



UNIVERZITET U NOVOM SADU

Tehnološki fakultet

ISPITIVANJE UTICAJA PROCESA EKSTRUDIRANJA NA
DOBIJANJE I STABILNOST FUNKCIONALNOG HRANIVA ZA
ŽIVOTINJE NA BAZI LANENOG SEMENA

Doktorska disertacija

Mentor: Prof. dr Ljubinko Lević

Kandidat: Dušica Čolović

NOVI SAD, 2014. GODINE

Posvećeno Nađi

Iskreno se zahvaljujem dr Jovanki Lević na svesrdnoj pomoći i stručnom usmeravanju, a pre svega na izuzetnim prilikama koje mi je pružila i koje su uticale ne samo na moj profesionalni, nego i lični razvoj.

Veliko hvala mom mentoru, profesoru dr Ljubinku Leviću, na idejama i iskustvu koje je podelio sa mnom tokom izrade doktorske disertacije, kao i na podršci koju mi je pružio kada mi je ona bila najpotrebnija.

Zahvaljujem se docentu dr Bojani Ikonić i profesorici dr Etelki Dimić na sugestijama i savetima tokom izrade i pisanja disertacije.

Hvala svim mojim kolegama i prijateljima iz „centra“ koji su mi praktično ili moralno pružili veliku pomoć pri izradi teze. Takođe se zahvaljujem svim kolegama sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije na saradnji.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i bratu koji su tokom svih ovih godina uvek bili uz mene, jer bez njih ne bih bila ono što sam danas. Hvala vam za trud i razumevanje koje mi i dalje pružate.

Na kraju se zahvaljujem suprugu Radmilu, svom najboljem prijatelju, na ogromnoj pomoći, izuzetnom strpljenju, stabilnosti i miru, kao i na ljubavi koju mi zajedno sa našom Nađom svakodnevno pruža.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani material
Vrsta rada (dipl., mag., dok.)	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dipl. inž. Dušica Čolović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje)	Prof. dr Ljubinko Lević, redovni profesor
Naslov rada: NR	Ispitivanje uticaja procesa ekstrudiranja na dobijanje i stabilnost funkcionalnog hraniva za životinje na bazi lanenog semena
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik, latinica
Jezik izvoda: JI	srp./eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2014
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Fizički opis: FO	VI, 158 str., 32 tab., 47 sl.
Naučna oblast: NO	Prehrambeno – biotehnoške nauke
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Ekstrudiranje, funkcionalno hranivo, laneno seme, omega – masne kiseline, optimizacija
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	Istraživanja u ovoj tezi finansirana su od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije – III46012 (2011-2014)
Izvod: IZ	<p>Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj ekstrudiranja na funkcionalno hranivo, čija bi osnovna uloga bila povećanje sadržaja omega-masnih kiselina u ishrani životinja, a naročito α-linolenske kiseline (ALA). Za proizvodnju funkcionalnog hraniva upotrebljeni su laneno seme, kao nosilac funkcionalnih osobina i suncokretova sačma, koja je dodata da se spreči isticanje lanenog ulja tokom ekstrudiranja. Nezavisni parametri ekstrudiranja čiji je uticaj ispitivan bili su: brzina obrtanja puža ekstrudera (240, 360 i 590 o/min), kapacitet punjenja (16, 24 i 32 kg/h), vlaga polaznog materijala (7, 11,5 i 16 %) i ukupna površina otvora na matrici (19,8, 39,6 i 59,4 mm²). Zavisno promenljive karakteristike (odzivi) dobijenog hraniva koje su praćene bile su: sadržaj HCN u hranivu, sadržaj ALA, sadržaj slobodnih masnih kiselina (SMK) i potrošnja energije.</p> <p>Za modelovanje zavisnosti karakteristika hraniva od procesnih parametara ekstrudiranja primenjena je metoda odzivne površine (RSM), a korišćen je Box-Behnken-ov dizajn (BBD) za četiri faktora na tri nivoa. Za svaki od pomenutih odziva definisan je polinom drugog reda i određeni su koeficijenti polinoma, a analizom varijanse potvrđena je tačnost ovih modela. Formirani modeli upotrebljeni su za</p>

optimizaciju procesa ekstrudiranja, sa ciljem da se postigne što veća redukcija cijanogenih glikozida u hranivu, uz što viši sadržaj ALA i što niže SMK i potrošnju energije. Da bi se zadovoljili svi postavljeni uslovi optimizacije, proces ekstrudiranja bilo je potrebno izvoditi pod sledećim uslovima: brzina obrtanja puža – 417,41 o/min, kapacitet punjenja – 32 kg/h, vlaga materijala – 13,39 % i ukupna površina otvora na matrici – 19,80 mm².

Ovako dobijeno hranivo pokazalo je nizak sadržaj HCN, čiji je stepen redukcije u odnosu na početnu vrednost iznosio 76,20 %. Sa druge strane, sadržaj ALA smanjen je za svega 0,69 %, što ukazuje da ekstrudiranje nije negativno uticalo na masnokiselinski sastav proizvedenog ko-ekstrudata.

Nakon proizvodnje ko-ekstrudata, pristupilo se ispitivanju njegove održivosti. U tu svrhu uzorci su skladišteni u klima komori sa mogućnošću kontrolisanog podešavanja temperature, relativne vlažnosti i cirkulacije vazduha. Za praćenje održivosti proizvoda primenjen je modifikovan *Schaal-oven* test. Modifikacija metode sastojala se u podešavanju relativne vlažnosti vazduha na konstantnu vrednost od 40 %, što klasičnom metodom nije propisano. Ova vlažnost vazduha odabrana je na osnovu relativne vlažnosti koja je u trenutku eksperimenta izmerena u prostoriji. U cilju ispitivanja uticaja antioksidanasa na oksidativnu stabilnost proizvoda, uzorcima su dodavani komercijalni preparati karvakrol (200 mg/100 g ko-ekstrudata), vitamin E (135 mg/100 g ko-ekstrudata) i smeša ova dva antioksidansa. Za praćenje oksidativnih i hemijskih promena ko-ekstrudata, određivani su peroksidni broj (Pbr), SMK

	<p>i masnokiselinski sastav. Takođe su ispitane mikrobiološke promene u ko-ekstrudatu. Najsnažnije antioksidativno dejstvo u ovom eksperimentu imao je vitamin E, dok smeša vitamina E i karvakrola nije pokazala sinergističko dejstvo. Sastav masnih kiselina se u toku skladištenja nije statistički značajno promenio. Sa druge strane, ekstrudiranje je pokazalo statistički značajan uticaj ($p = 0,032$) na redukciju ukupnog broja mikroorganizama u hranivu, a najniža vrednost ukupnog broja mikroorganizama (600 cfu/g) zabeležena je u uzorku sa dodatim karvakrolom.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP</p>	<p>21.12.2012.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime/ titula/ zvanje/ naziv organizacije/ status) KO</p>	<p>Predsednik: dr Etelka Dimić, redovni profesor Tehnološki fakultet, Novi Sad</p> <p>Član: dr Jovanka Lević, naučni savetnik Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad</p> <p>Član: dr Ljubinko Lević, redovni profesor Tehnološki fakultet, Novi Sad – mentor rada</p> <p>Član: Dr Bojana Ikonić, docent Tehnološki fakultet, Novi Sad</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Content code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Dušica Čolović, Graduated Engineer
Mentor: MN	Dr Ljubinko Lević, Full professor
Title: TI	Investigation of extrusion influence on production and stability of functional animal feed component based on linseed
Language of text: LT	Serbian language, Latin
Language of abstract: LA	eng./ srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	VI, 158 p., 32 tab., 47 fig.

Scientific field: SF	Food – biotechnical Sciences
Scientific discipline: SD	Food Engineering
Subject, key words: SKW	Extrusion, functional feed compound, linseed, omega-fatty acids, optimization
UC	
Holding data: HD	Library of the Faculty of technology, University of Novi Sad
Note: N	Researches in this thesis were funded by Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia – III46012 (2011 - 2014)
Abstract: AB	<p>The goal of the research in this thesis was to examine the effect of extrusion on functional feed compound, whose main role was to increase the content of omega-fatty acids in animal nutrition, especially α-linolenic acid (ALA). Flax seed, as the holder of the functional properties, and sunflower meal, as an adsorbent of linseed oil during extrusion, were used for the production of functional feed compound. Independent extrusion parameters studied in the experiment were: extruder screw speed (240, 360 and 590 rpm), loading capacity (16, 24 and 32 kg/h), the moisture content of the starting material (7, 11.5 and 16 %) and the total die opening's area (19.8, 39.6 and 59.4 mm²). Dependent variables (responses) of the produced feed compound were: HCN content in co-extrudate, ALA content, the content of free fatty acids (FFA) and energy consumption.</p> <p>Response surface methodology (RSM) was applied in order to model mathematical dependence between co-extrudate characteristics and the independent process parameters. The experiments were designed according to Box-Behnken's design (BBD) with four</p>

factors, each at three levels. Second-order polynomial equation was developed for each of these responses, and polynomial coefficients were determined. Accuracy of each model was confirmed by analysis of variance (ANOVA). Formed polynomial models were used to optimize the extrusion process, with the aim of achieving high reduction of cyanogenic glycosides in feed compound, the highest content of ALA, as well as low FFA and low energy consumption. Obtained optimal conditions were: extruder screw speed - 417.41 rpm, loading capacity - 32 kg/h, moisture content of starting material - 13.39 % and the total die openings' area - 19.80 mm².

Functional feed compound produced under these conditions showed a low concentration of HCN, and the degree of HCN reduction was 76.20 % compared to the starting HCN content. On the other hand, the ALA content was reduced by only 0.69 %, indicating that extrusion did not significantly affect the fatty acid composition of the produced co-extrudate.

The next step was investigation of stability of produced co-extrudate. For this purpose, the samples were stored in a climate chamber capable of setting temperature, relative humidity and air circulation. Modified *Schaal-oven* test was used to monitor the stability of the product. Modification of the method consisted in adjusting the relative humidity at a constant value of 40 %, which is not required by a classical method. Such level of humidity was selected based on the relative humidity of air, which was measured in the experimental room at the moment. Commercial carvacrol (200 mg/100g of co-extrudate), vitamin E (135 mg/100 g

	<p>of co-extrudate) and a mixture of these two antioxidants were added to the samples in order to investigate the influence of antioxidants on the oxidative stability of the product. Peroxide value (PV), FFA and fatty acid composition were determined in order to monitor oxidative and chemical changes in co-extrudate. Microbial changes were also examined in the functional feed compound. The most powerful antioxidant effect in this experiment had vitamin E, and a mixture of vitamin E and carvacrol did not show a synergistic effect. The fatty acid composition during storage was not significantly changed in any sample. On the other hand, extrusion process showed a statistically significant effect ($p = 0.032$) on the reduction of total number of microorganisms in feed, and the lowest value of the total number of microorganisms (600 cfu/g) was observed in the sample with added carvacrol.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	<p>December, 21st, 2012</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>President: Dr Etelka Dimić, Full Professor Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p>Member: Dr Jovanka Lević, Principal Research Fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad</p> <p>Member: Dr Ljubinko Lević, Full Professor Faculty of Technology, Novi Sad – mentor</p> <p>Member: Dr Bojana Ikonić, Docent Faculty of Technology, Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	PREGLED LITERATURE.....	4
2.1	Funkcionalna hraniva i hrana za životinje.....	4
2.2	Laneno seme kao hranivo sa funkcionalnim karakteristikama.....	7
2.2.1	<i>Laneno ulje</i>	11
2.2.2	<i>Proteini lanenog semena</i>	13
2.2.3	<i>Tokoferoli, polifenoli i lignani</i>	13
2.2.4	<i>Cijanogeni glikozidi</i>	14
2.2.5	<i>Mucilage-biljna sluz, tripsin inhibitor i linatin</i>	18
2.3	Problem oksidacije tokom skladištenja hraniva bogatog mastima	19
2.3.1	<i>Antioksidativno dejstvo vitamina E</i>	22
2.3.2	<i>Karvakrol kao biološki aktivno jedinjenje</i>	24
2.4	Proces ekstrudiranja i njegova primena u tehnologiji hrane za životinje.....	28
2.4.1	<i>Jednopusni ekstruderi</i>	31
2.4.2	<i>Kritični faktori pri procesu ekstrudiranja</i>	33
2.4.3	<i>Promena fizičko-hemijskih karakteristika sirovina u postupku ekstrudiranja</i>	34

