyák i sur. (2014), iskorišten je nusprodukt prerade uljarica, bučina pogača zajedno s pogačom uljane repice, žutog lana i oraha, za obogaćivanje kruha. Iz pogače uljane repice ekstrahirani su hidrolizati proteina koji su 2013 od strane EFSA – e predstavljani kao nova hrana (EFSA, 2013).

Uljana repica, kao i buča, spada u skupinu uljarica. Sjeme uljane repice sadrži 40-49 % ulja te 18–25 % bjelančevina (PFOS, 2015) dok sjeme buče, ovisno o samoj sorti, sadrži od 33-50 % ulja i 26-45 % bjelančevina (Neđeral, 2008). One također sadrže vitamine, minerale, fenolne spojeve, vlakna i druge sastojke. Tradicionalno se uzgajaju za proizvodnju sjemena koje se koristi u proizvodnji ulja. Tijekom prerade uljarica odnosno prešanjem sjemena uljarica izdvaja se ulje i zaostaje pogača kao nusproizvod. U pogačama uljarica zaostaje visok udio bjelančevina, ali zaostaje i određena količina ulja te su stoga pogače dobar izvor antioksidanasa i esencijalnih masnih kiselina. Kako bi se poboljšala funkcionalna svojstva proteina zaostalih u pogači uljarica, provodi se hidroliza proteina te je nastalim hidrolizatima poboljšana topljivost, probavljivost i funkcionalnost (Munson i sur., 2020).

Stoga je cilj ovoga rada provesti hidrolizu proteazom na uzorcima pogače buče i uljane repice, a zatim ispitati utjecaj količine enzima te utjecaj vremena i temperature na stupanj hidrolize, antioksidacijska svojstva te probavljivost hidrolizirane buče.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BUČA

Buča (tikva, bundeva) je jednogodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici *Cucurbitaceae*, rod *Cucurbita* (Ivanek-Martinčić, 2019). Obitelj *Cucurbitaceae* obuhvaća oko 900 vrsta svrstanih u 118-122 roda, koji su rasprostranjeni širom svijeta, no većina ih raste u tropskim predjelima (Simpson, 2010). Buča se danas koristi u raznim granama industrije. Mesnati dio buče koristi se za ljudsku prehranu, kao stočna hrana te u poljoprivredi za zelenu prihranu, te se koristi i u farmaceutskoj industriji, a sjemenke buče koriste se u proizvodnji ulja. Prema građi sjemenki postoje dvije vrste buče. Buče čije je sjeme obloženo čvrstom celuloznom ljuskom bijele, blijedožute ili svijetlosmeđe boje i buče čije je sjeme obavijeno samo tankom tamnozelenom ili sivo-zelenom opnom (tzv. golice) (Ivanek-Martinčić, 2019).



Slika 1. Sjemenke buče i buča (vlastita fotografija)

Buče (slika 1) su nutritivno bogate i ljekovite biljke, no kemijski sastav pojedine biljke varira te ovisi o vrsti biljke, načinu uzgoja te o okolišu. Čimbenici koji pridonose hranjivoj i ljekovitoj vrijednosti mesa buče su udio karotenoida >80 % i β -karotena, kao i prisutnost pektina i ne pektinskih polisaharida, minerali (kalij, fosfor, magnezij, željezo i selen), vitamini (C, E, K, tiamin (B₁) i riboflavin (B₂)), proteine, prehrambena vlakna, fenolni spojevi (flavonoidi i fenolne kiseline) i druge aktivne tvari korisne za ljudsko zdravlje (Ayyildiz, 2019). Sjemenke buče, iz kojih se dobiva pogača, bogat su izvor omega masnih kiselina, minerala i vitamina te smiruju upale mokraćnog mjehura i prostate kod starijih muškaraca (Organic Bridge, 2019). Dokazano je antioksidativno i ACE-inhibitorno djelovanje proteina (kukurbitina) i proteinskih izolata dobivenih iz sjemena *C. pepo*. Proteini i peptidi oslobođeni iz mošusnih sjemenki bundeve (*C. moschata*) djeluju protugljivično, antimikrobno i hipoglikemijski (Kotecka-Majchrzak, 2020).

2.2. POGAČA BUČE

Pogača buče (slika 2) je nusproizvod u preradi uljarica koji zaostaje nakon ekstrakcije ulja. Pogače su visokovrijedna koncentrirana stočna krma i tradicionalno se najviše koriste u proizvodnji hrane za životinje, no njihova iskoristivost u ljudskoj prehrani još uvijek je niska.



Slika 2. Bučino brašno (Anonymus 1)

Tijekom ekstrakcije ulja, iz koštica buče, u pogači zaostaje određena količina ulja, proteina, minerala, vlakana i drugi sastojaka kojima je i sama koštica bogata (Moslavac, 2017) te kemijski sastav pogače zavisi o zaostalim sastojcima, udjelu ljuske i samoj sorti buče (Zorić, 2016). Zbog visokog udjela proteina (60 – 65 %), koji zaostaje u pogači, one se koriste kao sirovina za izolaciju proteina i proteinskih izolata ili koncentrata. Osim proteina bogate su i fenolnim tvarima (Vaštag i sur., 2010). Fenolne tvari koje zaostaju u pogači imaju antioksidacijsko djelovanje, a značajnu antioksidacijsku aktivnost pokazuju i hidrolizati proteina (Vaštag i sur., 2011). Nekoliko radova prikazuje primjenu bučine pogače u ljudskoj prehrani. U radu Voučko (2018) ispitana je upotreba pogače buče u proizvodnji pekarskih proizvoda za oboljele od celijakije i šećerne bolesti. Bučina pogača je u radu Tarek-Tilistyák i sur. (2014) korištena kao sastojak za obogaćivanje kruha, zajedno sa pogačom suncokreta, žutog lana i oraha. Pogače buče i drugih uljarica se prema tome mogu koristiti za obogaćivanje drugih pekarskih proizvoda i tako povećati ponudu funkcionalne hrane (Novak, 2017).

2.3. ULJANA REPICA

Uljana repica, *Brassica napus* L., jednogodišnja je biljka (slika 3) koja spada u obitelj kupusnjača *Brassicaceae*, te se uzgaja kao uljna i krmna kultura (Maraš, 2011). Sjeme uljane repice je jedna od najvažnijih uljarskih kultura i osigurava više od 13 % svjetske opskrbe biljnim uljem (Li i Olsen, 2016). Zrno uljane repice sadrži 40 – 49 % ulja te 18 – 25 % bjelančevina. Repičino sjeme sadrži glukozinolate koji se prilikom oštećenja staničnog tkiva i pod utjecajem mirozinaze razgrađuje te tako nastaju aktivne tvari tiocijanat, izotiocijanat i nitril, koje su odgovorne za gorak i oštar okus. U proizvodnji ulja koriste se tzv. 00 – kultivari (Škevin, 2018) koji sadrže gotovo zanemarive količine eruka kiseline i glukozinolata.



Slika 3. Uljana repica (vlastita fotografija)

2.4. POGAČA ULJANE REPICE

Prilikom proizvodnje ulja prešanjem iz termički obrađenog zrna uljane repice, nastaje nusproizvod odnosno pogača uljane repice (slika 4)



Slika 4. Pogača uljane repice (Anonymus 2)

Pogača uljane repice sadrži oko 30-34 % proteina, 6-11 % masti, 27-30 % nedušične ekstraktivne tvari (NET), 10-13 % celuloze, a udio vlage joj je 10-13 % (Rac, 1964). Upotreba pogače uljane repice u ljudskoj prehrani i dalje je ograničena. Iako je pogača bogata fiziološki vrijednim bjelančevinama, upotreba u prehrani joj je ograničena zbog sadržaja vlakana i antinutrijenata, posebno fitinske kiseline, glukozinolata i fenolnih spojeva koji uzrokuju tamnu boju i gorak okus u proteinskim proizvodima (Fetzer i sur., 2018). U prehrani ljudi koristi se proteinski izolat uljane repice (estrahiran iz pogače repice). Ovaj proteinski izolat koristi se u proizvodnji proteinskih pića, mješavina juha, žitarica za doručak, zatim za poboljšanje teksture prehrambenih proizvoda, npr. pekarskih proizvoda, rashlađenih ili smrznutih mesnih proizvoda, tjestenina, deserata (EFSA, 2013)

2.5. KRIOGENO MLJEVENJE

Kriogeno (krio) mljevenje je napredna tehnologija mljevenja čiji je cilj zadržavanje korisnih komponenti i nastajanje proizvoda poboljšane kvalitete. Krio mljevenje je mljevenje u prisutnosti kriogenih tekućina poput tekućeg dušika, tekućeg kisika i tekućeg helija (Kaur i Srivastav, 2018). Mljevenje se provodi pri temperaturi vrelišta tekućeg dušika tj. pri otprilike 196 °C. Uzorak postaje lomljiviji i skloniji fragmentaciji od istoga uzorka prilikom mljevenja na sobnoj temperaturi (Voučko, 2018). Krio mljevenjem (slika 5), u radu Singh i Goswami (2000), utvrđeno je da mljevenjem klinčića pri temperaturama nižim od -5 °C dobiveno 29,5 % više ulja nego pri temperaturama 55-85 °C. Krio mljevenjem je također moguće dobiti veličinu čestica oko 50 µm (Voučko, 2018).



Slika 5. Kriomlin, spremnik s tekućim dušikom, kuglice i spremnik za uzorak (vlastita fotografija)

Mljevenjem žitarica i uljarica na kriomlinu postignuti su brojni pozitivni učinci. Kriogeno mljevenje ima pozitivan utjecaj na ekstrakciju bioaktivnih molekula, na način da mikronizacijom izaziva nestabilnost stanica te tada bioaktivne molekule postaju pristupačnije otapalu i olakšana je njihova izolacija. Također, krio mljevenjem ne dolazi do zagrijavanja materijala te na taj način ne dolazi do gubitka bioaktivnih spojeva osjetljivih na toplinu (Balbino i sur., 2019). U navedenom radu, također je utvrđeno da učinak kriogenog mljevenja ovisi o prirodi bioaktivnih molekula.

2.6. PROTEINI

Proteini (bjelančevine) su organske makromolekule građene od jednog ili više aminokiselinskih lanaca povezanih peptidnom vezom. Bjelančevine su osnovna građevna jedinica svakog organizma te su uključene u sve biokemijske procese unutar stanice. Bjelančevine svih živih bića izgrađene su od 20 aminokiselina, a redosljed aminokiselina u polipeptidnom lancu određen je genetičkim kodom. Funkcija proteina, a i njihova trodimenzijska građa uvjetovane su redosljedom aminokiselina. Redosljedom aminokiselina određuju se i nutritivna svojstva pojedinog proteina. Proteini su važna komponenta i u industriji hrane jer imaju višestruku funkciju. Proteini su također prirodni sastojci hrane biljnog i životinjskog podrijetla. U prerađenom stanju, u obliku izolata, koriste se kao sredstva za vezanje vode, za emulgiranje, obogaćivanje namirnica, popravljjanje viskoznosti namirnica itd. (Jašić, 2009).

2.6.1. Hidroliza proteina

Hidroliza je proces razgradnje složenih kemijskih spojeva u reakciji s vodom te dolazi do pucanja kovalentnih veza. Provodi se djelovanjem kiselina, lužina ili enzima. Hidrolizom proteina dolazi do razgradnje proteina na manje peptide ili se razgrađuju do aminokiselina. Hidrolizati proteina mnogih biljnih vrsta pokazuju pozitivne fiziološke promjene primjenom u ljudskoj prehrani (antioksidansi, antihipertenzivi, imunomodulatori). Smatraju se prirodnim bioaktivnim sastojcima funkcionalne hrane, lijekova i kozmetike. Danas najveću pažnju privlače hidrolizati s antioksidacijskim djelovanjem zbog potencijalne prirodne zamjene za umjetne antioksidanse u proizvodima za ljudsku upotrebu (Vaštag, 2010). Do danas su pripremljeni hidrolizati iz pogača mnogih uljarica kako bi se povećala vrijednost nusproizvoda te kako bi se smanjila količina nastalog otpada tijekom prerade uljarica (Tarek-Tilistyák i sur., 2014; Novak, 2017; EFSA, 2013). No, hidrolizati pogača buče i uljane repice te njihova primjena u industriji hrane nisu dovoljno istraženi.