2.4.4	<i>Utica</i> j ekstrudiranja na masti.....	36
2.4.5	<i>Problem</i> ekstrudiranja uljarica i upotreba suncokretove sačme u cilju prevazilaženja problema.....	39
2.4.6	<i>Utica</i> j ekstrudiranja na prirodne toksine.....	42
2.4.7	<i>Utica</i> j ekstrudiranja na proteine	44
2.5	Eksperimentalni dizajn i metoda odzivne površine.....	46
3.	MATERIJAL I METODE	51
3.1	Materijal.....	51
3.2	Tehnološki postupak ekstrudiranja.....	52
3.3	Osnovne hemijske analize sirovina i ko-ekstrudata	56
3.4	Određivanje sadržaja cijanogenih glikozida preko sadržaja cijanovodonične kiseline u uzorcima	57
3.5	Određivanje sastava masnih kiselina u uzorcima.....	59
3.6	Eksperimentalni plan i statistička obrada podataka.....	60
3.7	Skladištenje funkcionalnog hraniva pri kontrolisanim uslovima relativne vlažnosti vazduha i temperature; hemijske i mikrobiološke analize.....	63
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	65
4.1	Hemijski i masnokiselinski sastav polaznih sirovina.....	65
4.2	Uticaj variranih parametara procesa na sadržaj HCN i redukciju cijanogenih glikozida u dobijenom ko-ekstrudatu.....	68

4.3	Uticaj variranih parametara procesa na masnokiselinski sastav ko-ekstrudata i sadržaj esencijalne α -linolenske kiseline.....	76
4.4	Uticaj variranih parametara procesa na sažaj slobodnih masnih kiselina u ko-ekstrudatu.....	84
4.5	Uticaj variranih parametara procesa na potrošnju energije tokom ekstrudiranja.....	91
4.6	Uticaj variranih parametara procesa na promenu temperature u cevi ekstrudera i indeks rastvorljivosti azota ko-ekstrudata.....	98
4.6.1	<i>Promena temperature.....</i>	98
4.6.2	<i>Promena indeksa rastvorljivosti azota.....</i>	102
4.7	Optimizacija procesa ekstrudiranja.....	103
4.8	Ispitivanje skladišne stabilnosti proizvedenog ko-ekstrudata.....	113
4.8.1	<i>Promene peroksidnog broja i kiselosti ko-ekstrudata tokom skladištenja.....</i>	113
4.8.2	<i>Masnokiselinski sastav ko-ekstrudata u periodu skladištenja.....</i>	122
4.8.3	<i>Mikrobiološke promene tokom skladištenja ko-ekstrudata u klima komori.....</i>	126
5.	ZAKLJUČCI.....	131
5.1	Uticaj variranih parametara procesa na karakteristike ko-ekstrudata i potrošnju energije.....	131
5.2	Optimizacija procesa ekstrudiranja.....	133
5.3	Skladišna stabilnost proizvedenog ko-ekstrudata.....	134
6.	LITERATURA.....	136

SPISAK SKRAĆENICA

ALA	α -linolenska kiselina
ANOVA	Analiza varijanse
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOCS	American Oil Chemist Society
ATP	Adenozin trifosfat
BBD	Box-Behnken Design
BHA	Butil-hidroksianisol
BHT	Butil-hidroksitoluen
CCD	Central Composite Design
CCOD	Central Composite Orthogonal Design
CCRD	Central Composite Rotatable Design
CFU	Colony-Forming Units
DF	Degree of Freedom
DHA	Dokosaheksaenska kiselina
DM	Doehlert Matrix
E	Energija
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	Eikosapentaenska kiselina
FAO	Food and Agriculture Organization
FID	Flame Ionisation Detector – Plameno jonizujući detektor
GC	Gas chromatograph - Gasni hromatograf
HTST	High Temperature Short Time
meq	Miliekvivalent
m.f.	Masna faza
MS	Mean of Squares
MUFA	Mononezasićene masne kiseline

NSI	Nitrogen Solubility Index - indeks rastvorljivosti azota
Pbr	Peroksidni broj
PG	Propil galat
PUFA	Polinezasićene masne kiseline
RSM	Response Surface Metodology – Metoda odzivne površine
TBHQ	Terc-butil-hidrohinon
SD	Standardna devijacija
SFA	Zasićene masne kiseline
s.m.	Suva materija
SMK	Slobodne masne kiseline
SS	Sum of Squares
WHO	World Health Organization

1. UVOD

Savremena tehnologija hrane za životinje podrazumeva mnogo više od proizvodnje hrane na osnovu standardnih receptura koje bi zadovoljile osnovne nutritivne zahteve životinja. U pitanju je kompleksan proces pronalaženja novih hraniva i načina proizvodnje koji bi hrani za životinje, pored osnovne, dale dodatnu fiziološku funkciju unapređenja opšteg stanja životinjskog organizma. Ovakvo shvatanje hrane proizašlo je iz mnogobrojnih naučnih potvrda da se kroz ishranu mogu modifikovati specifične funkcije organizma, zdravstveno stanje i razvoj životinje.

Razvoj funkcionalne hrane za životinje je specifičan izazov za naučnike, koji zahteva interdisciplinarn pristup i saradnju između naučnih institucija različitih oblasti izučavanja. Pre svega, neophodno je odlično poznavanje karakteristika i kvaliteta sirovina koje se u ovakvoj proizvodnji koriste. Početna faza u razvoju funkcionalnog hraniva, ili hrane jeste identifikacija specifične i potencijalno poželjne osobine jedne, ili nekoliko komponenata. Sa druge strane, pouzdano se mora znati da li ista komponenta ima neželjene efekte, odnosno kako se oni eventualno mogu ukloniti. Sve ovo pripada oblasti fundamentalnih istraživanja, čiji rezultat treba da bude bolje razumevanje delovanja pojedinih aktivnih komponenata na životinjski organizam.

Laneno seme već dugi niz godina privlači izuzetnu pažnju, kako u ishrani ljudi, tako i u ishrani životinja, zbog svog specifičnog i sa nutritivnog aspekta poželjnog masnokiselinskog sastava. Poznato je da ova uljarica sadrži oko 50 % esencijalne α -linolenske omega-3 masne kiseline (ALA). Ova karakteristika čini ga izuzetno zanimljivom sirovinom za proizvodnju funkcionalnih hraniva, koja bi povećala unos esencijalnih masnih kiselina u organizam životinja, a samim tim i promenila masnokiselinski sastav lipida mesa i drugih animalnih proizvoda. Osnovna prepreka koja se u upotrebi lanenog semena kao hraniva javlja je prisustvo antinutritivnih materija - cijanogenih glikozida. Pomenuta jedinjenja pod dejstvom enzima β -glukozidaze oslobađaju cijanovodoničnu kiselinu (HCN), koja izaziva trovanja, neuropatije, pankreatični dijabetes i druga oboljenja, a u prekomernim količinama ima letalan efekat. Da bi se laneno seme pre upotrebe detoksifikovalo i smanjila količina oslobođenja HCN u organizmu, najčešće se primenjuju toplotni tretmani kao što su autoklaviranje, peletiranje, ekstrudiranje ili mikrotalasno pečenje. Od svih navedenih

postupaka, ekstrudiranje se nameće kao najpogodnije u proizvodnji hrane za životinje iz nekoliko razloga, a pre svega jer omogućava tretiranje velike količine materijala u kratkom vremenskom periodu, uz istovremeno postizanje željene detoksifikacije.

Ekstrudiranje može da se objasni kao potiskivanje materijala u praškastoj formi da protiče kroz cev ekstrudera, pri čemu dolazi do smicanja, trenja i zagrevanja materijala. Pod dejstvom pomenutih sila, materijal postaje plastičan, tako da se po izlasku kroz matricu ekstrudera dobija kompaktan proizvod, promenjenih fizičkih i hemijskih karakteristika. Ovaj način obrade materijala se naziva HTST (High Temperature Short Time) proces, tokom kojeg se sirovine izlažu visokim temperaturama u kratkom vremenskom periodu. Na taj način, postiže se redukcija i inaktivacija antinutritivnih materija i povećava svarljivost hraniva usled delimične denaturacije proteina i želatinizacije skroba, bez značajnog smanjenja hranljive vrednosti tretiranog materijala.

Primena procesa ekstruzije radi inaktivacije antinutritivnih materija u hranivima je dobro poznata i veoma rasprostranjena. Šezdesetih godina dvadesetog veka u SAD počela je masovna upotreba ekstrudera upravo radi termičke inaktivacije tripsin-inhibitora u soji. Pored primenjene toplote, dokazno je da se sa povećanjem vlažnosti materijala intenzivira efikasnost detoksifikacije tokom ekstrudiranja, što važi i za tretiranje lanenog semena.

Iako ekstrudiranje nema veliki uticaj na sadržaj i sastav masti, on nije zanemarljiv. Ukoliko se masti ekstrudiraju u kombinaciji sa ugljenim hidratima i proteinima, pri niskom sadržaju vlage (manje od 20 %) i povišenim temperaturama (više od 150 °C), formiraju se kompleksi mast-ugljeni hidrati i mast-proteini. Kada se govori o masnokiselinskom sastavu ekstrudirane hrane, neophodno je obratiti pažnju na promene kod polinezasićenih masnih kiselina dugih lanaca, koje su visoko reaktivne i podložne degradaciji. Ekstrudirani proizvodi generalno nisu podložni enzimatskim procesima kvarenja, što je najčešće posledica hidrolize, ili oksidativnih promena. Glavni uzročnici kvarenja su slobodne masne kiseline, jer su osetljivije na oksidaciju od triglicerida, a pored toga pokazuju i osobine promotora oksidacije lipida.

Pravilno podešavanje parametara ekstrudiranja veoma je važno, kako bi se postigli željeni efekti procesa i izbegli gubici hranljive vrednosti proizvoda. Neki od najznačajnijih parametara ekstrudiranja su brzina obrtanja puža ekstrudera, površina i

geometrija otvora na matrici, kapacitet punjenja ekstrudera, pritisak i temperatura u cevi, itd. U zavisnosti od konstrukcije uređaja, na ekstruderu se može podešavati nekoliko procesnih parametara istovremeno. S obzirom na kompleksnost procesa, optimizacija ekstrudiranja empirijskim putem je izuzetno obiman i komplikovan posao, vremenski veoma zahtevan. Zbog toga se u istraživanjima sve češće koriste različiti oblici matematičkog modelovanja, koji smanjuju broj eksperimenata, uz istovremeno dobijanje dovoljne količine podataka, pomoću kojih se mogu objasniti uzročno posledične veze između nezavisno promenljivih parametara procesa i zavisnih karakteristika dobijenog proizvoda.

Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj procesnih parametara ekstrudiranja (brzine obrtanja puža, kapaciteta punjenja ekstrudera, ukupne površina otvora na matrici i vlažnosti polaznog materijala) na kvalitet ko-ekstrudata lanenog semena i suncokretove sačme, u svrhu dobijanja funkcionalnog hraniva sa povećanim sadržajem omega-3 masnih kiselina. Od karakteristika ko-ekstrudata, posebna pažnja bila je posvećena masnoj fazi, to jest njenom masnokiselinskom sastavu i sadržaju slobodnih masnih kiselina, ali i stepenu redukcije antinutritivnih materija lanenog semena – cijanogenih glikozida. Još jedan segment ispitivanja bila je potrošnja energije u toku ekstrudiranja. Za modelovanje procesa primenjen je postupak odzivne površine, a potom su utvrđeni optimalni parametri procesa, pri kojima bi se dobile željene karakteristike proizvoda. Drugi cilj eksperimenta bio je da se ispita održivost ovakvog funkcionalnog hraniva na bazi hemijskih promena, oksidativne, i mikrobiološke stabilnosti ko-ekstrudata.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Funkcionalna hraniva i hrana za životinje

Jasno i precizno definisanje sastava hrane, bilo da je u pitanju hrana za ljude, ili životinje, predstavlja veliki izazov za prehrambene tehnologe. Zajedno sa promenom životnog stila, menja se i hrana, što za sobom povlači upotrebu novih sirovina koje se koriste u njenoj proizvodnji. Vrlo često, ovakve promene prođu neopaženo od strane potrošača, ali naučnici koji su odgovorni za određivanje nutritivne vrednosti i sastava hrane ne mogu ih ignorisati. Industrija hrane za životinje, poljoprivredni proizvođači, a sada i potrošači, sve učestalije pokazuju interes za funkcionalnom hranom i hranivima.

Sam termin „funkcionalna hrana“ prvi put je upotrebljen u Japanu osamdesetih godina prošlog veka, a odnosio se na namirnice „pojačane“ određenom komponentom koja poseduje pozitivne fiziološke efekte (Hardy, 2000; Stanton et al, 2005). Preciznu definiciju funkcionalne hrane prvi je dao Roberfroid. Po njemu, to je ***hrana slična konvencionalnoj po izgledu, sa tendencijom da postane deo uobičajene svakodnevne ishrane, ali modifikovana tako da obavlja i specifičnu fiziološku funkciju, pored prostog zadovoljenja nutritivnih potreba*** (Roberfroid, 1999). Jednostavnije rečeno, funkcionalna hrana je ona koja obezbeđuje zdravstvenu dobit, pored osnovne nutritivne. Nastala je iz želje da se prvobitno ljudima, a potom i životinjama obezbedi dodatna korist, unapređivanjem standardnih karakteristika namirnica. Njihovom upotrebom mogu se poboljšati dostupnost i ukus već postojećih proizvoda, a pored toga mogu se i samostalno konzumirati (Roberfroid, 1999).

Iako funkcionalna hrana nudi potencijalne povoljnosti, neophodno je razmotriti sve faktore, pre nego što se sastav hrane za životinje promeni. Mnoge od komponenata koje se smatraju funkcionalno poželjnim poznate su nutricionistima, ali sve njihove karakteristike još uvek nisu u potpunosti određene. Uprkos činjenici da je prehrambena tehnologija napredovala do tačke gde se promene u proizvodnji izvode vrlo jednostavno i gotovo svakodnevno, sasvim je opravdan i razuman argument da i dalje ne znamo dovoljno o svim ulogama koje dijetetske komponente imaju, a tu se naročito misli na one koje nisu tradicionalne (Spence, 2006). Da bi se izbeglo eventualno nerazumevanje uloge

funkcionalnih komponenata, ili potencijalno bioaktivnih hraniva i dodataka, sastavljanje recepture za funkcionalnu hranu zahteva pažljiv i temeljan pristup.

Još jedna od opasnosti koja se javlja je prekomerna konzumacija i moguće toksično dejstvo funkcionalnih hraniva. Promena recepture može sa jedne strane doprineti povećanom unosu poželjnih sastojaka, ali sa druge strane postoji mogućnost redukovanja raznovrsnosti upotrebljavanog hraniva. Ako funkcionalna hrana obezbeđuje sve neophodne nutrijente, potrošači bi vrlo lako mogli da se oslone samo na njih, čime bi ishrana postala daleko neraznovrsnija, a to opet ima negativan efekat na peristaltiku creva i pravilno funkcionisanje organa za varenje (*Spence, 2006*).

Najčešće upotrebljavane tehnologije u razvoju funkcionalne hrane su:

- 1) Poboljšanje tradicionalnih tehnika uzgoja i proizvodnje biljaka i životinja. Dobar primer za to je kontrolisana ishrana koka nosilja, kako bi se dobila jaja sa smanjenim sadržajem holesterola (*Ting et al., 2011; Ogasahara et al., 1991*).
- 2) Mešanje fiziološki aktivnih komponenata sa tradicionalnom hranom. Ovo je uobičajena i najčešća metoda u industriji hrane za životinje, tokom koje se koristi tradicionalna tehnologija proizvodnje, ali se menja sastav hrane, kako bi se inkorporirale fiziološki aktivne komponente. Tako je danas vrlo rasprostranjeno dodavanje biljnih ekstrakata, ili esencijalnih ulja za koje je utvrđeno da pozitivno utiču na svarljivost dijetetskih vlakana kod preživara (*Hart et al., 2008*), ili da efikasno zamenjuju antibiotike i promotore rasta (*Vieira et al., 2008*).
- 3) Matriks inženjering. Ovo je tip prehrambenog inženjeringa koji se zasniva na primeni poznate kompozicije, strukture i sličnih karakteristika hrane, uz promenu parametara procesa, radi usavršavanja pojedinih senzornih i/ili funkcionalnih osobina prehrambenih proizvoda. Primeri matriks inženjeringa česti su pri ekstrudiranju, tostiranju, pečenju, itd (*Fito et al., 2001*).
- 4) „Pojačavanje hrane“. Ovaj tip proizvodnje funkcionalne hrane je jedan od najstarijih i podrazumeva veštačko povećavanje koncentracije već prisutne komponente u hrani, kako bi se intenziviralo njeno dejstvo tokom konzumacije. Primer za takozvano pojačavanje hrane za životinje je dodatak rastvora uree u hranu za junad na bazi kukuruza (*Judkins et al., 1991*).

Funkcionalna hrana se poslednjih godina u uzgoju životinja primenjuje vrlo intenzivno, a cilj je uglavnom poboljšanje zdravlja i opšteg stanja organizma životinja, bolja konverzija hrane i brži rast jedinki, ili promena hemijskog sastava i nutritivne vrednosti animalnih proizvoda koji su namenjeni prehrambenoj industriji.

Upotreba različitih fitogenih aditiva veoma je rasprostranjena u ishrani tovnih pilića. Uglavnom se koriste kao zamena za antibiotike i kao promotori rasta, međutim, novija ispitivanja pokazuju da ovi funkcionalni dodaci mogu poboljšati kvalitet pilećeg mesa. *Hu* i saradnici su u eksperimentima na brojlerima dodali u smešu 1 % aditiva na bazi kineskih biljaka *eucommia* i *bark*, što je povećalo kapacitet zadržavanja vode u mišićima, smanjilo zastupljenost intramuskularne masnoće i gubitke tokom ceđenja i kuvanja mesa (*Hu et al*, 2005). Nedavna ispitivanja dodatka antioksidanasa u hranu za piliće dokazala su da ova jedinjenja ne samo da redukuju oksidativni stres, već mogu da ublaže negativne efekte povišene temperature okoline u toku uzgoja tovnih pilića (*Tuzcu et al*, 2008; *Wang et al*, 2008).

Kada je reč o ishrani svinja, funkcionalna hrana je takođe pretežno zasnovana na dodatku različitih fitogenih aditiva, sa sličnom funkcijom kao kod tovnih pilića. Pored toga, poznata je upotreba nesvarljivih oligosaharida kao funkcionalnih dodataka hrani za prasadi. Nekolicina autora pokazala je da jedinjenja ove grupe, frukto-oligosaharidi i *trans*-galakto-oligosaharidi pozitivno utiču na prinos i konverziju hrane kod prasadi, kao i da redukuju pojavu dijareje (*Katta et al.*, 1993).

U ishrani riba funkcionalna hrana je pretežno usmerena ka poboljšanju zdravstvenog statusa i bržem rastu ribe. *Tacchi* i saradnici su u svojim ispitivanjima dokazali da je funkcionalna hrana za pastrmke koja je sadržala probiotike, nukleotide, vitamin C i E značajno izmenila biološke procese u jetri ispitivanih riba. Ovakva hrana poboljšala je prinos i pokazala pozitivan uticaj na imuni sistem riba (*Tacchi et al.*, 2011).

Polje razvoja funkcionalne hrane gotovo da je neograničeno. Faktori koji usporavaju eventualni napredak su ekonomska dobit, spremnost potrošača da prihvate novi proizvod i za njega plate veću cenu, ali i ograničena mašta prehrambenih tehnologa i nutricionista. Kada je u pitanju ishrana životinja, prepreka u vidu prihvaćenosti od strane potrošača je manja, jer životinje nemaju svesnu sumnju i strah od nepoznate i naizgled neobične namirnice. Stoga je oblast proizvodnje hrane za životinje do

određenog stepena pogodnija za razvoj funkcionalnih suplemenata, koji bi potom mogli da se primene u ljudskoj ishrani, ako bi dali pozitivne rezultate.

2.2 Laneno seme kao hranivo sa funkcionalnim karakteristikama

Lan je jednogodišnja, ili dvogodišnja biljka, jedno od najkorisnijih krmiva koje se u komercijane svrhe uzgaja u više od trideset zemalja širom sveta (*Karlović et Andrić, 1996; Gabiana, 2005; Dimić, 2005*). Zapravo, njegovo latinsko ime (*Linum usitatissimum*) u prevodu na srpski jezik znači "najkorisniji". Iako se u početku, pre oko tri hiljade godina, uzgajao uglavnom u medicinske svrhe i zbog vlakana od kojih se izrađivalo laneno platno, danas se prvenstveno koristi laneno ulje, bilo da je u pitanju prehrambena, ili hemijska industrija (*Đorđević et Dinić, 2011; Bhatti, 1990*). Seme lana je jajastog oblika (Slika 2.1), spljošteno i mrke boje (*Dimić, 2005*). Predstavlja bogat izvor ulja, jer ga u proseku sadrži oko 40 %, u čijem sastavu su čak i preko 70 % nezasićene masne kiseline. Pomenuti visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina čini laneno ulje pogodnom sirovinom za proizvodnju širokog spektra proizvoda (*Matheson, 1976; Daun et al., 2003; Flax Council of Canada, 2011*). Osim velike količine ulja, sadrži još i oko 7 – 9 % vlage, 2,50 – 4 % sirovog pepela, oko 20 - 30 % sirovih proteina i 12 – 20 % sirovih vlakana (*Ivanov et al., 2012c; Daun et al., 2003; Karlović et Andrić, 1996*).



Slika 2.1 Laneno seme i cvet lana

Laneno seme se često dodaje u hranu za životinje (goveda, svinje, živinu i ribe), kao zamena za neku drugu uljaricu, ili njenu sačmu, čime se menja masnokiselinski

sastav masne faze mesa i mleka, a preko njega povećava i unos esencijalnih masnih kiselina u ljudski organizam. Dobro je poznato da meso u širem smislu predstavlja bogat izvor masti u ishrani čoveka. U brojnim radovima, potvrđen je pozitivan uticaj lanenog semena na masnokiselinski sastav mesa gajenih životinja. Ono pre svega povećava količinu α -linolenske kiseline (ALA) prisutne u mesu i mleku (*Guillevic et al.*, 2009; *Bryhni et al.*, 2002; *Larsen et al.*, 2012), a koliko će to povećanje biti, zavisi od vrste životinje i količine lanenog semena dodatog tokom ishrane.