2.7. GLJIVIČNA PROTEAZA A

Gljivična proteaza A je enzim koji se koristi u ljudskoj prehrani, a dobiven je iz bakterije *Aspergillus oryzae*. Proteaza A pokazuje i egzopeptidaznu i endopeptidaznu aktivnost koja uspješno hidrolizira većinu topljivih enzima. Učinkovitost ovoga enzima je pogodna i za biljne i za životinjske vrste. Gljivična proteaza A dostupna je u obliku bijelog do žutosmeđeg praha topivog u vodi. Aktivnost proteaze kreće se u rasponu pH 3,0 - 4, a optimalni pH je 3,2. Temperaturni raspon djelovanja ovoga enzima je 40 °C - 57 °C s time da je optimalna temperatura aktivnosti 55 °C. Stabilnost enzima je 18 mjeseci na suhom i hladnome mjestu. Primjena ovoga enzima je u dijetetskim dodacima hrani, u hrani i piću, koristi se za fermentaciju i modifikaciju proteina (Wishwanatha, 2009).

2.8. ANTIOKSIDANSI

Današnji način života uzrokuje velika mentalna opterećenja, stres, nedovoljno sna, jednoličnu prehranu te pretjeranu konzumaciju alkohola, cigareta i kave. Navedeni uvjeti doprinose porastu oksidacijskog stresa u organizmu. Oksidacijski stres je poremećaj ravnoteže između proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala i antioksidanasa. Do poremećaja ravnoteže dolazi ukoliko je smanjena aktivnost antioksidanasa ili je pak povećana proizvodnja slobodnih radikala. Slobodni radikali nastaju u stanici ili se mogu unijeti hranom. Slobodni radikali su nestabilne molekule ili ioni koji stupaju u kemijske reakcije sa staničnim dijelovima (proteini, masti, ugljikohidrati, molekule DNA) pri čemu dolazi do poremećaja biokemijskih, funkcionalnih i strukturnih funkcija (Parčetić-Kostelac i sur., 2016).

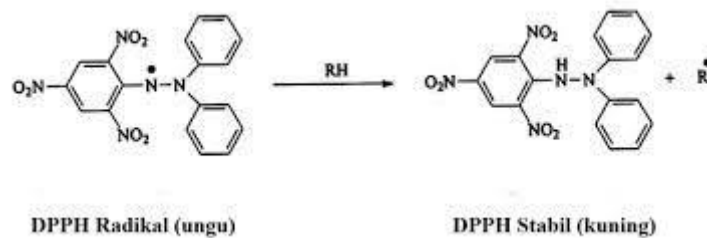
Antioksidansi su prirodne (vitamini, fenoli, flavanoidi) ili sintetske molekule (BHT) koje inhibiraju slobodne radikale. Prisutnost antioksidanasa u industriji hrane je najčešće u obliku raznih dodatka prehrani. No, upotreba antioksidanasa je zastupljena i u farmaceutskoj industriji te se koriste i kao konzervansi za produljenje trajnosti proizvoda u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Bošnjaković, 2017).

2.8.1. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se različite analitičke metode čiji su princip rada i kategorija prikazani u tablici 1.

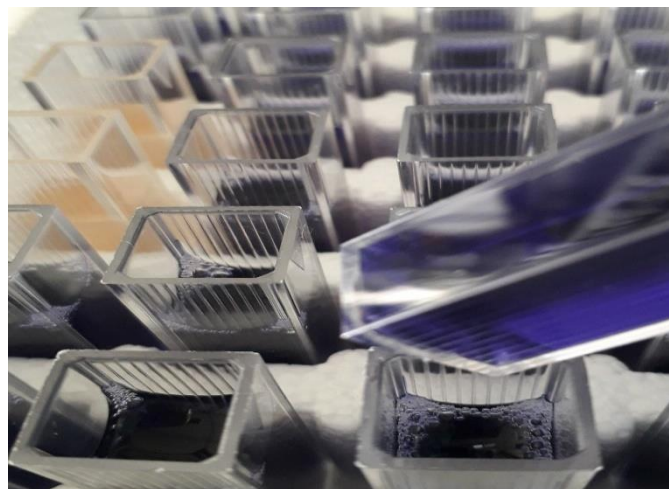
2.8.2. DPPH metoda

DPPH metodu za određivanje antioksidacijske aktivnosti prvi puta su u svome istraživanju upotrijebili Brand-Williams i sur. (1995). Metoda se temelji na redukciji slobodnih DPPH radikala antioksidansom koji služi kao donor atoma vodika ili elektrona (slika 6).



Slika 6. Mehanizam reakcije antioksidansa s DPPH radikalom (preuzeto Brand-Williams i sur., 1995.)

Stabilni DPPH radikal ima ljubičastu boju, a u prisutnosti spojeva, koji mogu prenijeti elektron, mijenja boju u žutu (slika 7). Redukcija radikala praćena je spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 517 nm.



Slika 7. DPPH u uzorcima (vlastita fotografija)

Tablica 1. Pregled metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti (preuzeto iz Butković, 2018)

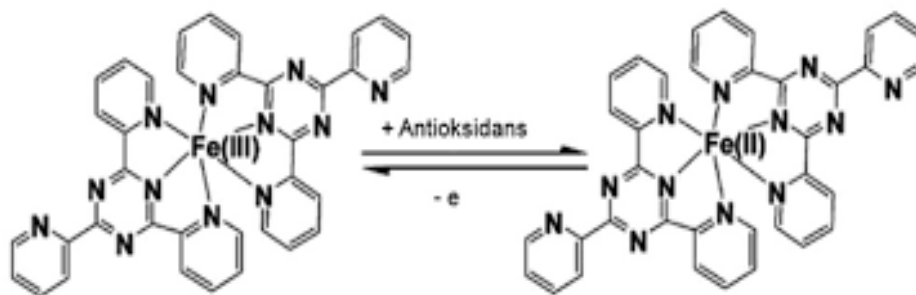
Vrsta metode	Princip rada	Određivanje završne točke
<u>Spektrofotometrija</u>		
DPPH	Reakcija antioksidansa s organskim radikalom	Kolorimetrija
ABTS	Reakcija antioksidansa s kationskim radikalom	Kolorimetrija
CUPRAC	Redukcija Cu(II) u Cu(I) pomoću antioksidansa	Kolorimetrija
FRAP	Reakcija antioksidansa s Fe(III) kompleksom	Kolorimetrija
PFRAP	Reakcija kalijeva fericijanida s antioksidansom i Fe ²⁺ ionom	kolorimetrija
ORAC	Reakcija antioksidansa s peroksidnim radikalom	Gubitak fluorescencije fluoresceina
HORAC	Vežanje antioksidansa na OH radikale dobivene iz Co (Fentonova reakcija)	Gubitak fluorescencije fluoresceina
TRAP	Izbacivanje luminol-deriviranih radikala pomoću antioksidansa	Kemiluminiscencijski signal
<u>Elektrokemijske metode</u>		
Ciklička voltometrija	Potencijal radne elektrode pokazuje linearnost od početne do konačne vrijednosti, bilježi se trenutni intenzitet struje	Mjerenje intenziteta katodnog/anodnog pika
Amperometrija	Potencijal radne elektrode ima fiksnu vrijednost u odnosu na referentnu elektrodu	Mjerenje inteziteta struje
Biamperometrija	Reakcija analita s oksidiranim oblikom redoks para	Mjerenje struje između dvije iste radne katode
<u>Kromatografija</u>		
GC	Razdvajanje spojeva iz smjese temeljeno na podjeli između stacionarne faze i plinovite mobilne faze	Detekcija toplinske vodljivosti
HPLC	Razdvajanje spojeva iz smjese temeljeno na podjeli između čvrste stacionarne i mobilne faze, pri velikoj brzini i visokom tlaku mobilne faze	UV-VIS detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrokemijska reakcija

2.8.3. FRAP

FRAP je jednostavna, brza i precizna metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Metoda se temelji na redukciji Fe^{3+} iona TPTZ (željezo(III)-2,4,6-tri(2-piridil)-s-tirazin) u Fe^{2+} -TPTZ s antioksidansom. Rezultat reakcije prati se promjenom žutog obojenja u intezivno plavo obojenje u prisustvu antioksidansa (Benzie i Strain, 1996). Praćenje redukcije provodi se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 593 nm (reakcija prikazana jednadžbom 1).



Reakcija (slika 8) se odvija u kiselom mediju kako bi se osigurala dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji osigurava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Standardni redoks potencijal reakcije prelaska Fe^{3+} u Fe^{2+} iznosi 0,77 V pa bi stoga svi spojevi s nižim redukcijским potencijalom teoretski mogli ulaziti u reakcije redukcije željeza te na taj način doprinijeti konačnom rezultatu antioksidativnog kapaciteta (Benzie i Strain, 1996).



Slika 8. Reakcija Fe^{3+} u Fe^{2+} (Benzie i Strain, 1996)

2.9. LIOFILIZACIJA

Liofilizacija je proces sušenja namirnice u zamrznutom stanju. Postupak sušenja provodi se u tri faze: smrzavanje materijala, primarno sušenje (sublimacija) i sekundarno sušenje (desorpcija). Svaka faza sušenja zahtjeva posebnu pažnju, jer ovisno o uspješnosti sušenja u svakoj fazi ovisi kvaliteta i stabilnost proizvoda te i sama ekonomičnost procesa. Zamrzavanje namirnica može se provoditi na uobičajen način ili pak u rashladnim uređajima kojima imaju mogućnost zamrzavanja na niskim temperaturama. Također se zamrzavanje može provesti otparavanjem određene količine vode podvrgavanjem proizvoda odgovarajućem vakuumu, pri čemu oduzimanje topline isparavanja izaziva njegovo zamrzavanje (Šeler, 2007).

Postupak liofilizacije se koristi prilikom sušenja uzoraka s velikom količinom vode, kod uzoraka podložnih hidrolizi te kod termolabilnih uzoraka kod kojih se voda ne može ukloniti konvencionalnim načinom sušenja (Muzzio i Dini, 2011). Prednosti procesa su: produljena trajnost, male promjene boje, okusa i mirisa namirnice, dobra topljivost proizvoda u prahu, održanje strukture i vanjskog oblika. Proces liofilizacije se primjenjuje u raznim industrijskim granama, kemijskoj, prehrambenoj, biotehnološkoj te u farmaceutskoj industriji. U današnje vrijeme najveća primjena joj je u farmaceutskoj industriji. Liofilizarni uzorci (lioofilizati) su stabilniji te je na taj način omogućeno skladištenje i na sobnim temperaturama duži vremenski period.

2.10. PROBAVLJIVOST PROTEINA

Probavljivost proteina tradicionalno se ispituje *in vivo* pomoću štakora kao ispitanika. Njima je mjerena količina proteina u probavi nastala unosom proizvoda bogatih proteinima. Ovaj postupak mjerenja daje odgovarajuće rezultate, no proces je vrlo skup i dugotrajan (Rožan i sur., 1997). *In vivo* način ispitivanja je zabranjen prehrambenim tvrtkama i pojedincima koji podržavaju zabranu tretiranja na životinjama. U radu je korištena *in vitro* metoda probave proteina koja ima visoku povezanost s modelom probave štakora i koristi se isti standard kazeina kao potpuno probavljiva kontrola.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Materijali na kojima su provedena istraživanja u ovome diplomskome radu su pogača buče, proizvedena prešanjem sjemena buče u uljari Poljoposavec (Dunjkovac, Hrvatska), te pogača uljane repice dobivena laboratorijskim prešanjem sjemena uljane repice. Uzorci pojedine pogače najprije su usitnjeni na kriomlinu, a zatim je samljevenoj pogači uklonjeno ulje metodom po Soxhletu. Odmašćenim uzorcima pogače određen je udio proteina (metoda po Kjeldahlu) jer je ovisno o udjelu proteina i o planu provedbe analize, određena količina enzima za hidrolizu. Hidroliza uzoraka provedena je u dvije serije. U prvoj seriji hidroliziranim uzorcima pogače buče i uljane repice određen je stupanj hidrolize (titracijska metoda) te antioksidacijska aktivnost (FRAP, DPPH). Nakon provedene hidrolize uzoraka u drugoj seriji, uzorci su liofilizirani te im je ispitana probavljivost (*in vitro* enzimski digestija).