S obzirom na visok sadržaj ulja, laneno seme se u ishani krava i goveda koristi kao izvor masnoće. Sadržaj masti u ishrani ovih životinja ograničen je na maksimalno 5 % na suhu materiju (s.m.). Prema tome, maksimalna količina lanenog semena u ishrani goveda i krava ne bi trebala da prelazi 12-14 % (s.m.), u zavisnosti od hemijskog sastava upotrebljene sirovine (*Byers et Schelling*, 1988). Lan se može posmatrati i kao alternativni izvor proteina u ishrani preživara, ali u ograničenim količinama, zbog visokog sadržaja ulja (*Lardy et Anderson*, 1999). Kada se dodaje u hranu mlečnim kravama u količinama do 8 % (s.m.), nisu zabeležene promene u prinosu mleka, kao ni u količini utrošene hrane (*Ward et al.*, 2002). Međutim, ista grupa autora zaključila je da prekomerne količine lanenog semena u ishrani mlečnih krava menjaju hemijski sastav mleka, smanjujući mu sadržaj proteina. Utvrđeno je takođe da seme koje je tretirano nekim postupkom (tostiranjem, ekstrudiranjem, i sl.) pokazuje veću efikasnost u pogledu prinosa mesa, nego netretirano seme (*Maddock et al.*, 2004). Lan pokazuje blagotvorno dejstvo na zdravlje hranjenih goveda. U svojim ispitivanjima na tek odbijenoj teladi, *Drouillard* i saradnici su zapazili smanjen broj mladunčadi zaraženih respiratornim oboljenjima u grupi kojoj je dodavan lan u hranu (*Drouillard et al.*, 2002), dok je druga grupa naučnika potvrdila poboljšan imunitet kod volova (*Farren et al.*, 2002).

Svinje su monogastrične životinje, pa se ALA kod njih ne hidrogenizuje u tankom crevu, kao što je to slučaj kod preživara, kod kojih ova esencijalna masna kiselina dospeva u burag gde joj se redukuje broj nezasićenih veza pod dejstvom buražnih bakterija. (*Scollan et al.*, 2001). Stoga je i količina ALA dostupne za absorpciju veća, a razlike u masnokiselinskom sastavu mesa u odnosu na standardno hranjene svinje izraženija, nego kada se porede goveda hranjena lanenim semenom i kontrolnom dijetom. U isharni najmlađih kategorija, preporučuje se da količina lanenog semena ne

prelazi 3 %. Veće količine imaju negativan uticaj na rast mladunčadi zbog prisutnih cijanogenih glikozida i *mucilage*, ili kako se kod nas naziva biljne sluzi, s obzirom da mlad organizam još uvek nije razvio mehanizme kojima bi prevazišao njihove negativne efekte (Newkirk, 2008). Količina lanenog semena u ishrani odraslih svinja ne bi trebalo da prelazi 15 % (Htoo et al., 2008), a prema nekim autorima čak ni 10 % zbog negativnog uticaja na senzorne karakteristike mesa (Juárez et al., 2011). Utvrđeno je da pri ovim količinama svinjsko meso nije pogodno za konzumaciju, jer se javljaju izražen miris i ukus na ribu, smanjena oksidativna stabilnost i povećana mekoća masnog tkiva (Juárez et al., 2011; Cannata et al., 2010). Iako nije u potpunosti dokazano, smatra se da je uzročnik riblje arome 1-penten-3-on, jedinjenje koje se formira tokom zagrevanja i termičke obrade mesa. (Hall et al., 2006). Primena lanenog semena u količinama do 10-15 % ne pokazuje negativan uticaj na prinos mesa, kao ni na njegov senzorni kvalitet, uz istovremeno poboljšanje sastava masnih kiselina lipida mesa.

S obzirom na dokazano blagotvorno dejstvo po zdravlje ljudi i životinja, laneno seme se često dodaje u hranu za krmače iz medicinskih razloga. Ono poseduje fitoestrogene koji pozitivno utiču na produktivnost krmača i zdravlje novorođene prasadi (Newkirk, 2008). Dokazano je da primena lanenog semena u ishrani krmača smanjuje procenat smrtnosti tek rođene prasadi, povećava njihovu masu i skraćuje vremenski period dojenja mladunčadi (Lawrence et al., 2004). Dalja istraživanja u ovom pravcu su svakako neophodna, ali se prema dosadašnjim podacima pouzdano može reći da primena do 5 % mlevenog lanenog semena u ishrani ima dugotrajne pozitivne efekte po zdravlje i produktivnost krmača (Newkirk, 2008).

Laneno seme se primenjuje i u ishrani peradi, prvenstveno da bi se dobili meso i jaja sa povećanim sadržajem omega-3 masnih kiselina. U ishrani koka nosilja, može se dodavati kao izvor energije, ili kao izvor proteina. Svarljivost proteina lana je slabija nego kod sojine sačme, pa je neophodno voditi računa o aminokiselinskom sastavu kompletne smeše. Upotreba lanene sačme ograničena je na 3 % kod mladih jedinki, odnosno na 10 % kod odraslih nosilja, zbog prisustva *mucilage* - biljne sluzi, neskrobnog polisaharida koji ima potencijalno antinutritivno dejstvo na živinu (Newkirk, 2008). Zbog svega navedenog, kod koka nosilja se dodatak lana u ishranu preporučuje tek nakon dostizanja polne zrelosti. Umerenim doziranjem lanenog semena u okviru sugerisanih granica, ne javljaju se negativni efekti u razvoju peradi, dok se istovremeno

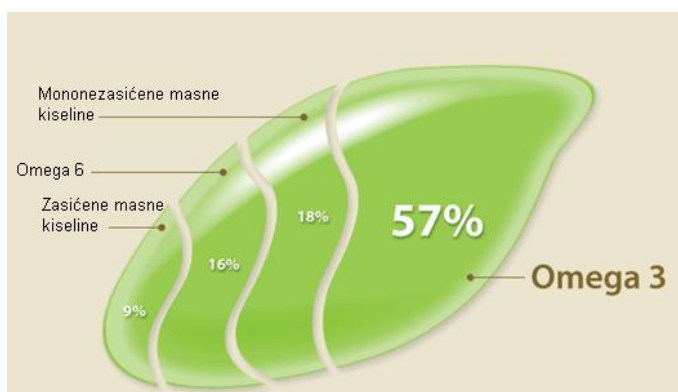
dobijaju jaja obogaćena pre svega ALA. *Bean* i *Leeson* su u svojim ispitivanjima u smešu za koke nosilje na bazi sojine sačme i kukuruza dodavali 10 % lanenog semena u periodu od tri nedelje nakon dvadeset osam nedelja starosti životinja. Ovakva dijeta nije imala nikakav negativan uticaj na prinos jaja, ili razvoj samih ptica. Jedina promena koja je registrovana bila je izmenjen masnokiselinski sastav jaja i to skoro 10 puta veći sadržaj ALA i oko 2 puta veći sadržaj dokosaheksaenske kiseline (DHA) (*Bean et Leeson*, 2003). Još bolje rezultate dala je primena lanenog ulja, koje je, na žalost, slabo dostupno i neisplativo u proizvodnji hrane za životinje, zbog čega je upotreba lanenog semena daleko zastupljenija. Dodatak 5 % lanenog ulja u smešu, povećao je sadržaj ALA u jajima sa 6,3 % na 40,2 %, a dodatak od 10 %, na 48,3 % (*Grobas et al.*, 2001).

U ishrani brojlera, upotreba lanene sačme takođe mora biti u okviru već navedenih granica koje su iste kao za koke nosilje, na prvom mestu zbog prisutne biljne sluzi. Naime, ovaj neskrobni polisaharid smanjuje viskozitet unete hrane u crevima brojlera, zbog čega je slabija i absorpcija hranljivih materija. Drugi razlog za usporen rast brojlera mogao bi biti prisutni linatin (antivitamin B6), ali se njegovo negativno dejstvo vrlo lako prevazilazi dodatkom povećane količine vitamina B6 u hranu i on ne predstavlja suštinski problem (*Newkirk*, 2008; *Eastwood*, 2008). Dodatak lanenog semena u hranu za brojlere može biti i bez ikakvih negativnih posledica na rast životinja i senzorne karakteristike mesa, ukoliko količina lana ne prelazi 3-5 % (*Newkirk*, 2008).

Kao što je to slučaj kod goveda i svinja, ishrana živine na bazi lana ima blagotvorno dejstvo i na njeno zdravstveno stanje. Potvrđeno je da dodatak lanenog semena u hranu za brojlere, naročito u samlevenom obliku, sprečava razvoj protozoe *Eimeria tenella*, uzročnika kokcidioze (*Allen et al.*, 1997). Ovaj parazit se razvija u pretežno anaerobnoj sredini i veoma je osetljiv na oksidativni stres. Unosom hrane bogate nezasićenim masnim kiselinama, smanjuje se sadržaj vitamina E i karotenoida u plazmi ćelija tankog creva, što izaziva oksidativni stres i inhibira razvoj *Eimeria tenella*. Međutim, *Eimeria maxima*, takođe izazivač kokcidioze, koja se razvija u središnjem i donjem delu tankog creva, otpornija je na oksidativni stres, pa ishrana na bazi lanenog semena nema nikakav uticaj na njeno suzbijanje (*Allen et al.*, 1997).

2.2.1. Laneno ulje

Laneno ulje spada u grupu “dobro sušivih ulja” zbog veoma visokog jodnog broja (168 - 204 g/ 100 g). Kada je sirovo, ima tamno žutu boju i jak, specifičan miris i ukus (Dimić, 2005). Ovo ulje je dobro poznato kao jedno od najnezasićenijih biljnih ulja sa izuzetno visokim sadržajem ALA, čiji je udeo u ukupnim masnim kiselinama više od 50 % (Gunstone, 2001). Okvirni udeli masnih kiselina u lanenom ulju prikazani su grafički na Slici 2.2. ALA je prekursor eikosapentaenske (EPA) i dokosaheksaenske kiseline (DHA), omega-3 polinezasićenih masnih kiselina, odgovornih za pravilan razvoj mozga kod dece, otpornost na različite alergije, autoimune bolesti, kardiovaskularne probleme i upalne procese (Sierra *et al.*, 2008). U prilog kvalitetu lanenog ulja ide i činjenica da je Nacionalni institut za ispitivanje kancera Sjedinjenih Američkih Država proglasio lan za jednu od šest biljaka koja se preporučuje kao funkcionalni dodatak hrani u prevenciji pojave karcinoma (Oomah, 2001). Laneno ulje u velikim dozama snižava nivo triglicerida, što je dokazano u nekoliko različitih medicinskih studija. Poznato je da inhibira pokretače zapaljenskih procesa u organizmu, čak i kada se koristi u pripremi hrane u domaćinstvu. Stoga se može upotrebljavati u razvoju novih anti-inflamatornih terapija, sa ili bez dodatka lekova, naročito u slučajevima lečenja specifičnih grupa bolesnika (Oomah, 2001).