3.1.2. Kemikalije i standardi

Kemikalije i standardi korišteni u ovome radu su:

- ❖ Petroleter
- ❖ Kjeldah katalizator ($K_2SO_4 + CuSO_4$)
- ❖ Koncentrirana sumporna kiselina
- ❖ Vodikov peroksid (30%)
- ❖ Klorovodična kiselina (0.1 M, 0.06 M, 0.001 M)
- ❖ Destilirana voda
- ❖ Natrij hidroksid (0,05 M, 40%)
- ❖ Formaldehid (13%)
- ❖ DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil; 0,06 mM)
- ❖ Etanol
- ❖ Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina; 10 - 1000 mM)
- ❖ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mM)
- ❖ TPTZ (10 mM)
- ❖ Acetatni pufer (300 mM)
- ❖ Pepsin

- ❖ Tripsin
- ❖ Kimotripsin
- ❖ L – Glicin
- ❖ Ninhidrin reagens (2% otopina)
- ❖ Trikloroocetna kiselina (40% w/v)
- ❖ Tris pufer (1 M)
- ❖ Natrij – acetat pufer (50 mM)
- ❖ Alkohol (50 %)

3.1.3. Aparatura

Aparatura korištena za eksperimentalni dio ovoga rada je:

- ❖ Mlinac za kavu
- ❖ Vibracijski kriomlin + spremnik za tekući dušik (Retsch + Apollo, Njemačka)
- ❖ Aparatura po Soxhletu (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Analitička vaga (Kern d.o.o., Slovenija)
- ❖ Vodena kupelj s postoljem za trešnju (Stuart, Švedska)
- ❖ Blok za spaljivanje + aspiracijski modul (Tecator, Njemačka)
- ❖ Destilacijska jedinica Kjeldhal (Foss, Danska)
- ❖ Centrifuga Rotina 35 (Hettich, Njemačka)
- ❖ Centrifuga (Falcon, Colorado, SAD)
- ❖ Spektrofotometar (PerkinElmer, SAD)
- ❖ Liofilizator (Martin Christ alpha 1-4 LSC plus, Njemačka)
- ❖ Inkubator (Mettler, Njemačka)
- ❖ pH metar (Jenway, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- ❖ Vortex (IKA, Njemačka)
- ❖ Magnetska mješalica (IKA, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Kriogeno mljevenje

Pogača buče i pogača uljane repice najprije su ručno usitnjene, zatim su finije usitnjeni na mlinu za kavu, a na kraju je provedeno kriogeno mljevenje. Krio-mljevenje provedeno je prema unaprijed određenim uvjetima meljave. Odvagano je $8 \pm 0,1$ g uzorka u posudu za mljevenje kriomlina te je dodano 12 kuglica. Mljevenje je provedeno u 1 ciklusu tijekom 12 minuta, frekvencije udaraca i trenja 30 Hz. Mljevenje započinje spuštanjem temperature senzora na -196 °C te nakon isteka 3 min započinje meljava u trajanju od 12 min.

3.2.2. Ekstrakcija ulja po Soxhletu

Za ekstrakciju ulja iz pogača buče i uljane repice korištena je standardna HRN EN ISO metoda (659:2010) ekstrakcije po Soxhletu. Samljeveni uzorci pogača stavljeni su u čahure od filter papira (zbog lakše manipulacije uzorkom) koje su zatvorene i umetnute u čahure za ekstrakciju. Čahura je zatvorena vatom i stavljena je u aparaturu po Soxhletu te je dodana potrebna količina petroletera, koji je korišten kao otapalo za ekstrakciju (slika 9). Ekstrakt (ulje i otapalo) skupljen je u tikvicu u koju su prethodno, prije početka ekstrakcije, dodane 3-4 staklene kuglice za vrenje. Ekstrakcija je trajala 5 sati. Uzorcima pogače, iz kojih je ekstrahirano ulje, tijekom noći je otpareno otapalo te su bili spremni za daljnju analizu.



Slika 9. Aparatura po Soxhletu (vlastita fotografija)

3.2.3. Određivanje proteina metodom po Kjeldahlu

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

Postupak određivanja udjela proteina započeo je vaganjem uzorka pogača buče i uljane repice. Odvagano je $0,5 \pm 0,01$ g uzorka te je prebačeno u epruvete od 500 mL. U svaku epruvetu su dodane dvije tablete Kjeldahl katalizatora, a zatim je dodano 15 mL koncentrirane sumporne kiseline, 5 mL 30 % vodikova peroksida te se sadržaj u epruvetama lagano promiješao. Nakon završetka reakcije stalak s epruvetama postavljen je digestijsku jedinicu za mineralizaciju te je uključen sustav za odvod para i započelo je lagano zagrijavanje. Kada se reakcija u epruvetama smirila zagrijavanje je pojačano. Postupak mineralizacije zaustavljen je kada je zaostala bistra plavo-zelena tekućina bez izgorjenih crnih komadića (cca 3 h), a epruvete s uzorcima ostavljene su da se ohlade.

Ohlađenim uzorcima dodano je 75 mL destilirane vode te su postavljeni u aparat Teactor Kjeltec System 1002 kako bi se provela destilacija. U Erlenmeyerove tikvice dodano je 25 mL borne kiseline te su one postavljene u destilacijsku jedinicu na način da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu, a Kjeldahlova epruveta je postavljena na svoje mjesto i sigurnosna vratašca su se zatvorila. Destilacija u trajanju od 4 minute je automatizirana uz dodatak 60 mL 40 %-tne otopine natrijevog hidroksida. Destilat u tikvici je poprimio zelenu boju što ukazuje da je amonijak prisutan (potrebno je da je destilat hladan jer u protivnome dolazi do gubitka amonijaka). Destilat je zatim titriran s 0,1 M otopinom klorovodične kiseline do prelaska boje u ružičastu. Iz podataka za utrošak kiseline potrebne za titraciju izračunat je postotak dušika [2] i udio proteina u uzorcima [3].

$$\% \text{ dušika} = \frac{(V_2 - V_1) * c(\text{HCl}) * 14,008}{m} * 100 \quad [2]$$

V_2 – volumen klorovodične kiseline za titraciju (mL)

V_1 – volumen klorovodične kiseline za titraciju (mL)

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

m – masa uzorka (g)

$$\% \text{ proteina} = \% \text{ dušika} * f \quad [3]$$

f – faktor konverzije za uljarice; 6,25

3.2.4. Hidroliza uzoraka

Hidroliza uzoraka provedena je uz enzim gljivičnu proteazu A, pri temperaturama od 50 °C, 60 °C i 70 °C u vremenskom razdoblju od 1, 4,5 i 8 sati. Ovisno o unaprijed postavljenom planu provedbe pokusa prikazanom u tablici 2 (Box-Behnken) uzorcima je dodana određena količina enzima izračunata prema formuli [4].

$$m(\text{enzima}) \left[\frac{\text{HUT}}{\text{g}} \right] = \frac{m(\text{uzorka}) * \%(\text{proteina u uzorku}) * c(\text{enzima})}{250000} \quad [4]$$

Tablica 2. Plan provedbe pokusa

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

Uzorci pogače buče i uljane repice hidrolizirani su u dvije serije, ovisno o tome je li uzorcima nakon hidrolize određivan stupanj hidrolize i antioksidacijska aktivnost ili je ispitivana probavljivost. Prije samog postupka hidrolize potrebno je pripremiti uzorke i odvagati enzime. Enzim je izvagan na aluminijskoj foliji prema unaprijed izračunatoj količini za svaki pojedini uzorak. U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL s ubrušenim grlom odvagano je cca. 5 g odmašćene pogače pojedine uljarice te je dispergirano u 35 mL vode. Tako pripremljeni uzorci zagrijavani su na rešou, u prethodno proključaloj vodi, 10 min nakon što je temperatura u tikvici postigla 90 °C. Nakon toga tikvice su ohlađene na temperaturu <50 °C i dodan je enzim te je aluminijska folija ispirana s 5 mL vode. Uzorci su zatim uronjeni u vodenu kupelj na odgovarajuću temperaturu (50 °C, 60 °C ili 70 °C) pri 100 rpm i zagrijavani su 1, 4,5 ili 8 sati. Nakon završetka hidrolize enzim je inaktiviran zagrijavanjem u vodenoj kupelji pri 100 °C/10 min. Uzorci su zatim ohlađeni te su centrifugirani 15 min pri 10 000 okretaja min⁻¹. Supernatant je odvojen te je u njemu određen stupanj hidrolize i antioksidacijska aktivnost. Na ovaj način provedena je prva serija hidrolize uzoraka.

U drugoj seriji hidrolize uzoraka, nakon čega je ispitivana probavljivost, neznatno se razlikuje plan provedbe pokusa. Naime, razlika je u tome što nakon završetka hidrolize uzorcima nije inaktiviran enzim zagrijavanjem u vodenoj kupelji nego zamrzavanjem na temperaturu -8 °C te su uzorci zatim liofilizirani, a nakon liofilizacije provedena je metoda za ispitivanje probavljivosti.

3.2.5. Određivanje stupnja hidrolize

Stupanj hidrolize je određivan titracijskom metodom. U čaši od 150 mL pomiješano je 5 mL supernatanta i 60 mL destilirane vode te su uzorci titrirani s 0,05 M NaOH do pH 8.50. Nakon toga je dodano 10 mL 13 % formaldehida i ponovno titrirano s 0,05 M NaOH do pH 8.50. Stupanj hidrolize se izračuna prema formuli [5].

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

DH – stupanj hidrolize

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

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

V – ukupni volumen uzorka (40 mL)

3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Provedba DPPH metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti započela je pripremom 0,06 mM otopine DPPH (0,00236 g DPPH te je otopljeno s etanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopunjeno do oznake, za svako mjerenje pripremljena je svježja otopina) te je tikvica umotana u aluminijsku foliju kako bi se spriječilo prodiranje svjetlosti i smanjila reaktivnost reagensa. U kivetu za spektrofotometrijsko mjerenje odpipetirano je 60 µl uzorka (uzorak je supernatant odvojen nakon hidrolize) te 2,850 mL 0,06 mM otopine DPPH, a za slijepu probu umjesto uzorka odpipetirano je 60 µl etanola. Kivete u kojima je dodan uzorak i otopina DPPH stavljene su na tamno mjesto, a nakon 30 min izmjerena je apsorbancija pri 517 nm na UV/VIS spektrofotometru (PerkinElmer, SAD) u usporedbi sa slijepom probom. Sva mjerenja provedena su u minimalno dvije paralele za svaki uzorak.

Sposobnost uklanjanja slobodnog radikala, tj. sposobnost estrahiranih spojeva da hvataju slobodne radikale DPPH reagensa gleda se u odnosu na obezbojenje otopine koja označava smanjenje apsorbancije DPPH radikala, a računa se prema jednadžbi [6], (Yu i sur., 2002).

$$\% \text{ vezanih radikala} = [(A_{\text{pskontrola}} - A_{\text{psuzorak}})/A_{\text{pskontrola}}] * 100 \quad [6]$$

$A_{\text{pskontrola}}$ - apsorbancija slijepa probe nakon 30 min

A_{psuzorak} - apsorbancija uzorka nakon 30 min

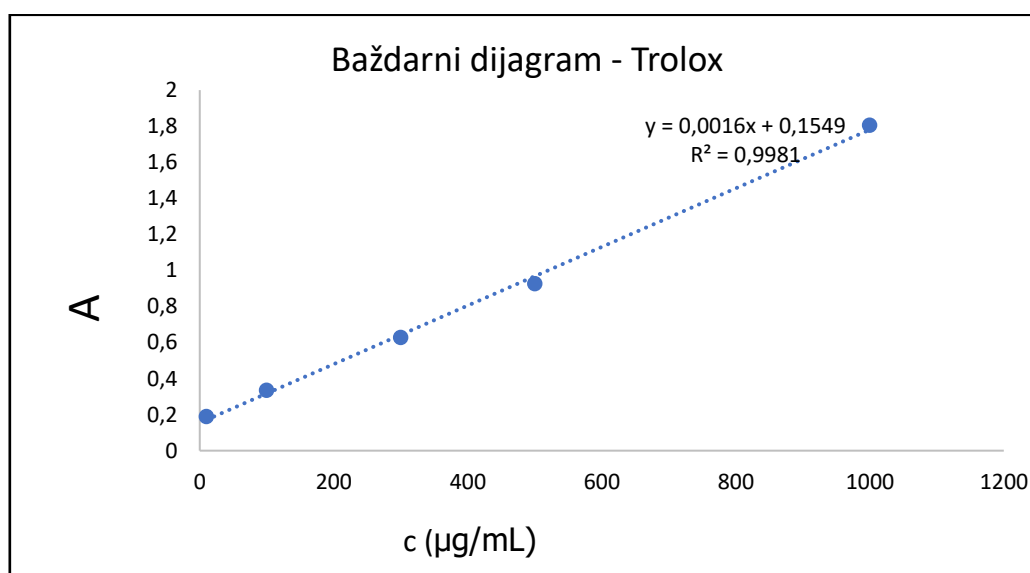
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Pripremljena je svježa otopina FRAP reagensa na dan analize. Smjesa se sastojala od 2,5 mL 20 mM FeCl₃·6H₂O, 2,5 mL 10 mM TPTZ u 40 mM HCl i 25 mL 300 mM acetatnog pufera. Pripremljena je količina dostatna za sve uzorke te je smjesa zagrijana na temperaturu 37 °C i održavana je temperatura (Benzie i Strain, 1996). U kivetu za spektrofotometrijsko mjerenje odpipetirano je 30 µL uzorka (supernatant nakon centrifugiranja hidroliziranih uzoraka) te je dodano 3 mL FRAP reagensa. Nakon 4 min izmjerena je aporbancija na UV/VIS spektrofotometru (PerkinElmer, SAD), pri 593 nm, u usporedbi sa slijepom probom (umjesto uzorka dodana je voda). Sva mjerenja provedena su u minimalno dvije paralele za svaki uzorak, a rezultati su izraženi kao µM ekvivalenta Trolox-a po g suhe tvari uzorka. Za izradu baždarnog pravca (slika 10) pripremljena je otopina Trolox-a u etanolu, u rasponu koncentracija 10-1000 µg mL⁻¹, čija je jednadžba pravca prikazana jednadžbom [7].

$$y = 0,0016x + 0,1549 \quad [7]$$

y – koncentracija standarda otopine Trolox-a (µg mL⁻¹)

x – izmjerena vrijednost aporbancije pri 593 nm



Slika 10. Baždarni dijagram Trolox-a

3.2.8. Liofilizacija hidroliziranih uzoraka

Nakon provedene hidrolize uzorci su zamrznuti u zamrzivaču na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ te su podvrgnuti liofilizaciji. Liofilizacija je provedena u liofilizatoru Alpha 1-4 (Martin Christ, Njemačka) pri temperaturi komore liofilizatora $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i tlaku 0,2 bara. Proces liofilizacije trajao je 24 sata, a liofilizirani uzorci su čuvani u zamrzivaču na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.9. Određivanje probavljivosti

Ispitivanje probavljivosti provedeno je *in vitro* na liofiliziranim uzorcima enzimskim setom (K-PDCAAS 06/18, Megazyme, Irska). Postupak započinje vaganjem 500 mg uzorka kojemu se doda 19 mL HCl (0,06 M), zatim se promiješa te inkubira 30 min na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inkubatoru 300 o min^{-1} . Nakon inkubacije se doda 1 mL pepsina, otopina se promiješa te inkubira 60 min na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inkubatoru pri 300 o min^{-1} .

Kada prođe vrijeme inkubacije od sat vremena uzorcima se podesi pH s 2 mL 1,0 M tris pufera, uzorci se promiješaju te se doda 200 μL smjese tripsin/kimotripsin. Uzorci se ponovno promiješaju te inkubiraju na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inkubatoru pri 300 o min^{-1} tijekom 4 h. Nakon inkubacije uzorci su uronjeni u kipuću vodenu kupelj te su zadržani 10 min. Kada je prošlo 10 min uzorci su promiješani te su ohlađeni na sobnu temperaturu najmanje 20 min. 4 mL svakoga uzorka odpipetirano je u plastičnu epruvetu sa zatvaračem (Falcon) i dodan je 1 mL 40 % TCA, epruvete su promiješane i inkubirane na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom noći (najmanje 16 h). Slijedeći dan uzorci su izvađeni iz hladnjaka te su centrifugirani u centrifugi (Falcon, Colorado, SAD) pri 10 000 o min^{-1} . Iz centrifugiranog uzorka napravljeno je razrjeđenje svakog uzorka (10 i 20 puta). U staklene epruvete od 5 mL odpipetirano je 300 μL uzorka te je dodano 150 μL ninhidrina (2 %). Kao standard korišten je L – glicin u koncentracijama 0 – 1 mM te je odpipetirana količina glicina jednaka uzorku i dodan je ninhidrin. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda. Epruvete s uzorcima, slijepom probom i standardom stavljene su u vodenu kupelj na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 35 min. Nakon zagrijavanja epruvete su hlađene najmanje 10 min te je dodan alkohol (50 % v v⁻¹) u iznosu od 150 μL . Sadržaj epruveta s uzorcima i standardom prebačen je u mikrokivete za spektrofotometrijsko mjerenje te je izmjerena apsorbancija pri 570 nm na UV/VIS spektrofotometru.

L-Glicin je korišten kao standard te je iz izmjerenih apsorbancija nacrtan dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji (baždarni dijagram). Jednadžba pravca baždarnog dijagrama glasi: $y=1,6903x + 0,0866$, $R^2=0,9864$. Koristeći jednadžbu pravca baždarnog dijagrama i jednadžbu [8] i [9] izračunata je koncentracija primarnih amina prisutnih u uzorku.

$$y = A * B + C \quad [8]$$

y- apsorbancija

A - Nagib

B – presjek pravca

C – nepoznata koncentracija primarnih amina

$$C2 = \frac{C1 * D * 1,25}{W} \quad [9]$$

C2 - koncentracija primarnih amina korigirana za razrjeđenje

C1 - koncentracija primarnih amina u razrijeđenom uzorku

D - faktor razrjeđenja uzorka prije određivanja amina

1,25 - razrjeđenje s TCA

W - masa uzorka (g)

3.2.10. Statistička analiza

Rezultati istraživanja (multifaktorska analiza varijance – ANOVA) kao i plan provedbe eksperimenta (Box-Behnken) obrađeni su u statističkom programu *Design Expert*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pogače su nusproizvodi tijekom prerade uljarica koje su bogate raznim antioksidansima, esencijalnim masnim kiselinama i proteinima (Šubarić, 2013). Nusproizvodi uljarica kao i nusproizvodi drugih prehrambenih industrija imaju veliki potencijal za primjenu u proizvodnji funkcionalnih proizvoda i obogaćenih proizvoda. Osim što se iz nusproizvoda mogu proizvesti prirodni dodatci prehrani, njihovim iskorištenjem se rješava problem zbrinjavanja otpada iz industrije (Šubarić, 2013).

U ovome radu ispitivana je antioksidacijska aktivnost i probavljivost hidrolizata pogača uljarica. Pogače uljarica (buče i uljane repice) odmašćene su metodom po Soxhletu u laboratoriju te je na odmašćenim pogačama provedena hidroliza uz enzim *Protease A*, pri različitim uvjetima temperature, koncentracije enzima i vremena tretmana. Hidrolizatima pogača, buče i uljane repice, određeni su stupanj hidrolize, antioksidacijska aktivnosti i *in vitro* probavljivost te su rezultati statistički obrađeni (*Design Expert*) i predstavljeni u 3D prikazu.

4.1. ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA

U radu je bilo potrebno odrediti količinu proteina u pogači kako bi se na osnovu podataka o udjelu proteina mogla izračunati točna količina enzima potrebna za tretman pogača uljarica. Količina proteina određivana je nakon mljevenja na kriomlinu i odmašćivanja samljevene pogače metodom po Soxhletu. Za određivanje udjela proteina u pogači uljarica korištena je referentna metoda po Kjeldahl-u, a rezultati su izraženi u postotcima, kao srednja vrijednost dva određivanja (tablica 3).

Tablica 3. Udio proteina u odmašćenoj pogači uljarica

	Udio proteina (%)
Pogača buče	71,71
Pogača uljane repice	45,68

U radu Vaštag i sur. (2010) navode kako je udio proteina u pogači buče 60 - 65 %, a u radu Medved (2017) pogača buče sadrži 57 – 60 % proteina. Ivanova i sur. (2016) navode udio proteina, koji zaostaje u pogači uljane repice, da je 40 %, dok je u radu Medved (2017) navedeno 30 - 35 % proteina. Razlozi različitih količina udjela proteina su različiti načini uzgoja uljarica, vremenski uvjeti i sorta uljarice (Jukić i sur, 2006). Iz rezultata u tablici 3 vidljivo je da su dobiveni nešto veći rezultati, odnosno veći je udio proteina nego u prijašnjim radovima. Vjerojatan razlog većem udjelu proteina u ovome radu je njihovo određivanje količine proteina odmašćenim pogačama uljarica.

4.2. REZULTATI HIDROLIZE PROTEINA

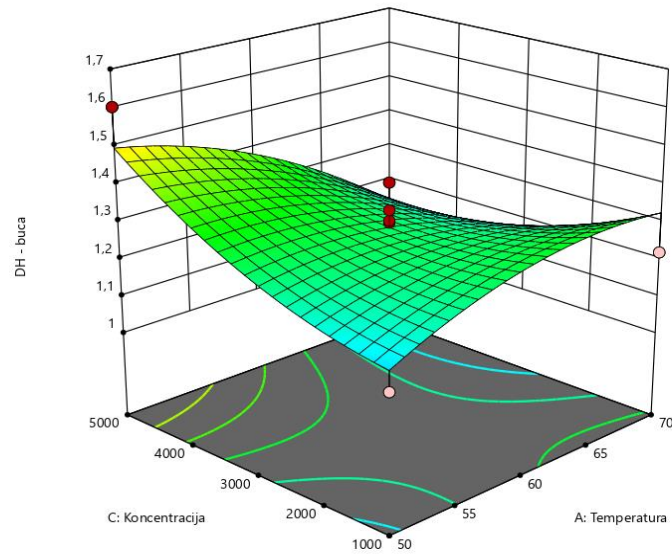
Pogače buče i uljane repice, kao nusproizvodi dobiveni proizvodnjom ulja, sadrže visok udio proteina. Kako bi se povećala iskoristivost nusproizvoda, nastalih preradom uljarica, za proizvodnju funkcionalne hrane, provedena je hidroliza proteina te su ispitani određeni parametri. Uzorci pogače buče i uljane repice podvrgnuti su hidrolizi proteina djelovanjem enzima proteaze A pod različitim uvjetima. Hidroliza je provedena pri tri različite temperature (50 °C, 60 °C, 70 °C), koncentracijama enzima 1000 HUT, 3000 HUT i 5000 HUT tijekom 1, 4,5 i 8 sati. Istraživanjem je utvrđeno da se stupanj hidrolize (DH) mijenja u ovisnosti o temperaturi, vremenu hidrolize i koncentraciji enzima.

Provedenom statističkom obradom podataka, prema ANOVA testu (kvadratni model), za DH buče model je značajan ($p=0,0159$), a značajni faktori prema korištenom modelu su vrijeme ($p=0,0006$) te interakcija temperature i koncentracije enzima ($p=0,0369$). Slika 11 prikazuje graf ovisnosti DH buče o temperaturi i koncentraciji tijekom 4,5 (a) i 8 (b) sati trajanja eksperimenta. Iz slike je vidljivo da je najveći stupanj hidrolize postignut pri maksimalno korištenoj koncentraciji enzima (5000 HUT) te temperaturi od 50 °C, neovisno o trajanju reakcije. Na 3D prikazu je vidljivo da s povećanjem vremena hidrolize raste i stupanj hidrolize. Također je vidljivo da prilikom korištenja veće koncentracije enzima, potrebna je provedba eksperimenta pri nižim temperaturama kako bi se postigao veći stupanj hidrolize, dok pri nižoj koncentraciji enzima je potrebna veća temperatura eksperimenta.