Slika 2.2 Masnokiselinski sastav lanenog ulja (*Flax council of Canada, 2008*)

Laneno ulje sačinjava 95 – 98 % neutralnih lipida (triglicerida), a tačan odnos neutralnih i polarnih lipida (fosfolipida i glikolipida) uslovljen je sortom, lokalitetom uzgoja i periodom žetve. Masnokiselinski sastav ulja u lanenom semenu zavisi od uslova u kojima je biljka uzgajana, što se naročito odnosi na sastav nezasićenih masnih kiselina. Rani i kasni mrazovi, previsoke temperature i suša imaju odlučujući uticaj na kvalitet semena. Ukoliko je zrno nedozrelo i oštećeno mrazom, imaće značajno niži sadržaj ulja, tamnije boje. Oštećena zrna pokazuju veći sadržaj palmitinske, linolne i ALA, a manji sadržaj oleinske kiseline, od zdravih i celih zrna (*Sediqi, 2012; Hall et al., 2006*). Sastav masnih kiselina lanenog ulja sa različitih geografskih područja (% m/m) dobijenog hladnim presovanjem semena dat je u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1 Masnokiselinski sastav lanenog ulja različitog geografskog porekla

Masna kiselina	Geografsko poreklo		
	Francuska (Sauvant et al, 2000)	Kanada (Bean et Leeson, 2002)	Srbija, sorta Olin (Dimić, 2005)
C14:0 (miristinska kiselina)	0,10	-	-
C 16:0 (palmitinska kiselina)	6,40	5,61	4 – 7
C16:1 (palmitoleinska kiselina)	0,10	0,06	-
C18:0 (stearinska kiselina)	3,40	3,15	2 – 5
C18:1 (oleinska kiselina)	18,70	18,50	12 – 34
C18:2 n-6 (linolna kiselina)	14,70	14,44	17 – 24
C18:3 n-3 (α -linolenska kiselina)	54,20	57,11	35 – 60

Zbog specifičnog masnokiselinskog sastava i visoke nezasićenosti, ulje lana je veoma osetljivo na oksidaciju i polimerizaciju (*Gunstone, 2001*). U svrhu zaštite od hemijskih promena, u hranu koja sadrži laneno seme, bilo da je u pitanju ljudska, ili životinjska, dodaju se i različita polifenolna jedinjenja i biljni ekstrakti koji pokazuju antioksidativno dejstvo. *Michotte et al.* (2011) su u svom radu ispitali mogućnost stabilizacije lanenog ulja dodatkom četiri fenolne komponente: miricetina, katehina, genisteina i kafeinske kiseline. Takođe je poznato da se u istu svrhu koriste vitamin E, ekstrakti ruzmarina, grožđa, citrusa i kadifice (*Gladine et al., 2007; Gobert et al., 2009*), kao i askorbil palmitat, limunska kiselina, askorbinska kiselina, etoksil glikol i smeše pomenutih jedinjenja (*Rudnik et al., 2001*).

2.2.2 Proteini lanenog semena

Kako je ranije pomenuto, lan sadrži između 20 i 30 % proteina na ukupnu masu uzorka, što ga čini dobrim izvorom ovih nutrijenata. Proteini lana su slični proteinima drugih uljarskih kultura, naročito soje, u pogledu hidrofobnosti, sekundarne strukture i površinskih osobina. Strukturno su više lipolitični od proteina soje, što je posledica njihovog povezivanja sa polisaharidima. Takođe je dokazano da poseduju izraženiji aterogeni efekat nego što je to slučaj kod soje, zbog niže vrednosti odnosa lizin/arginin (Ayad, 2010).

Molekulska struktura im je veoma heterogena. Utvrđeno je prisustvo globulina (linina), albumina (konlinina), glutenina i prolamina. Oko 20 % ukupnih proteina sačinjavaju albumini i proteini nižih molekulskih masa, a 80 % čine globulini i proteini viših molekulskih masa. Sadrže i relativno visok nivo aspartamske i glutaminske kiseline i arginina, što ukazuje na visok sadržaj amida. Zanimljivo je da se proteinima lana pripisuju antioksidativna dejstva zbog povišenog sadržaja cisetina i metionina (oko 3,9 % zbirno) za koje se smatra da pospešuju stabilnost DNK tokom deobe ćelija i smanjuju rizik od pojedinih tipova karcinoma debelog creva (Ayad, 2010). Najprisutnija aminokiselina u proteinima lana je glutamin, sa 19,3 % od ukupnog sadržaja proteina, zatim slede arginin (10,8 %), asparagin (10,3 %), leucin (6,6 %), fenilalanin (5,6 %), glicin (5,5 %), serin (5,4%), valin (5,3 %), izoleucin (4,9 %), treonin i alanin (4,6 %), lizin (3,9 %), itd (Sauvant et al., 2000).

2.2.3 Tokoferoli, polifenoli i lignani

Tokoferoli su izuzetno značajni prirodni antioksidansi rastvorljivi u mastima, a u lanu su prisutni u znatnim količinama. Njihova uloga u lanenom semenu je da zaštite polinezasićene masne kiseline ćelijskog zida od oksidacije. Isto tako, oni održavaju selenijum koji štiti tkivo od oksidativnog oštećenja, u redukovanom obliku, povećavajući mu na taj način antioksidativni potencijal. Ukupan sadržaj tokoferola iz devet različitih sorti lana uzgajanih na trinaest lokacija širom sveta iznosio je između 4 i 5 mg/ g ulja, a razlike u sadržaju pripisane su prvenstveno lokalitetu uzgajanja. Najzastupljeniji je γ -

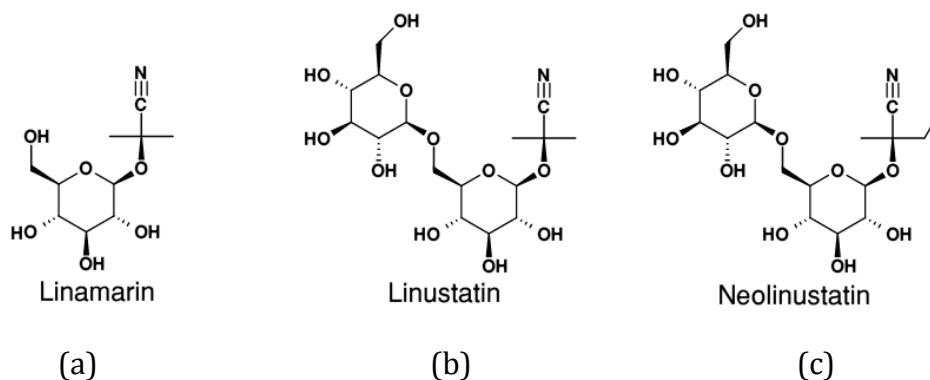
tokoferol koji čini preko 80 % ukupno prisutnih tokoferola. Ljuska semena sadrži oko 26 % tokoferola semena. Odnos α , γ i δ - tokoferola u ljusci semena iznosi 17:61:22, dok je u jezru taj odnos 1:94:5. U novije vreme uvrđeno je prisutvo jedinjenja plastohromanol - 8 (18-26 mg/100 g lanenog ulja), koji poseduje dvostruko veće antioksidativno dejstvo od α - tokoferola (Oomah et Mazza, 2000).

Polifenolne komponente su široko rasprostranjene u biljnom svetu. Laneno seme naročito je bogato trans-ferulinskim (46 %), trans-sinapinskim (36 %), *p*-kumarinskim (7,5 %) i trans-kafeinskim (6,5 %) derivatima fenolne kiseline (Dabrowski and Sosulski, 1984). Ovim jedinjenjima pripisuje se prirodna antioksidativna aktivnost lana (Amarowicz et al., 1994).

Lignani su jedinjenja slična estrogenu, pa se nazivaju i biljnim hormonima. Poznato je da ih ima u mnogim biljkama, ali se lan izdvaja po daleko najvišem sadržaju ovih jedinjenja u čitavoj flori (Kuijsten et al., 2005). Postoje dva osnovna tipa lignana u lanenom semenu koji se uglavnom nalaze u semenjači. U intestinalnom traktu sisara konvertuju se pod dejstvom bakterija u dva tipa lignanskih molekula, enterodiol i enterolakton, koji imaju sposobnost imitacije aktivnosti endogenih hormona (Sicilia et al., 2003).

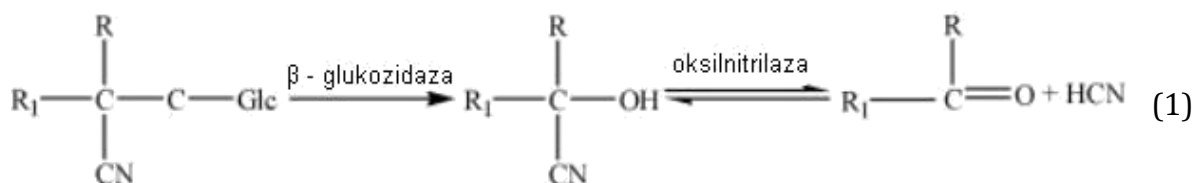
2.2.4 Cijanogeni glikozidi

Cijanogeni glikozidi hemijski se mogu definisati kao α -hidroksinitrili i predstavljaju sekundarne metabolite biljaka. Prekursori cijanogenih glikozida su različite L - amino kiseline (Vetter, 2000). Njihova uloga u biljkama je pre svega zaštita od insekata i drugih životinja, a takođe se smatraju rezervama azota (Ganjewala et al., 2010). Cijanogeni glikozidi u lanenom semenu su linamarin, β - gentiobioza aceton cijanohidrin (linustatin) i β - gentobioza metetil ketoncijanohidrin (neolinustatin), prikazani na Slici 2.3.



Slika 2.3 Hemijska struktura linamarina (a), linustatina (b) i neolinustatina (c)

Pomenuta jedinjenja predstavljaju osnovno ograničenje u primeni lana i lanene sačme u ishrani životinja. Razlog tome leži u njihovoj toksičnosti, usled oslobađanja HCN pod dejstvom enzima β - glukozidaze (oksinitrilaze), prema mehanizmu prikazanom hemijskom jednačinom 1 (Wu *et al.*, 2008).



Dokazano je da je akutno trovanje HCN i njenim solima izazvano direktnom inhibicijom enzima citohrom oksidaze, poslednje oksidaze u respiratornom lancu, što dovodi do nedostatka kiseonika u ćelijama, koji može biti fatalan. Konstantna izloženost cijanidima uzrokuje neuropatije, pankreatični dijabetes i hipotiroidizam, kako kod ljudi, tako i kod životinja. Ova jedinjenja povezuju se sa pojavom nekoliko tipova degeneracija centralnog nervnog sistema (Soto-Blanco *et Górnjak*, 2004).

Prema postojećim podacima, granice tolerancije pojedinih životinja prema unošenju HCN i cijanida (izraženo u mg HCN ekvivalenata/ kg mase jedinke na dan) su sledeće: svinje – 2,9 mg HCN/ kg na dan, živina - 2,8 mg HCN/ kg na dan, preživari – 0,25 mg HCN/ kg na dan, konji – 0,4 mg/ kg na dan (EFSA, 2006). Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje Republike Srbije 4/2010, član 99, propisuje maksimalan dozvoljeni sadržaj

HCN i za laneno seme iznosi 250 mg HCN/ kg semena, dok je za lanenu sačmu i lanenu pogaču granica 350 mg HCN/ kg (*Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje*, 2010). U Evropskoj Uniji, Regulatorna Evropske komisije broj 1334/2008, aneks III direktive 88/388 dozvoljava sledeće maksimalne količine HCN u hrani i piću kojima se dodaju arome, ili komponente aromatičnog karaktera: 1 mg/kg u hrani, 1 mg/kg u piću, sa izuzetkom od 50 mg/kg kod lešnika, marcipana i njima sličnih proizvoda, 35 mg/kg u alkoholnim pićima i 5 mg/kg u konzervisanim koštuničavim plodovima. Podaci o ograničenju sadržaja HCN u lanu kao hrani za životinje u Evropskoj Uniji nisu definisani (*EEC, 2008*).

Danas je poznato nekoliko konvencionalnih metoda za određivanje sadržaja HCN, a posledično i cijanogenih glikozida u hrani i biljnom materijalu. Pregledni rad *Ganjewala* i saradnika iz 2010. godine daje opšti uvid u kvalitativne i kvantitativne metode za određivanje cijanogenih glikozida, od kojih su pomenute samo neke: alkalna ili kisela titracija (*AOAC, 2000*), direktno određivanje cijanida potenciometrijskim biosenzorima (*Keusgen et al., 2004*), tečna hromatografija kombinovana sa tandem masenom spektrometrijom (*Franks et al., 2005*), gasno-hromatografska analiza (*Bacala and Barthelet, 2007*), denzitometrijska metoda (*Brimer and Molgaard, 1986*), metoda sa kitovima pikratnog papira i direktno odrađivanje sa pikratnim papirom (*AOAC, 2000; Hidayat et al., 2000*), itd.