1,05668 1,62334

X1 = A: Temperatura
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
B: Vrijeme = 4,5

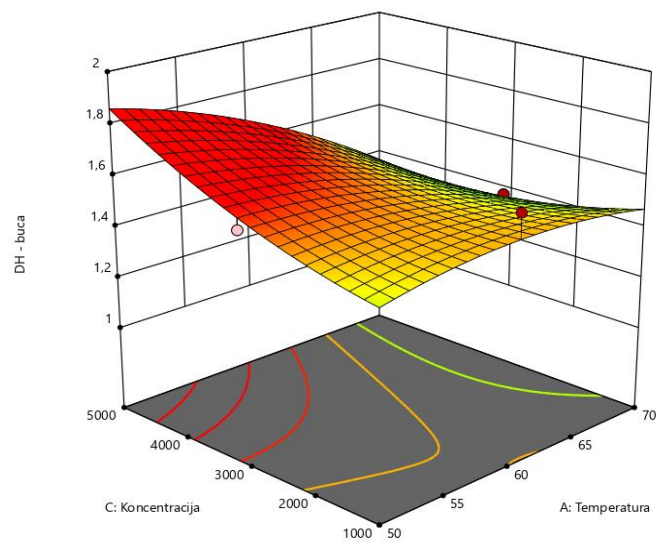


a)

1,05668 1,62334

X1 = A: Temperatura
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
B: Vrijeme = 8



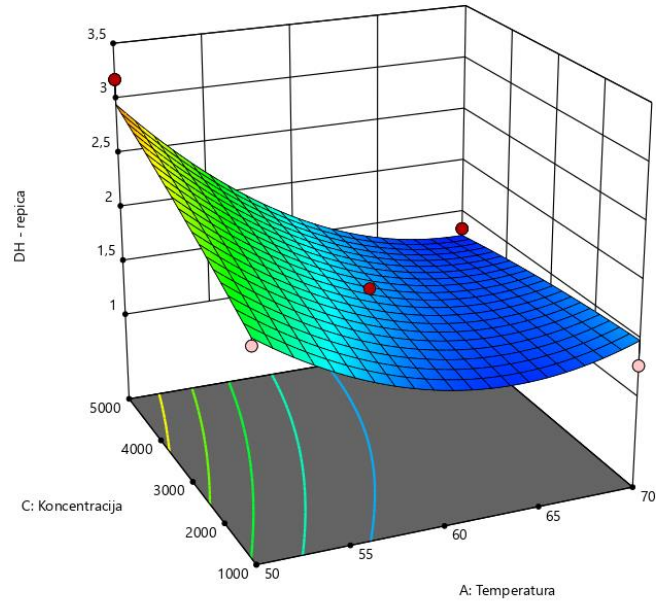
b)

Slika 11. 3D prikaz promjene stupnja hidrolize buče (DH) u ovisnosti o temperaturi i koncentraciji pri: a) 4,5 h, b) 8 h

1,20905  3,17839

X1 = A: Temperatura
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
B: Vrijeme = 4,5

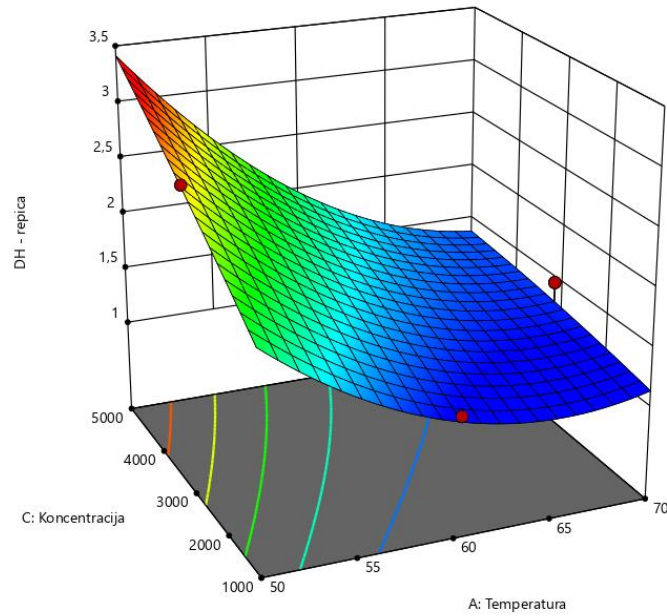


a)

1,20905  3,17839

X1 = A: Temperatura
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
B: Vrijeme = 8



b)

Slika 12. 3D prikaz promjene stupnja hidrolize uljane repice (DH) u ovisnosti o temperaturi i koncentraciji pri: a) 4,5 h, b) 8 h

Na slici 12, prikazan je 3D graf rezultata stupnja hidrolize uljane repice u ovisnosti o temperaturi i koncentraciji tijekom 4,5 (a) i 8 (b) h. Prema kvadratnom modelu ANOVA testa model je značajan ($p=0,0021$), a značajni faktori su temperatura ($p=0,0001$) te interakcija temperature i koncentracije ($p=0,0318$). Iz grafova je vidljivo da je najveći stupanj hidrolize postignut pri najvećoj koncentraciji enzima i pri najnižoj temperaturi provedbe eksperimenta, neovisno o vremenskom periodu provedbe hidrolize. Povećanjem temperature tijekom provedbe enzimatske hidrolize postižu se rezultati sa značajno manjim stupnjem hidrolize. Uspoređujući rezultate provedene enzimatske hidrolize između uzoraka pogače buče i uljane repice vidljivo je da se obje uljarice pri istim uvjetima ponašaju slično. Kod oba uzorka je vidljivo da je najveći stupanj hidrolize postignut pri najvišoj koncentraciji enzima i najnižoj temperaturi. S povećanjem temperature, kod uljane repice, stupanj hidrolize opada dok je kod buče najniži stupanj hidrolize postignut pri minimalnim ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1000 HUT) i maksimalnim ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 5000 HUT) uvjetima. Također iz dobivenih rezultata je vidljivo da je hidroliza uljane repice uz isti enzim uspješnija jer je postignut veći stupanj hidrolize.

U radu Vaštag i sur. (2010) provedena je hidroliza pogače buče, uz enzim gljivičnu proteazu dobivenu od *Aspergillus niger* te uz različite uvjete temperature, vremena i odnosa enzim/supstrat. Hidrolizom su dobiveni proteinski hidrolizati kojima je izmjeren DH. Prema navedenom radu, temperatura i vrijeme imaju najveći utjecaj na DH. DH se povećava sve dok temperatura ili vrijeme ne postignu optimalnu vrijednost, a nakon toga se smanjuje povećanjem temperature ili vremena. Također je u radu Vaštag i sur. (2010) kao i u radu Bhaskar i sur. (2008) utvrđeno da temperatura ima glavni utjecaj na hidrolizu što je potvrđeno i ovim istraživanjem.

U svome radu Vioque i sur. (2000) su proveli enzimatsku hidrolizu uljane repice gdje su utvrdili da se ograničenom hidrolizom mogu poboljšati funkcionalna svojstva izvornog materijala. Utvrdili su također da se funkcionalna svojstva gube nakon određeno postignutog stupnja hidrolize (DH). Ovisno o supstratu i enzimu koji se koristi, u prosjeku hidrolizati s DH između 1 % i 10 % imaju bolja funkcionalna svojstva od nehidroliziranog supstrata što odgovara stupnjevima hidrolize postignutim u ovom istraživanju.

4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST HIDROLIZIRANIH POGAČA ULJARICA

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti hidroliziranih pogača uljarica, buče i uljane repice, korištene su dvije metode: DPPH i FRAP. Obje metode pripadaju skupini spektrofotometrijskih metoda gdje se uzorcima, nakon reakcije s reagensom, mjeri apsorbancija pri određenoj valnoj duljini.

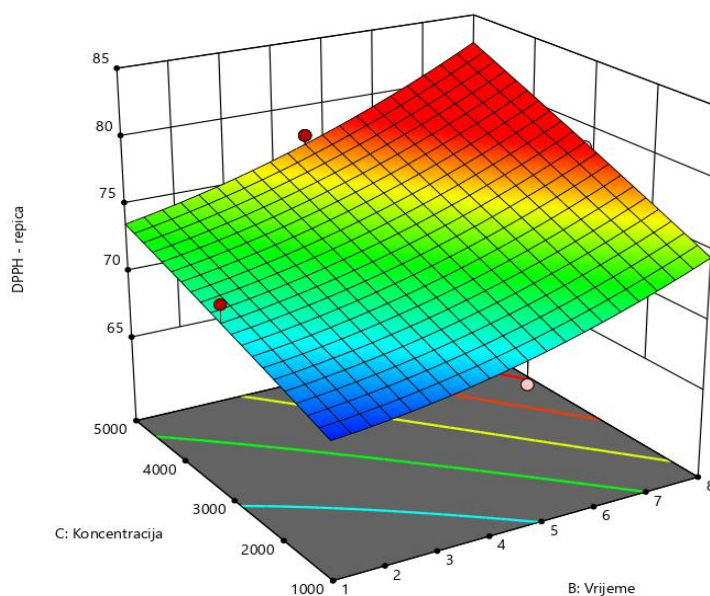
4.3.1. DPPH

Određivanjem antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom na hidroliziranim uzorcima pogače buče dobiveni su rezultati koji prema ANOVA testu nemaju značajan model ($p > 0,05$). Za uzorke hidrolizirane pogače uljane repice model je značajan ($p = 0,0259$) te su značajni faktori vrijeme ($p = 0,0025$) i koncentracija ($p = 0,0363$). Iz grafova na slici 13 može se vidjeti kako je najveće smanjenje koncentracije DPPH radikala postignuto pri temperaturi od $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ te najvećoj korištenoj koncentraciji enzima i najduljem trajanju hidrolize. Redukcija DPPH radikala, pri različitim temperaturama, najveća je kod uvjeta najveće koncentracije i najduljeg trajanja hidrolize. Uspoređujući rezultate stupnja hidrolize i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom vidljivo je da uzorci s većim postignutim stupnjem hidrolize pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost.

67,8571  78,5112

X1 = B: Vrijeme
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
A: Temperatura = 50

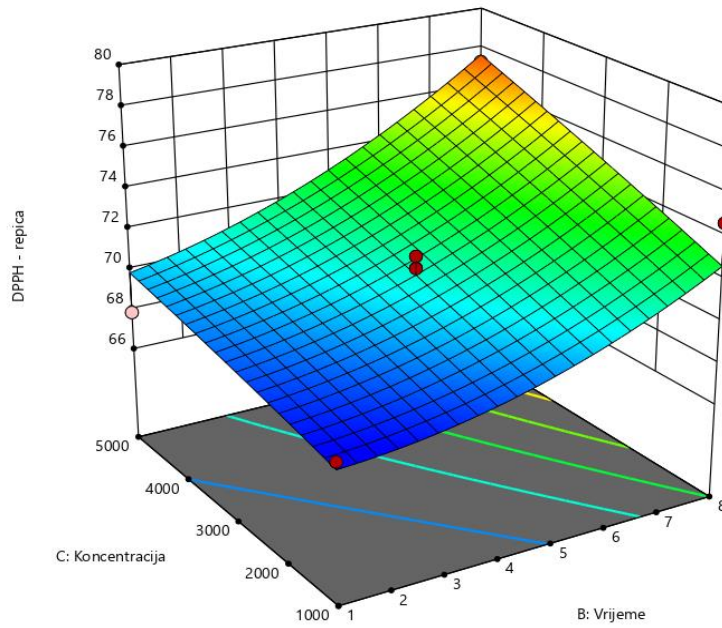


a)


67,8571  78,5112

X1 = B: Vrijeme
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
A: Temperatura = 60

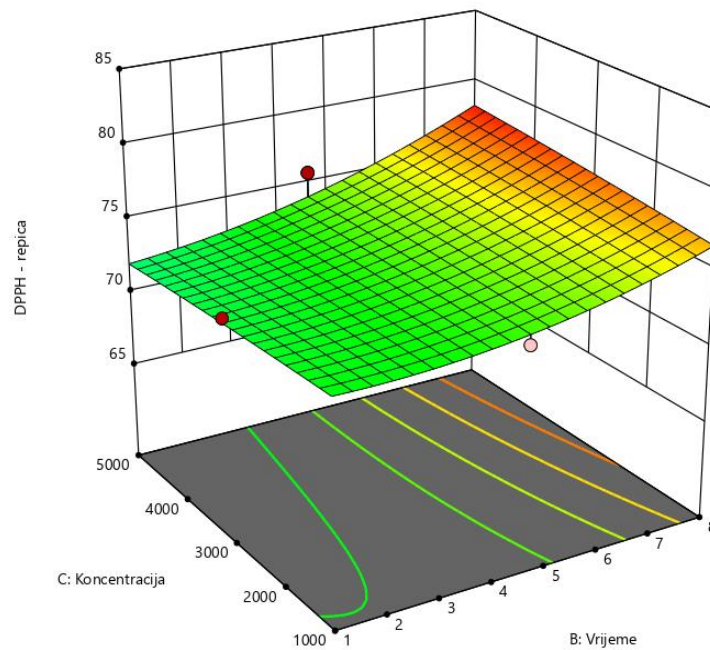


b)

67,8571  78,5112

X1 = B: Vrijeme
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
A: Temperatura = 70



c)

Slika 13. 3D prikaz antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za uljanu repicu u ovisnosti o vremenu i koncentraciji pri: a) 50 °C b) 60 °C c) 70 °C

Prilikom provedbe DPPH metode, posebice u hidrolizatima buče, došlo je do izdvajanja proteina i zamućenja smjese uzorka te se može primjetiti da DPPH metoda nije prikladna za mjerenje antioksidacijske aktivnosti ovih uzoraka.

Prema nekim istraživanjima antioksidacijska aktivnost proteinskih hidrolizata povezana je sa njihovim stupnjem hidrolize (DH). U radu Venuste i sur. (2013) hidrolizati proteina dobiveni enzimskom hidrolizom s alkalazom koja ima viši DH pokazali su jaču sposobnost uklanjanja radikala DPPH. U radu Cumby i sur. (2008) provedena je enzimska hidroliza *Canole*, kanadske sorte uljane repice, s različitim enzimima. Dobiveni hidrolizati proteina su pokazali različitu sposobnost uklanjanja DPPH radikala ovisi o koncentraciji enzima, ali i o vrsti enzima upotrebljenog za hidrolizu. Veća koncentracija enzima kao rezultat je pokazivala veću sposobnost uklanjanja radikala DPPH. Također, hidrolizati proteina dobiveni uz dodatak Flavourzyme pokazivali su najveću enzimsku aktivnost. Tang i sur. (2009) su na uzorcima konoplje provodili hidrolizu s različitim proteazama. Također su utvrdili da različite proteaze daju hidrolizate koji pokazuju različitu sposobnost uklanjanja DPPH radikala. U ovome radu utvrđeno je kako se hidrolizati visokog antioksidacijskog djelovanja mogu dobiti odabirom koncentracije proteaze i vremena hidrolize.

Postoji pozitivna korelacija između aminokiselinskih ostataka poput hidrofobnih aminokiselina i antioksidacijske sposobnosti proteinskih hidrolizata. Tako npr. proteini s visokim sadržajem histidina, alanina, valina, metionina i leucina posjeduju jaku antioksidacijsku aktivnost (Venuste i sur., 2013).

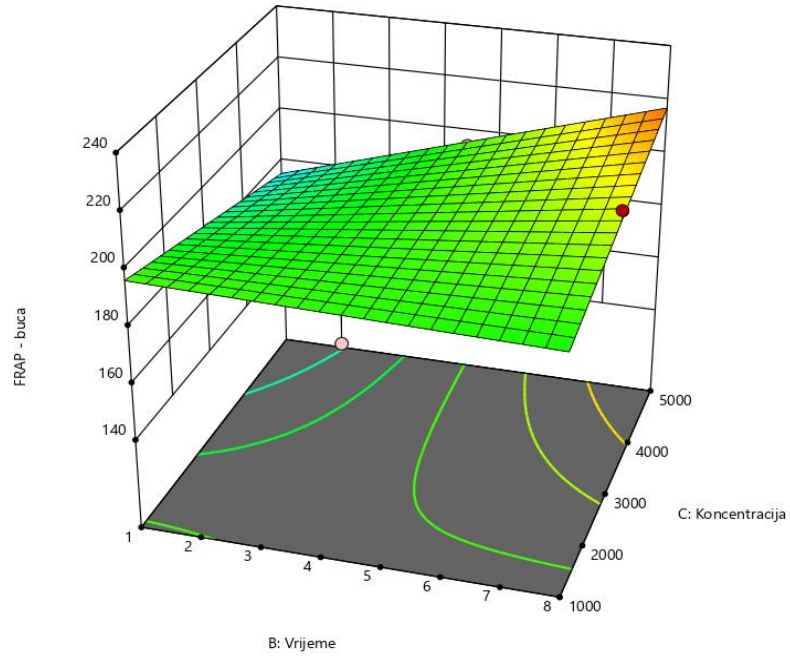
4.3.2. FRAP

FRAP je spektrofotometrijska metoda čiji je princip rada reakcija antioksidansa s Fe(III) kompleksom. Ukupna antioksidativna aktivnost hidroliziranih ekstrakata pogača buče i uljane repice određena je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka koristeći kalibracijsku krivulju Trolox-a u etanolu (slika 8), te su vrijednosti prikazane kao koncentracije Trolox-a izražene u mM.

160,688  224,438

X1 = B: Vrijeme
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
A: Temperatura = 50

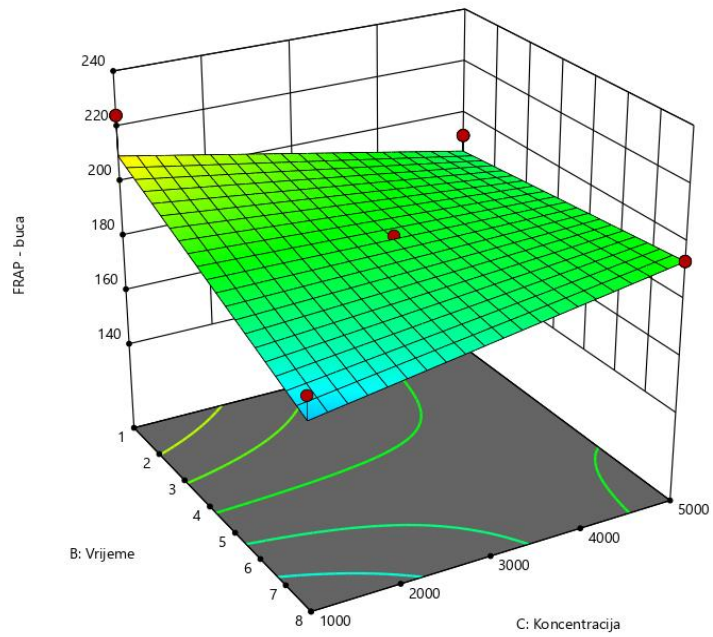


a)

160,688  224,438

X1 = B: Vrijeme
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
A: Temperatura = 60

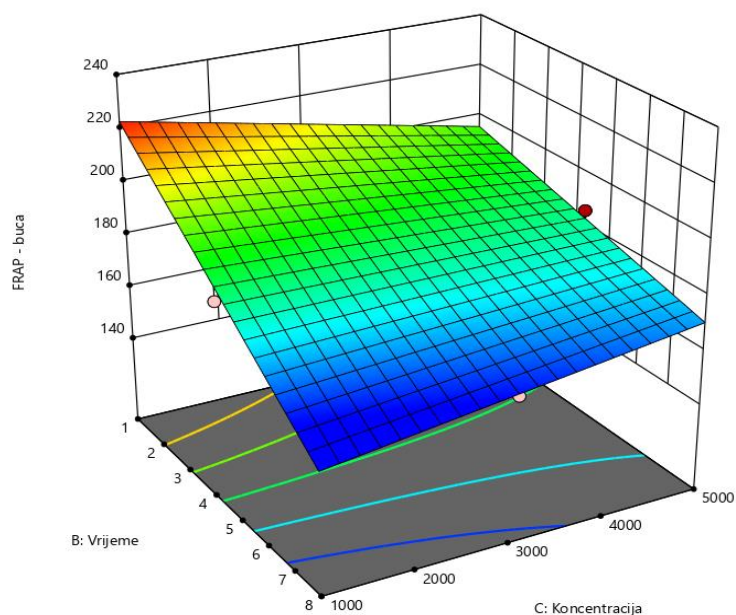


b)

160,688 224,438

X1 = B: Vrijeme
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
A: Temperatura = 70



c)

Slika 14. 3D prikaz antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za uzorke buče ovisnosti o vremenu i koncentraciji pri: a) 50 °C b) 60 °C c) 70 °C

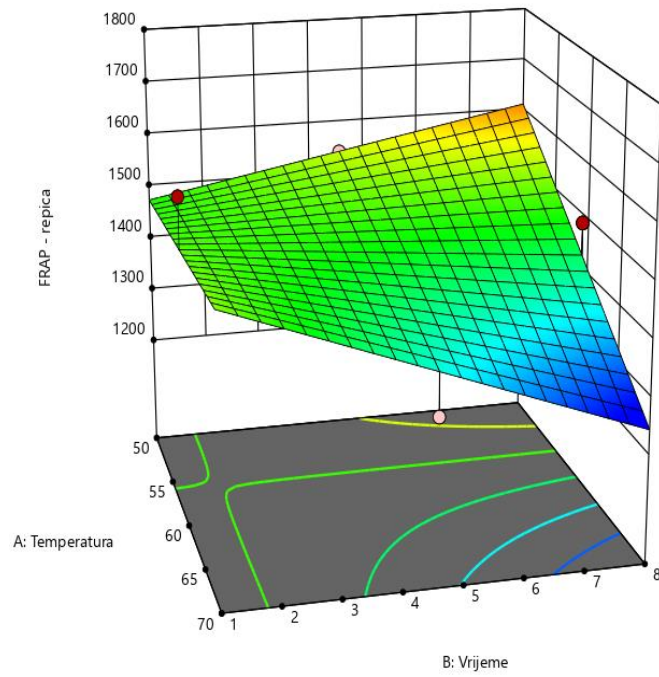
Statističkom obradom (ANOVA) podataka određivanj antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom za bučinu pogaču dobiven je značajan model ($p=0,0050$). Značajni faktori su vrijeme ($p=0,0236$), interakcija temperature i vremene ($p=0,0013$) te interakcija vremena i koncentracije ($p=0,0140$). Promatrajući sliku 14 vidljivo je kako je najveća antioksidacijska aktivnost postignuta pri 70 °C, koncentraciji enzima 1000 HUT te trajanju reakcije od 1 h. Pri višim temperaturama veća antoksidacijska aktivnost postignuta je pri manjoj koncentraciji enzima i kraćem trajanju hidrolize, dok je kod niže temperature (50 °C) veća antioksidacijska aktivnost postignuta pri većoj koncentraciji enzima i duljem vremenskom periodu hidrolize. Za uzorke pogače buče na kojima nije provedena enzimaska hidroliza, antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom iznosila je $181 \mu\text{mol g s.tv.}^{-1}$ te je rezultat antioksidacijske aktivnosti veći od nekih uzoraka tretiranih enzimima.

Za uzorke hidrolizirane pogače uljane repice rezultati obrađeni ANOVA testom pokazuju značajan model ($p=0,0131$). Utjecajni faktori su temperatura ($p=0,0018$) te interakcija temperature i vremena ($p=0,0219$).