Da bi se laneno seme pre upotrebe detoksifovalo i smanjila količina oslobođenja HCN u organizmu, najčešće se primenjuju toplotni tretmani kao što su autoklaviranje, peletiranje, ekstrudiranje ili mikrotalasno pečenje (*Feng et al., 2003; Wu et al., 2008*). Cijanogeni glikozidi i β -glukozidaza su u neoštećenom semenu razdvojeni, usled čega ne dolazi do prirodnog oslobađanja HCN iz semena lana. Tek nakon žvakanja i varenja u organizmu životinje ili čoveka enzimski reakcija postaje moguća, usled narušavanja strukture semena i kontakta između supstrata i enzima. Zbog toga se lan obavezno podvrgava različitim tretmanima, kako bi se lako isparljiva HCN oslobodila pre unošenja u živ organizam, ali i sprečila dalja hidroliza zaostalnih cijanogenih glikozida deaktivacijom glukozidaze (*Feng et al., 2003*).

Prema nekim istraživanjima, suvo zagrevanje lanenog semena se ne preporučuje, pošto se detoksifikacija zasniva isključivo na deaktivaciji glukozidaze. Ovim postupkom se sadržaj oslobođene HCN nedovoljno snižava, jer i pored deaktivacije biljnog enzima,

može doći do nakadnog formiranja kiseline pod dejstvom enzima crevne mikroflore na zaostale cijanogene glikozide. Peletiranje lanenog semena takođe se smatra neadekvatnim, jer se ne postižu dovoljno visoke temperature u procesu, zbog velikog sadržaja ulja u materijalu, što smanjuje frikciju i trenje u uređaju. Da bi se pomenute poteškoće prevazišle, preporučuje se prethodno kondicioniranje materijala. Povišena temperatura i vlaga polazne sirovine podstiču i ubrzavaju reakciju hidrolize, rezultujući intenzivnijim uklanjanjem HCN (*Feng et al., 2003*).

Autoklaviranje pokazalo je daleko bolje rezultate, jer se visoke temperature primenjuju u prisustvu pare. Povišeni pritisak koji se uspostavlja u autoklavu razara cijanogene glikozide, što značajno pospešuje redukciju HCN. Dakle, tokom autoklaviranja se ne odvija samo inaktivacija enzima, već i razaranje supstrata neophodnog za reakciju hidrolize. Mikrotalasno zagrevanje takođe je dalo dobre rezultate, zbog visokih temperatura koje se postižu za veoma kratko vreme. Formirana HCN trenutno isparava, što ubrzava reakciju hidrolize usled smanjenja koncentracije nastalog proizvoda. Interakcija mikrotalasa i tretiranog materijala uzrokuje reorganizaciju nosilaca naelektrisanja u molekulima, što indukuje intenzivno formiranje HCN. Nakon određenog vremena, i sam enzim se deaktivira, čime se onemogućava dalja hidroliza već drastično redukovane količine prisutnih cijanogenih glikozida (*Feng et al., 2003; Ivanov et al., 2012c*).

Ekstrudiranje lanenog semena smatra se pogodnim za uklanjanje HCN iz materijala, jer se u postupku kombinuje nekoliko različitih uticaja: usitnjavanje, mešanje, zagrevanje pod visokim pritiskom u prisustvu vlage, frikcija i smicanje. Usitnjavanje materijala uz istovremeno zagrevanje u prisustvu vlage ubrzava proces hidrolize i formiranje HCN. Nakon opadanja radnog pritiska po izlasku materijala iz cevi ekstrudera, nastala kiselina naglo isparava zajedno sa vodom. Istovremeno, visoki pritisak u cevi ekstrudera razara molekule cijanogenih glikozida onemogućavajući na taj način oslobađanje HCN (*Wu et al., 2008*).

2.2.5 Mucilage – biljna sluz, tripsin-inhibitori i linatin

Semenjača lana pretežno je izgrađena od neskrbnog polisaharida koji se naziva *mucilage*, ili biljna sluz. To je glutenski ugljeni hidrat, rastvorljiv u vodi, koji predstavlja smešu neutralnih arabinoksilana i kiselih polisaharida na bazi ramnoze (Ziolkowska, 2012). Odnos ove dve frakcije zavisi od porekla lana i kreće se u širokom opsegu. Utvrđeno je da je osnovni polisaharid *mucliage* lanenog semena (oko 75 %) neutralni polimer molekulske mase oko $1,2 \times 10^6$ g/mol, dok su preostale dve frakcije supstance slične pektinskim, izgrađene od uronske kiseline, galaktoze i ramnoze (Warr et al., 2003). Na osnovu hemijskog sastava biljne sluzi može se reći da je u pitanju hidrokolid, koji pokazuje čitav niz prednosti kada se u prehrambenoj industriji kombinuje sa drugim hidrokolidima. Prema nekim literaturnim podacima čak poseduje blagotvorno dejstvo u sprečavanju pojave dijabetesa, konorarnih oboljenja i pojedinih tipova karcinoma, naročito karcinoma debelog creva i rektuma (Jenkins et al., 1999; Oomah, 2001). Ipak, upotreba biljne sluzi i dalje nije široko rasprostranjena, zbog ograničenih podataka o njenim strukturnim i funkcionalnim osobinama (Ziolkowska, 2012).

Kada se posmatra ishrana životinja, visok sadržaj biljne sluzi u hrani za brojere redukuje dostupnost nutrijenata usled povećavanja viskoziteta u gastro-intestinalnom traktu, što dovodi do opadanja telesne mase životinje i redukcije u prinosu (Alzueta et al., 2003). Sa druge strane, ispituje se eventualno dejstvo biljne sluzi kao prebiotika u ishrani svinja, jer je u nekoliko istraživanja utvrđeno da hrana bazirana na lanenom semenu povećava populaciju laktobacila u crevima monogastričnih životinja, čime se pospešuje njihovo varenje (Bhatty, 1993).

Tripsin inhibitori su antinutritivne komponente lana, koje sa tripsinom formiraju nesvarljivi kompleks i na taj način onemogućavaju njegovu aktivnost, smanjujući mu koncentraciju u tankom crevu. Da bi kompezovao nedostatak enzima, pankreas životinje luči veću količinu tripsina, što dovodi do povećane potražnje za proteinima u hrani (Green et al., 1972). Kako je pokazano u radu Bhatty-ja iz 1993. godine, aktivnost tripsin inhibitora u lanu je daleko niža nego u drugim hranivima koja ga sadrže, tako da se eventualni negativni efekti na rast životinja usled ishrane lanom nikako ne mogu pripisati ovom jedinjenju.

Linatin se naziva još i antivitamin B6, a predstavlja dipeptid serina i glutamina. Negativan efekat linatina javlja se u ishrani brojlera. Poznato je da se i kod mladih svinja pri upotrebi lanene sačme mogu javiti simptomi nedostatka vitamina B6 u vidu gubitka apetita, anemije, loših performansi i nervnih poremećaja. Kod odraslih svinja smetnje su primećene tek pri sadržaju lana u hrani većem od 30%. S obzirom da su količine koje se upotrebljavaju uvek daleko manje, prisustvo antivitamina B6 se može zanemariti. Problem se lako može prevazići i dodavanjem veće količine vitamina B6 u hranu (Ayad, 2010; Wu et al., 2008; Eastwood, 2008).

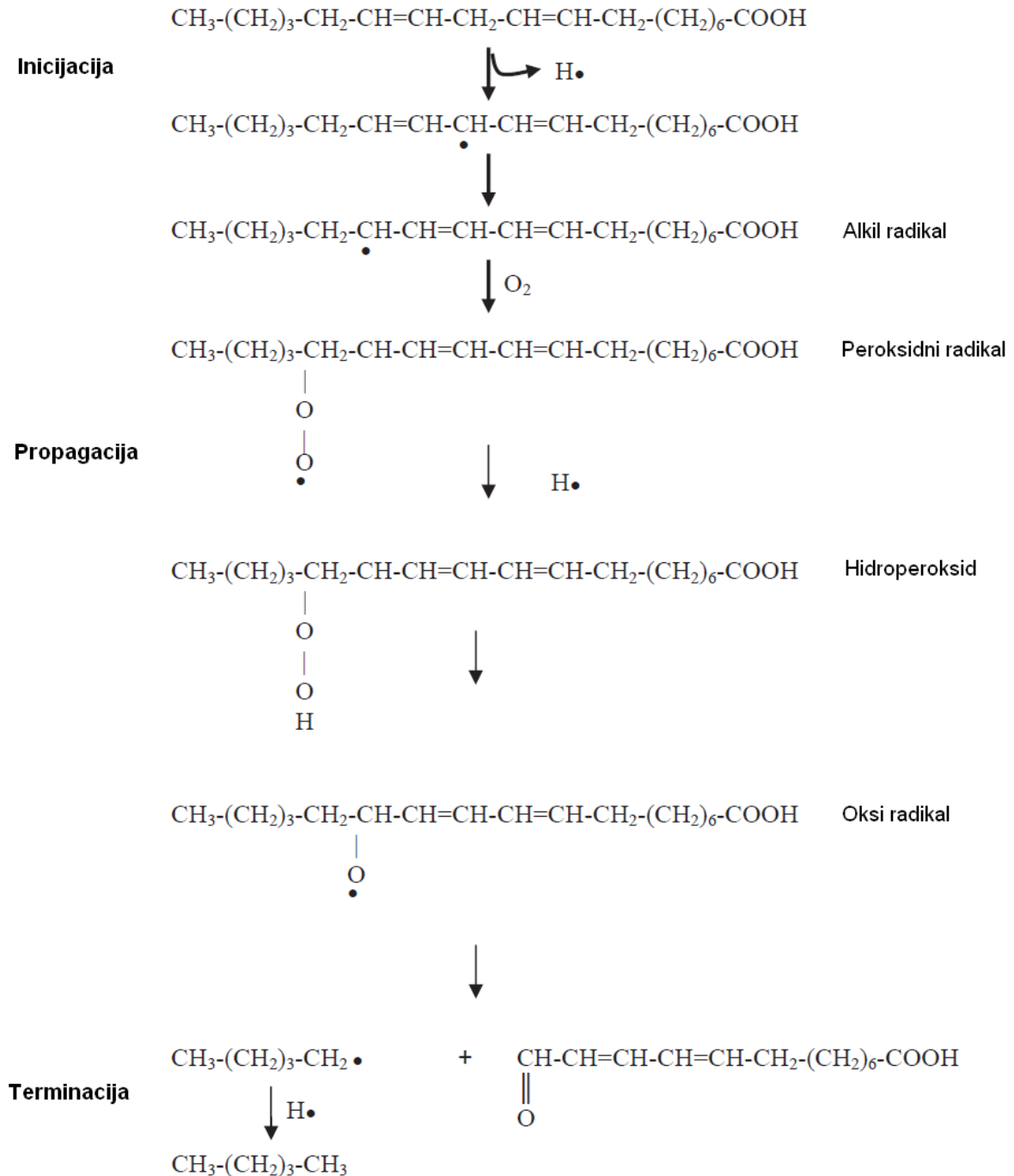
2.3 Problem oksidacije tokom skladištenja hraniva bogatog mastima

Značaj masti u ishrani životinja je izuzetno veliki. Ova jedinjenja imaju različite uloge, ali su prevashodno neophodna kao energetske rezerve, jer daju oko 2,25 puta više energije nego skrob. U životinjskom organizmu, lipidi osim kao tipična energetska jedinjenja, služe kao strukturni materijal koji čini deo građe tkiva, naročito nervnog sistema, zatim za snabdevanje organizma esencijalnim masnim kiselinama, a ne sme se izostaviti ni funkcija nosioca liposolubilnih vitamina (Milosavljević, 1978).

Problem koji se vrlo često javlja prilikom skladištenja hraniva bogatog mastima jeste oksidacija lipida, naročito ukoliko se radi o hranivu bogatom nezasićenim masnim kiselinama. Nezasićene masne kiseline predstavljaju najpogodniji medijum za oksidaciju u hrani. Osim pogoršanja nutritivnog kvaliteta i senzornih karakteristika hrane, lipidna oksidacija (ili autooksidacija) uzrokuje stvaranje visokoreaktivnih produkata, koji imaju negativan uticaj na zdravlje i razvoj životinja koje ih konzumiraju (Laguerre et al., 2007).