1268,5  1666

X1 = A: Temperatura
X2 = B: Vrijeme

Actual Factor
C: Koncentracija = 1000

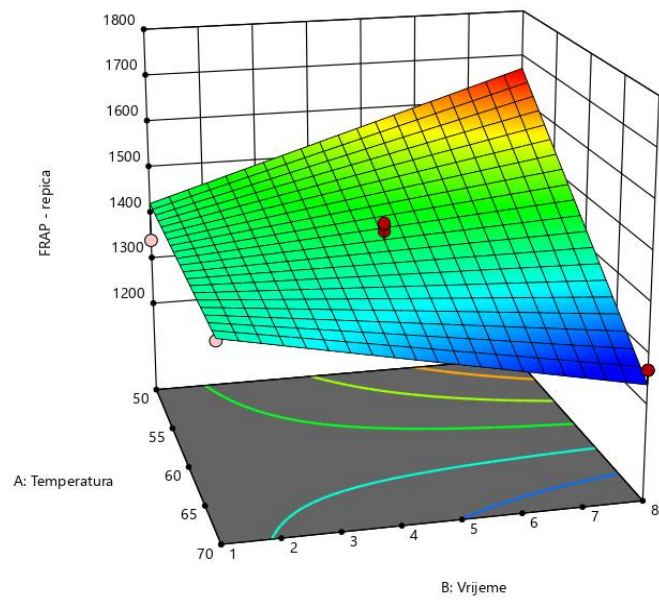


a)

1268,5  1666

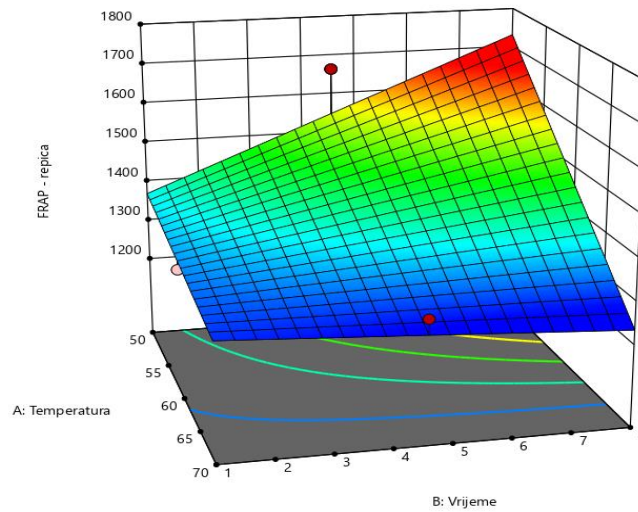
X1 = A: Temperatura
X2 = B: Vrijeme

Actual Factor
C: Koncentracija = 3000



b)

1268,5 1666
X1 = A: Temperatura
X2 = B: Vrijeme
Actual Factor
C: Koncentracija = 5000



c)

Slika 15. 3D prikaz antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za uzorke uljane repice u ovisnosti o vremenu i temperaturi pri: a) 1000 HUT b) 3000 HUT c) 5000 HUT

Kod hidrolizirane pogače uljane repice rezultati pokazuju nešto drugačiju aktivnost u odnosu na pogaču buče. Iz slike 15 može se vidjeti kako je kod pogače uljane repice najviša antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom postiguta pri najvećoj koncentraciji enzima (5000 HUT) i najduljem trajanju hidrolize (8 h), ali pri najnižoj korištenoj temperaturi hidrolize (50 °C). Kod hidrolizirane pogače uljane repice pri tri različite koncentracije enzima (1000 HUT, 3000 HUT i 5000 HUT) antioksidacijska aktivnost je bila najveća pri najnižoj temperaturi i najduljem trajanju hidrolize. Kod uzorka enzimski netretirane pogače uljane repice antioksidacijska aktivnost FRAP metodom iznosila je 1196,31 $\mu\text{mol g s.tv.}^{-1}$ te je kod ovih uzoraka antioksidacijska aktivnost bila manja od svih enzimski tretiranih uzora.

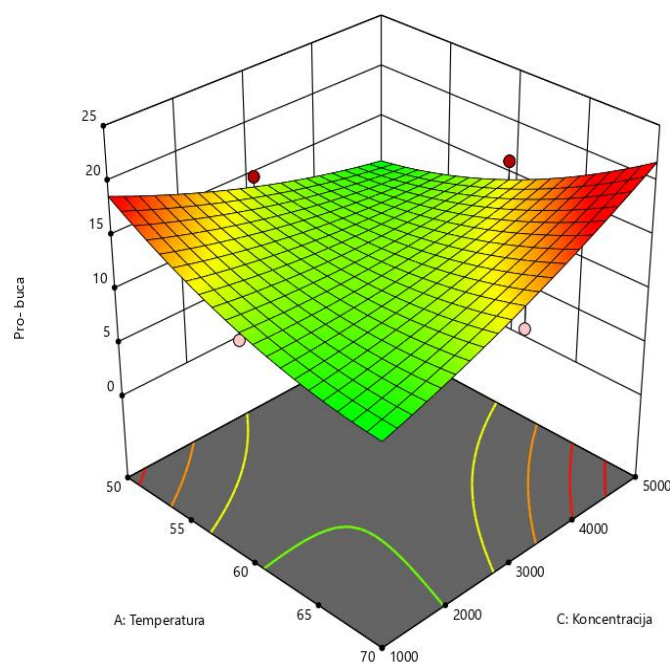
4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA PROBAVLJIVOSTI PROTEINA

Hidrolizatima proteina dobivenih iz pogača uljarica određena je i probavljivost, a rezultati su prikazani u obliku koncentracije primarnih amina. Obradom rezultata, za uzorke buče, utvrđeno je da je prema ANOVA testu model značajan ($p=0,0270$) te da je značajan faktor interakcije temperature i koncentracije ($p=0,0066$). Na slikama 16 i 17 može se vidjeti kako se koncentracija primarnih amina mijenja tijekom vremena. Kod hidrolize provedene tijekom jednog sata, najveća koncentracija primarnih amina postignuta je pri najvećoj koncentraciji i najvećoj temperaturi. Kod uzoraka, čija je hidroliza trajala 4,5 i 8 h, najveća koncentracija amina postignuta je pri najnižoj koncentraciji enzima i najnižoj temperaturi.

3,50637  18,2427

X1 = A: Temperatura
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
B: Vrijeme = 1

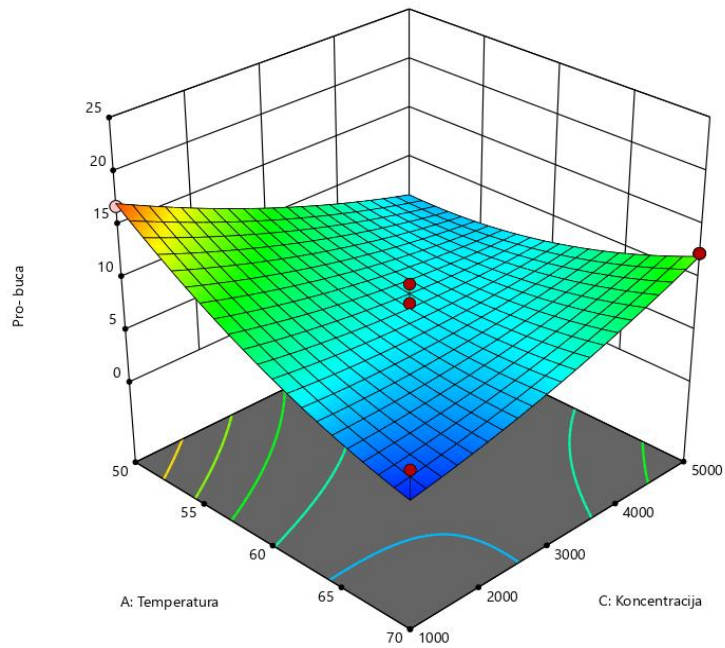


a)

3,50637  18,2427

X1 = A: Temperatura
X2 = C: Koncentracija

Actual Factor
B: Vrijeme = 4,5

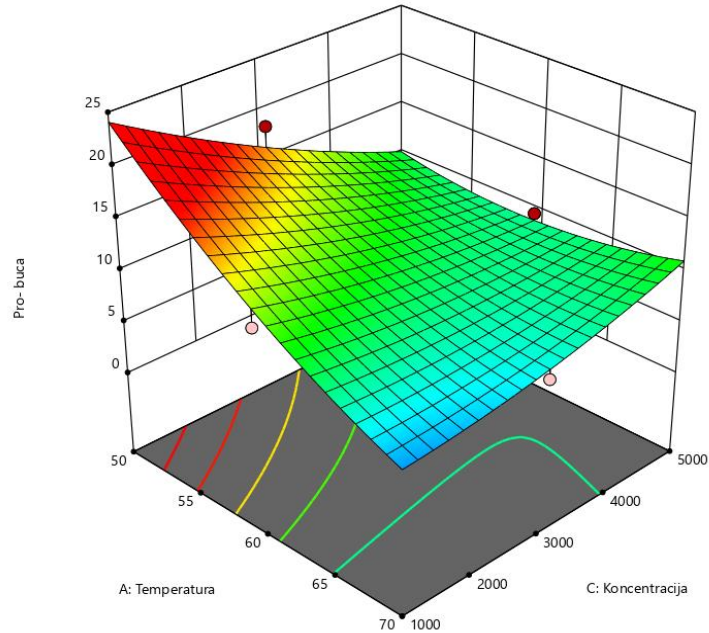


b)

3,50637  18,2427

X1 = A: Temperatura
X2 = C: Koncentracija


Actual Factor
B: Vrijeme = 8



c)

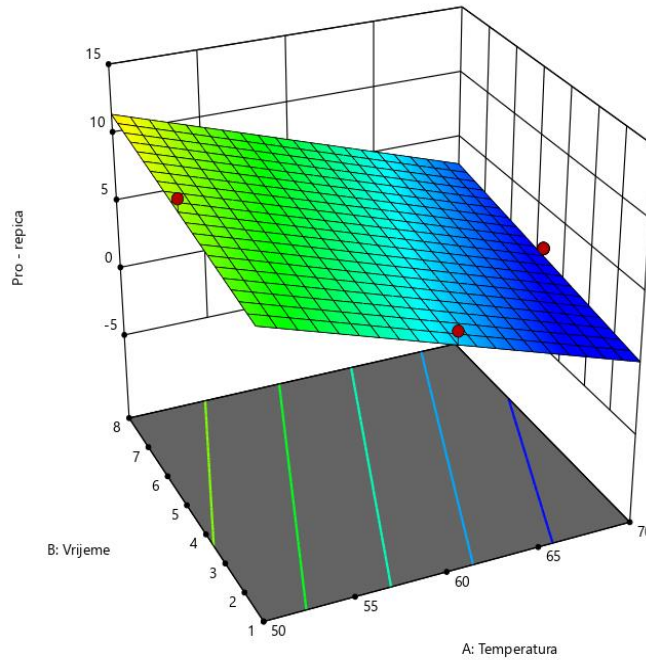
Slika 16. 3D prikaz koncentracije primarnih amina, kod hidrolizata buče, u ovisnosti o temperaturi i koncentraciji enzima pri: a) 1 h, b) 4,5 h i c) 8 h

Kod pogače uljane repice model je značajan ($p=0,0078$) i značajni faktor je temperatura ($p=0,0018$).


2,01056  14,1545

X1 = A: Temperatura
X2 = B: Vrijeme

Actual Factor
C: Koncentracija = 1000

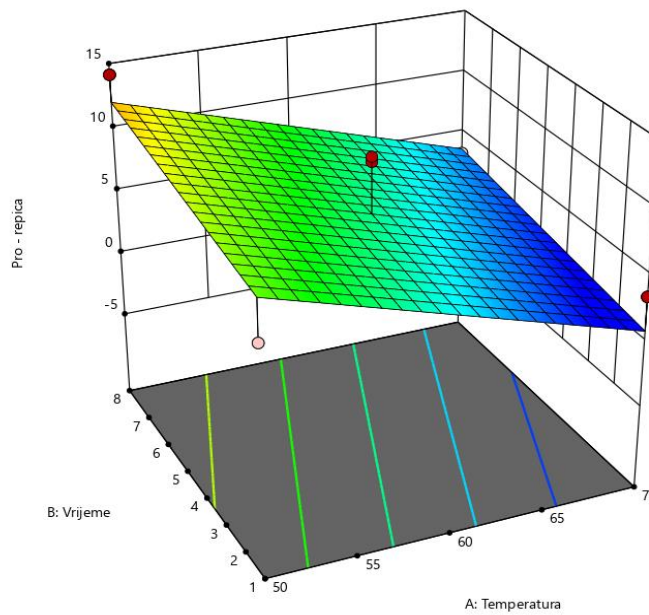


a)

2,01056  14,1545

X1 = A: Temperatura
X2 = B: Vrijeme

Actual Factor
C: Koncentracija = 3000



b)

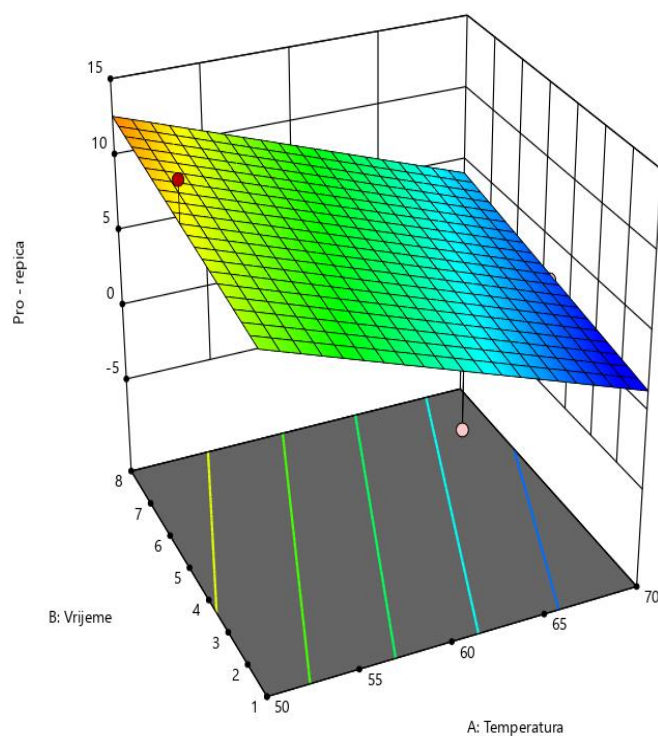
2,01056  14,1545

X1 = A: Temperatura

X2 = B: Vrijeme

Actual Factor

C: Koncentracija = 5000



c)

Slika 17. 3D prikaz koncentracije primarnih amina, kod hidrolizata uljane repice, u ovisnosti o temperaturi i vremenu pri: a) 1000 HUT, b) 3000 HUT i C) 5000 HUT

Nakon provedene hidrolize na samljevenim pogačama buče i uljane repice te nakon liofilizacije i provedbe *in vitro* metode određivanja probavljivosti dobiveni su rezultati koji pokazuju da hidrolizati pogače buče pokazuju znatno veću probavljivost, tj. znatno veću koncentraciju primarnih amina.