Oksidacija lipida je lančana reakcija koja se odigrava u tri faze, postepenim delovanjem kiseonika na masti i ulja. U prvoj, inicijalnoj fazi, dolazi do formiranja alkilnog slobodnog radikala iz nezasićene masne kiseline, uklanjanjem vodonika. Potom, kiseonik iz vazduha reaguje sa alkil radikalom, pri čemu se formira peroksidni radikal. Peroksidni radikali imaju sposobnost da reaguju sa vodonikom iz drugih jedinjenja, stvarajući pri tome hidroperokside, koji se potom ponovo raspadaju na peroksidne radikale (Halliwell et Gutteridge, 2007). Ova faza reakcije naziva se faza propagacije.

Poslednja faza autooksidacije lipida, terminacija, podrazumeva povezivanje dva slobodna radikala, koji potom formiraju ne-radikalno jedinjenje. Celokupna reakcija prikazana je na Slici 2.4.



Slika 2.4 Mehanizam lipidne oksidacije (*Smith et al, 2007*)

Lipidna oksidacija može se sprečiti, ili barem usporiti dodatkom jedinjenja poznatih pod nazivom antioksidansi. Ove supstance imaju sposobnost da suzbiju dejstvo slobodnih radikala i spreče njihovu negativnu oksidativnu aktivnost reagujući sa njima, čime se onemogućavaju aktivacija kiseonika i lančane oksidativne reakcije sa konstituentima ćelija živog organizma, ili komponentama hrane. Da bi bili pogodni za upotrebu, moraju biti lako dostupni, stabilni i selektivni, reagujući samo sa slobodnim radikalima. Mnogobrojne studije pokazale su da su egzogeni antioksidansi, naročito oni uneti putem hrane, esencijalni za suprotstavljanje organizmu oksidativnom stresu (Laguerre et al., 2007).

Dejstvo antioksidanasa ispoljava se na dva načina. Prvi podrazumeva zaštitu lipida od inicijatora oksidativnih reakcija, a drugi usporavanje faze propagacije. U prvom slučaju, antioksidansi sprečavaju nastajanje reaktivnih oksidativnih formacija ($O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , itd.), ili ih vezuju za sebe, onemogućavajući početak lipidne oksidacije. U drugom slučaju, antioksidansi prekidaju lančanu reakciju u fazi propagacije, ili je indirektno zaustavljaju. Treba imati na umu da se ovi mehanizmi u prirodi prepliću i da nije moguće jasno napraviti granice između načina delovanja antioksidanasa (Laguerre et al., 2007).

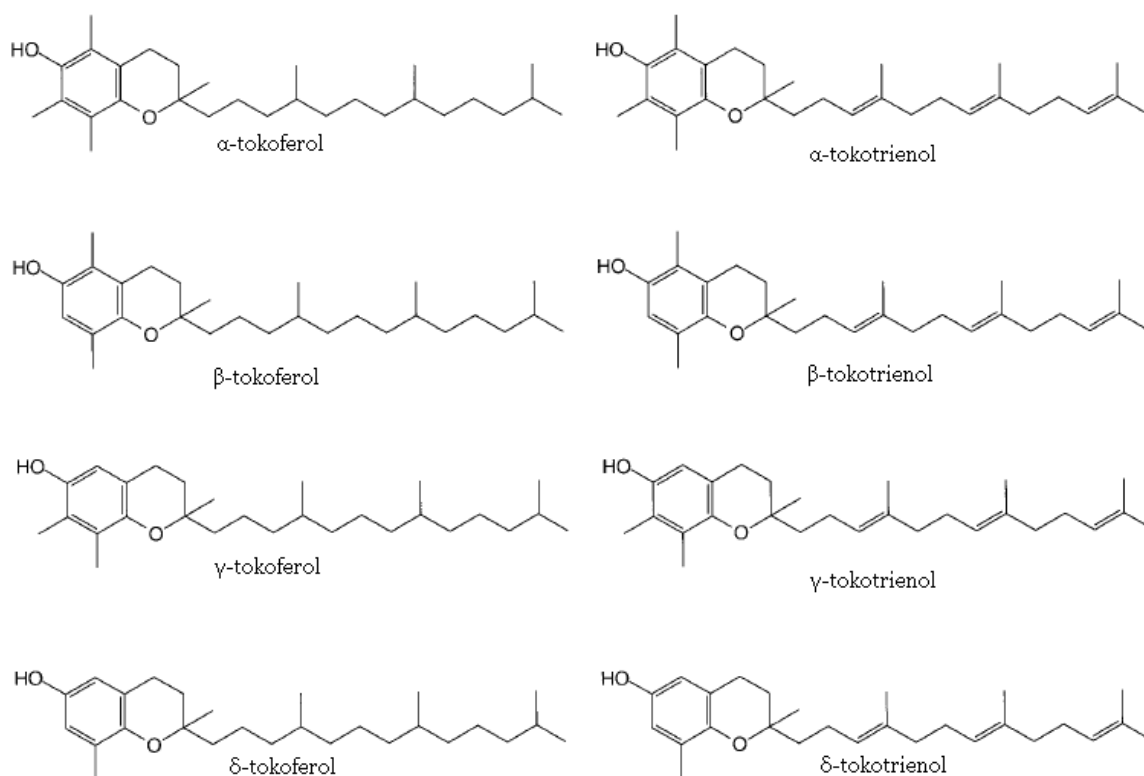
Prema poreklu nastanka, antioksidansi se mogu podeliti na sintetičke i prirodne. Od sintetičkih antioksidanasa, najčešće se upotrebljavaju butil-hidroksianisol (BHA), butil-hidroksitoluen (BHT), propil-galat (PG), terc-butil-hidrohinon (TBHQ) i vitamin E (α -tokoferol). Sa upotrebom ovih jedinjenja treba biti oprezan, jer pojedina istraživanja pokazuju da BHA i BHT mogu biti toksični (Sherwin, 1990; Wanasundara et al., 1998). Stoga se sve češće pribegava upotrebi prirodnih antioksidanasa, uglavnom biljnog porekla.

Delovi biljaka, ili njihovi proizvodi koristili su se od davnina u ishrani ljudi i životinja radi poboljšanja arome hrane, kao i u medicinske svrhe u cilju prevencije, ili lečenja od različitih oboljenja. Poznato je da su još stari Grci i Rimljani upotrebljavali terpentini, dok je u Egiptu, Indoneziji i Persiji pre više od dve hiljade godina bila razvijena destilacija, kao metoda proizvodnje eteričnih ulja (Negi, 2012; Burt, 2004). Poslednjih godina brojna istraživanja bave se izolacijom bioaktivnih supstanci iz biljaka, za koje je poznato da imaju antioksidativno, antimikrobno, ili neko drugo blagotvorno dejstvo. Najčešće se primenjuju postupci ekstrakcije, destilacije i nešto ređe fermentacije (Burt, 2004). Bilo da su u pitanju biljni ekstrakti, esencijalna ulja, ili organske kiseline,

ovakvi prirodni proizvodi predstavljaju dobru alternativu veštačkim preparatima i pronalaze sve širu primenu u procesu proizvodnje hrane za životinje, pre svega radi povećanja bezbednosti hrane.

2.3.1 Antioksidativno dejstvo vitamina E

Vitamin E je zajedničko ima za grupu liposolubilnih jedinjenja, a prisutan je u gotovo svim hranivima biljnog porekla. Sačinjavaju ga tokoferoli i tokotrienoli, a detaljne analize vitamina E utvrdile su da njegova aktivnost potiče od četiri tokoferola (α , β , γ i δ) i četiri tokotrienola (takođe α , β , γ i δ), prikazanih na Slici 2.5.

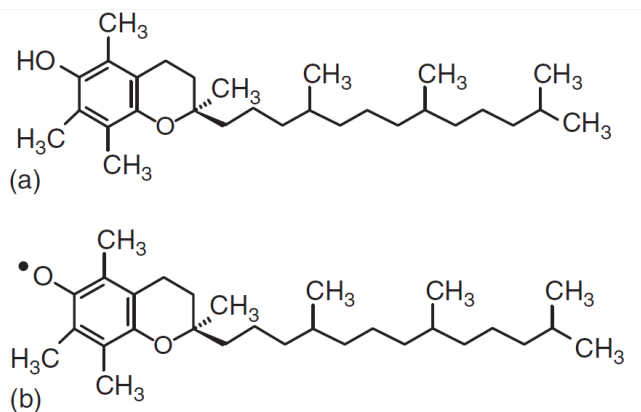


Slika 2.5 Prirodne forme izomera tokoferola i tokotrienola (*Brigelius-Flohe, 1999*)

α -tokoferol je u prirodi daleko najčešći od pomenutih jedinjenja i poseduje najveću biološku aktivnost (*Brigelius-Flohe, 1999*). Najznačajnija, a prema nekim naučnicima i jedina funkcija vitamina E, jeste sprečavanje i usporavanje oksidacije

lipida, što je naročito bitno kada se govori o bioaktivnim lipidima, ili hrani (Traber et Atkinson, 2007).

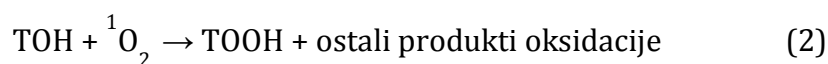
Zbog svoje hemijske strukture, tokoferoli su u stanju da doniraju jedan vodonikov atom iz hidroksilne grupe na šestom ugljenikovom atomu prstena peroksidnim radikalima. Ovom reakcijom, umesto reaktivnih hidroperoksida i oksidativnih radikala, nastaju tokoferil radikali (Slika 2.6), koji su stabilniji i manje reaktivni, zbog rezonantne strukture (Choe et Min, 2006). Tokoferil slobodni radikali mogu da reaguju sa slobodnim peroksidnim radikalima u fazi terminacije, što praktično znači da bi mogli sprečiti reakciju dva slobodna peroksidna radikala sa nezasićenim masnim kiselinama (Oral et al., 2006). Na taj način, tokoferoli utiču na oksidativnu stabilnost lipida, što je dokazano u eksperimentima sa različitim uljima biljnog i životinjskog porekla (Jung et Min, 1990; Wagner et Elmadfa, 2000; Kulås et Ackman, 2001).



Slika 2.6 α -tokoferol i α -tokoferil slobodni radikal (Oral et al., 2006)

Dobro je poznato antioksidativno dejstvo α -tokoferola u suncokretovom ulju (Marinova et al., 2008; Rižner et al., 2000; Carelli et al., 2005) sojinom (Steel et al., 2005), lanenom (Wagner et Elmadfa, 2000), ili maslinovom ulju (Nissiotis et Tasioula-Margari, 2002). Zuta i saradnici su u svojim ispitivanjima o uticaju α -tokoferola na ulje skuše došli do zaključaka da je ovo jedinjenje pri nižim koncentracijama (50 i 100 mg/ kg) efikasno antioksidativno sredstvo i da sprečava autooksidaciju skušnog ulja, dok mu je u većim koncentracijama (>250 mg/ kg) aktivnost daleko niža (Zuta et al., 2007).

Antioksidativna aktivnost tokoferola nije ograničena samo na reakcije sa slobodnim radikalima. Nekoliko studija pokazuje da su ova jedinjenja u stanju da „ugase“ singletni kiseonik $^1\text{O}_2$, koji je takođe uzročnik lipidne oksidacije (Warner, 2005). Tokoferoli uklanjaju $^1\text{O}_2$ fizičkim ili hemijskim procesima. Fizički proces podrazumeva deaktivaciju putem mehanizma razmene naelektrisanja (Kaiser et al., 1990), dok hemijska deaktivacija predstavlja reakciju između tokoferola i $^1\text{O}_2$, pri čemu nastaju oksidacioni produkti tokoferola (jednačina 2).