U radu Venuste i sur. (2013) ispitivana je probavljivost hidrolizata proteina pogače buče dobivenih enzimskom hidrolizom, uz četiri različita enzima. Njihovo istraživanje je pokazalo da hidrolizati proteina dobivenim enzimskom hidrolizom pokazuju veću probavljivost od enzimski ne tretiranih. Mogući razlog tome je bolji pristup proteolitičkih enzimima prema labilnim peptidnim vezama u hidrolizatima.

Vaštag i sur. (2013) u svome radu su simulirali probavljanje hidrolizata proteina dobivenih alkalaznom hidrolizom pogače buče. Pratili su utjecaj gastrointestinalnih proteaza na antiradikalno i inhibitorno djelovanje enzima koji pretvara angiotenzin I (ACE). Rezultati njihova istraživanja pokazali su prednost alkalazne hidrolize u povećanju antiradikalnog djelovanja i otpornosti na ACE inhibitornu aktivnost tijekom probave glavnim gastrointestinalnim proteazama, što pokazuje hidrolizate kao obećavajuće bioaktivne sastojke hrane.

U ovome radu dokazano je kako proteaze različito utječu na hidrolizu pogače buče i uljane repice pod istim uvjetima. S obzirom da hidrolizati pogače uljane repice pokazuju znatno veći stupanj hidrolize i veće antioksidacijsko djelovanje hidrolizata. Proteaza korištena prilikom ovog istraživanja je pogodnija za pogaču uljane repice.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Proces enzimske hidrolize proteazom promijenio je kemijski sastav i te poboljšao funkcijska svojstva pogača. Dobiveni hidrolizati proteina pokazuju veći stupanj hidrolize, veću antioksidacijsku aktivnost te veću probavljivost u *in vitro* uvjetima u odnosu na uzorak koji nije podvrgnut hidrolizi enzimima.
2. Koncentracija enzima, vrijeme i temperatura hidrolize različito djeluje na ispitivane parametre u ovome radu. Određivanjem DH temperatura ima glavni utjecaj na hidrolizu, pri većoj temperaturi potrebna je manja koncentracija enzima, dok je pri nižoj temperaturi potrebna veća koncentracija enzima, neovisno o vremenu hidrolize. Hidrolizirana pogača uljane repice pokazala je veći DH, no ponašaju se vrlo slično tijekom hidrolize. Antioksidacijska aktivnost hidroliziranih pogača uljarica je veća što je stupanj hidrolize veći. Probavljivost hidrolizata pogače buče u *in vitro* uvjetima je veća od pogače uljane repice.
3. Proteaza korištena u ovome istraživanju različito djeluje na pogaču buče i pogaču uljane repice, stoga odabirom odgovarajućeg enzima i odgovarajućih uvjeta mogu se postići odgovarajuća nutritivna svojstva hidrolizata proteina.
4. Nastali proteinski hidrolizati pokazuju povećana antioksidacijska svojstva te se stoga njihovom ugradnjom u hranu može doprinjeti poboljšanju prehrambenih, funkcionalnih i antioksidacijskih svojstava.

6. LITERATURA

- Anonymus 1 (2019) <<http://www.nutrioil1.com/proizvodi-od-buce/>> Pristupljeno 27. Srpnja 2019
- Anonymus 2 (2021) < <https://farmnet.rs/blog/poga-a-uljane-repice-u-govedarstvu.html> > 18. Lipanj 2021
- Ayyildiz, H. F., Topkafa, M., & Kara, H. (2019). Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil. *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, 765–788.
- Balbino, S., Dorić, M., Vidaković, S., Kraljić, K., Škevin, D., Drakula, S., Voučko, B., Čukelj, N., Obranović, M., Ćurić, D. (2019) Application of cryogenic grinding pretreatment to enhance extractability of bioactive molecules from pumpkin seed cake, *J. Food Process Eng.*, **42**
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, **239**, 70–76 (online)
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R. G. (2008) Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease, *Bioresour. Technol.*, **99**, 335–343.
- BIO – CAT (2019) BIO – CAT – Homepage < <https://www.bio-cat.com/fungal-protease-a/>> Pristupljeno 13. Lipanj 2019
- Bošnjaković, A. (2017) Antioksidansi i njihovi doprinosi zdravlju i ljepoti kože, Završni rad, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **28**, 25–30
- Butković, D. (2018) Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnostihrvatskih maslinovih ulja, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, **109**, 144–148.

EFSA (2013) Scientific Opinion on the safety of “rapeseed protein isolate” as a Novel Food ingredient, EFSA - European Food Safety Authority, Parma,
< <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3420> > Pristupljeno 3. Kolovoza 2021

Fetzer, A., Herfellnerb, T., Stäblerb, A., Mennerb, M., Eisner, P. (2018) Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake, *Ind. Crops Prod.*, **112**, 236-246

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

HRN ISO 1871:2017 Poljoprivredni i prehrambeni proizvodi – Opće upute za određivanje dušika Kjeldahlovom metodom

Ivanek-Martinčić, M., Barić, K., Ostojić, Z., Augustinović, Z. (2019) Važnost korova i kritično razdoblje zakorovljenosti u uzgoju uljne buče, *Glasiilo biljne zaštite*, **3**, 348-359

Jašić, M. (2009, 19. Lipanj) Peptidi i proteini, Tehnologija hrane,
<<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/peptidi-proteini>> Pristupljeno 13. Kolovoza 2019

Jukić, G., Guberac, V., Marić, S. (2006) Utjecaj lokaliteta i godine uzgoja na sadržaj ulja i bjelančevina u sjemenu soje, Izvorni znanstveni rad, Poljoprivredni fakultet Osijek

Kaur, B., Srivastav, P.P. (2017) Effect of Cryogenic grinding on chemical and morphological characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) peel powder, *J. Food Process Preserv.*, **42**

Kotecka-Majchrzak, K., Sumara, A., Fornal, E., & Montowska, M. (2020). Oilseed proteins – Properties and application as a food ingredient. *Trends in Food Sci. Technol.*, **106**, 160–170

Li, L. F., Olsen, K. M. (2016) To Have and to Hold, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **3**, 90-93

Nourmohammad, E., SadeghiMahoona, A., Alami, M., Ghorbani, M. (2017) Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbitapepo* L.) oil cake protein, *Int. J. Food Prop.*, **20**, 3244-3255

Maraš, J. (2011) Utjecaj kultivara i načina proizvodnje na udio bioaktivnih komponenata ulja uljane repice, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb

Medved, I. (2017) Uljana repica i tikva u ishrani peradi, AGROPORTAL.HR
<<https://www.agroportal.hr/peradarstvo/27879>> Pristupljeno 1. Kolovoza 2019

Megazyme (2018) K – PDCAAS (06/18)

<<https://secure.megazyme.com/search/searchbycategory?q=K-PDAACS+06%2F18>>

Pristupljeno 18. Lipanj. 2021

Moslavac, T., Jokić, S., Jurić, T., Krajna, H., Konjarević, A., Muhamedbegović, B., Šubarić, D. (2017): Utjecaj prešanja koštice buče i dodatka antioksidanasa na iskorištenje i oksidacijsku stabilnost hladno prešanog ulja. *Glasnik zaštite bilja*, **6**, 86–97

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

Neđeral, S. (2018) Utjecaj uvjeta prerade koštica buče *Cucurbita pepo l.* na bioaktivne sastojke i održivost ulja, Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Novak, J. (2017) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na masne kiseline i vlakna bučine pogače, prosa i heljde, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Organic Bridge (2019) Bučine sjemenke i bučino ulje < <https://www.ekocrep.eu/bucine-sjemenke-i-bucino-ulje/>> Pristupljeno 2. Rujna 2021

Parčetić – Kostelac, I., Bešlo, D., Šperanda, M., Kopačin T., Jozinović A., Jović T., Đidara M. (2016) Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja, *Stočarstvo* **70**, 71-92

PFOS (2015) PFOS - Poljoprivredni fakultet Osijek

<http://www.bilje.hr/POLJOPRIVREDA/AgBase_1/HTM/uljana.htm> Pristupljeno 10.

Kolovoza 2019

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

Rozan, Pascale; Lamghari, Radia; Linder, Michel; Villaume, Christian; Fanni, Jacques; Parmentier, Michel; Méjean, Luc (1997). *In Viv* and *in Vitro* Digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed Meal Proteins after Various Technological Processes, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1762–1769

Simpson, M. G. (2010). Diversity and Classification of Flowering Plants. U: *Plant Systematics*, **8**, 275–448

Singh, K. K., & Goswami, T. K. (2000). Cryogenic grinding of cloves, *J Food Process Preserv.*, **24**, 57–71.

- Šeler, A. (2007) Određivanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta u liofiliziranim jagodama (*fragaria x ananassa* duch.), Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- Škevin, D. (2018) Kemija i tehnologija ulja i masti, Nastavni materijal, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb
- Šubarić, D., Ačkar, Đ., Miličević, B., Jašić, M. (2013) Nusproizvodi iz prehrambene industrije kao sirovine u proizvodnji funkcionalne hrane, Zbornik sažetaka i radova sa šestog međunarodnog simpozija Hranom do zdravlja
- Tang, C.-H., Wang, X.-S., & Yang, X.-Q. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, **114**, 1484–1490
- Tarek-Tilistyák, J.; Agócs, J.; Lukács, M.; Dobró-Tóth, M.; Juhász-Román, M.; Dinya, Z.; Jekő, J.; Máthé, E. (2014). Novel breads fortified through oilseed and nut cakes, *Acta Aliment.*, **43**, 444–451
- Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2010) Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food Bioprod. Process.*, **88**, 277-282.
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate, *Food Chemistry*, **124**, 1316–1321
- Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Perić-Starčević, I., Krimer-Malešević, V. (2013) In vitro study on digestion of pumpkin oil cake protein hydrolysate: Evaluation of impact on bioactive properties, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **64**, 452 - 460
- Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C. F., Karangwa, E., Abbas, S., & Kamdem, P. E. (2013). Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates, *Food & Function*, **4**, 811.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., & Millán, F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, 447–450.

Voučko, B. (2018) Primjena nusproizvoda prehrambene industrije i inovativnih tehnologija u razvoju pekarskih proizvoda za oboljele od celijakije i šećerne bolesti, Disertacija, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Qian, M. (2002). Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1619–1624.

Zorić, V. (2017) Utjecaj dodatka bučine pogače u krmnu smjesu na fizikalno-kemijska i senzorna svojstva mesa brojlera, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb

IZJAVA IZVORNOSTI

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

Marija Barišić