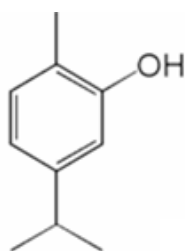
Udeo fizičke deaktivacije $^1\text{O}_2$ višestruko je veći od udela hemijske deaktivacije, koja iznosi svega 0,1 do 1,5% fizičke deaktivacije (Di Mascio et al., 1990; Kaiser et al., 1990).

Vitamin E je relativno otporan na toplotu i prema kiselinama, a neotporan je prema alkalijama, ultraljubičastoj svetlosti i kiseoniku. U anaerobnim uslovima se ne razlaže ni pri zagrevanju do 200 °C. Nedostatak vitamina E u hrani za životinje manifestuje se na različite načine. Avitaminoze se najčešće javljaju kod svinja i živine, a ispoljavaju se u vidu nekroze jetre, gubitka dlake, odnosno perja, degeneracije embriona, smanjene nosivosti, itd. Encefalomalacija, ili takozvana bolest „ludih pilića“ je, na primer, posledica nedostatka vitamina E u hrani za životinje. Dodatkom sintetičkog vitamina E, pojava ove bolesti se uspešno sprečava (Kolarski, 1995).

2.3.2 Karvakrol kao biološki aktivno jedinjenje

Kao što je već rečeno, upotreba prirodnih antioksidanasa u hrani za ljude i životinje danas se izuzetno favorizuje, zbog nepostojanja negativnih sporednih efekata. Koliko će neko jedinjenje biti adekvatan antioksidans, u mnogome zavisi od lipidnog substrata na koji se primenjuje. Pozicioni izomeri takođe vrlo često pokazuju različito antioksidativno dejstvo (Marinova et Yanishlieva, 1996; Marinova et Yanishlieva, 1998).

Karvakrol je jedna od osnovnih komponenti ulja oregana sa dokazanim antioksidativnim, antibakterijskim, antifungalnim i insekticidalnim dejstvom (Burt, 2004; Chami et al., 2005; Panella et al., 2005; Tampieri et al., 2005; Liolios et al., 2009). Takođe ga ima u timijanu, majoranu, mirođiji, kimu, ruzmarinu i crnom biberu (Suhaj et al., 2006). Hemijsko ime karvakrola je 2-metil-5-(1-metiletil) fenol (C₁₀H₁₄O) i spada u grupu fenolnih jedinjenja sa jednom hidroksilnom grupom na prstenu (Slika 2.7) (Bakkali et al., 2008).



Slika 2.7 Hemijska struktura karvakrola (Bakkali et al., 2008)

Mnogobrojne studije bavile su se ispitivanjem antioksidativnog dejstva karvakrola, a prikazani su zanimljivi rezultati. Prema navodima pojedinih autora, izražena antioksidativna aktivnost raznih esencijalnih ulja potiče upravo od prisutnih fenola - karvakrola i timola (Baratta et al., 1998; Lagouri et al., 1993). Druga grupa naučnika dokazala je da je karvakrol efikasan u sprečavanju autooksidacije sala pri koncentraciji od 0,1% i temperaturi od 35°C (Lagouri et al., 1993). Tepe i saranici u svojim ispitivanjima takođe zaključuju da snažna antioksidativna aktivnost timijana potiče od prisutnih karvakrola i timola, a slične zaključke iznose i Kulišić i saradnici u ispitivanjima oregano ulja (Tepe et al., 2005; Kulišić et al., 2004). Lagouri i saradnici su ispitivali uticaj esencijalnih ulja divljeg oregana iz Grčke na usporavanje oksidacije sala koje je skladišteno pri temperturi od 35°C. Antioksidativno dejstvo esencijalnih ulja ponovo je pripisano timolu i karvakrolu (Lagouri et al., 1993).

Međutim, Marinova i Yanishlieva su 1992. godine izvele eksperiment sa dodatkom karvakrola u suncokretovo ulje i prečišćene trigliceride sala, u koncentracijama od 0,02 do 0,2 % i na temperaturi od 100 °C. Utvrdile su da je antioksidativno dejstvo karvakrola u ovom slučaju, bilo relativno nisko. Isti autori su u eksperimentima iz 1999. godine utvrdili da karvakrol pokazuje slabija antioksidativna dejstva od timola u

supstratima kao što su suncokretovo ulje i salo, pri temperaturi od 22°C. *Aeschbach* i saradnici su 1994. godine ustanovili da karvakrol inhibira nastajanje peroksida lipozomnih fosfolipida, ali da njegova aktivnost zavisi od primenjene koncentracije (*Aeschbach et al.*, 1994).

Pored antioksidativnog, dobro je poznato i antimikrobno dejstvo karvakrola. Tačan mehanizam delovanja ovog jedinjenja na mikroorganizme još uvek nije poznat, ali većina naučnih studija ukazuje na to da je njegova aktivnost zasnovana na razaranju ćelijskih membrana mikroorganizama. Dokazano je da karvakrol razgrađuje spoljašnje membrane gram negativnih bakterija, oslobađajući lipopolisaharide i povećavajući propustljivost citoplazmatske membrane na ATP (adenozin trifosfat) (*Helander et al.*, 1998; *Inamuco*, 2012). Zahvaljujući odgovarajućoj hidrofobnosti, karvakrol se akumulira u ćelijskim membranama, a slobodna hidroksilna grupa na fenolnom prstenu omogućava mu da razmenjuje protone sa membranom, narušavajući joj strukturu i izazivajući odumiranje ćelija (*Arfa et al.*, 2006). Studije sa *B. Cereus* takođe su pokazale da karvakrol rastvara dvoslojnu fosfolipidnu ćelijsku membranu, uklapajući se između lanaca masnih kiselina (*Ultee et al.*, 2002). Pored smanjene koncentracije ATP molekula, uočeno je i smanjenje koncentracije jona kalijuma unutar ćelije, što sve ukazuje na to da karvakrol formira kanale kroz ćelijsku membranu, odvajajući masnokiselinske lance od fosfolipida (*Ultee et al.*, 2002).

Još jedna značajna karakteristika karvakrola je inhibicija produkcije toksina od strane mikroorganizama. Karvakrol je sposoban da spreči nastajanje diareala, toksina koji luči *B. Cereus* (*Ultee et Smid*, 2001). Postoje dva tumačenja inhibicije nastajanja toksina. Prema prvom, toksin koji nastaje u bakteriji ne može da se izluči u spoljašnjost zbog nedostatka ATP molekula unutar ćelije. Drugo tumačenje kaže da bakterija sa oštećenim ćelijskim zidom troši svu energiju na održavanje životnih funkcija, zbog čega prestaje da luči toksine (*Ultee et Smid*, 2001).

U protekloj deceniji, primena aromatičnih biljaka, esencijalnih ulja i biljnih ekstrakata postala je naročito interesantna u ishrani životinja, prvobitno jer je utvrđeno da ovi preparati mogu efikasno zameniti antibiotike i promotore rasta, a potom i zbog drugih pozitivnih efekata (*Vieira et al.*, 2008). Preparati se uglavnom koriste u uzgoju sisara i preživara, ali je od skoro počela upotreba i u ishrani riba (*Giannenas et al.*, 2012). Kada je reč o akvakulturama, potencijal fitogenih aditiva ne ogleda se samo u zameni

antibiotika kao promotora rasta, već se može proširiti i na druge značajne oblasti, kao što su kontrola bolesti, otpornost riba, ili poboljšanje kvaliteta i oksidativne stabilnosti ribljih filea tokom skladištenja (*Jian et Wu, 2003; Gatlin III et Bai, 1992*).

Upotreba karvakrola kao dodatka hrani za životinje ispitana je u mnogim ogledima i na različitim životinjama. Dokazano je da karvakrol uspešno redukuje broj laktobacila u gastro-intestinalnom traktu svinja i na taj način održava mikrofloru crevnog trakta na optimalnom nivou, što kod svinja često predstavlja problem (*Michiels et al., 2007*). U ishrani brojlera, dodatak biljnih ekstrakata na bazi karvakrola povećava prinos, kroz smanjeni unos hrane uz istovremeno povećanje telesne mase životinja (*Mountzouris et al., 2011*). *Michiels* i saradnici uočili su da je dužina crevnih resica u tankom crevu brojlera hranjenih smešom sa dodatkom karvakrola veća i da se ukupna absorpcija u tankom crevu povećava za više od 90 % (*Michiels et al., 2010*).

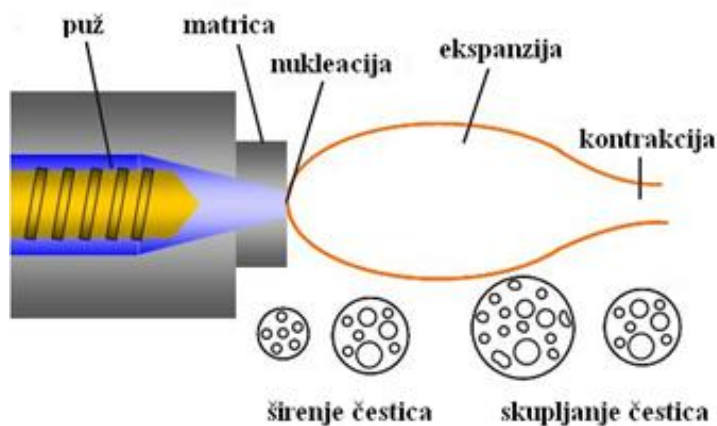
Kada je reč o ishrani preživara, literaturni podaci ukazuju na to da karvakrol ima vrlo skroman uticaj na rast i prinos jagnjadi (*Chaves et al., 2008*). Takođe, utvrđeno je da ne poseduje značajno antimikrobno dejstvo na njihovu crevnu mikrofloru (*Bampidis et al., 2005*). Upotreba karvakrola u ishrani bikova nije pokazala evidentan uticaj na količinu nastalih isparljivih masnih kiselina, kao krajnjih produkata mikrobiološke fermentacije u buragu. Ovo ukazuje na to karvakrol ne utiče na promene u fermentativnim procesima kod prežvara, pa samim tim ni na ukupnu količinu energije koja se oslobađa putem unete hrane (*Busquet et al., 2005*).

S druge strane, primena karvakrola u ishrani pastrmki dala je zadovoljavajuće rezultate pri koncentraciji od 1 g/kg hrane za ribe. U ovom slučaju, rezultati su bili vidljivi ne samo kroz poboljšane proizvodne performanse, već i kroz antioksidativno dejstvo karvakrola i pozitivan uticaj na urođeni imunitet pastrmki (*Giannenas et al., 2012*).

U iscrpnim *in vivo* istraživanjima uticaja esencijalnog ulja timijana na laboratorijske pacove, sa akcentom na karvakrol, *Akkol* i saradnici dokazali su da ovo jedinjenje poseduje ne samo antioksidativno dejstvo, već i da snižava nivo holesterola u krvi i štiti jetru od degenerativnih promena (*Akkol et al., 2009*).

2.4 Proces ekstrudiranja i njegova primena u tehnologiji hrane za životinje

Tehnologija ekstrudiranja prisutna je u različitim granama industrije već dugi niz godina. Sama reč „ekstrudiranje“ znači oblikovanje mekih i plastičnih materijala pomoću puža, koji potiskuje masu da „teče“ kroz otvore, ili matrice. Pri tome se mogu menjati jedan, ili više parametara procesa u različitim fazama obrade materijala, što rezultuje različitim karakteristikama dobijenog proizvoda (Riaz, 2000; Guerrero *et al.*, 2012). Termička obrada tretiranog materijala odvija se u cevi ekstrudera u kojoj se nalaze jedan, ili dva puža (Mościcki *et al.*, 2011). Temperature unutar ekstrudera mogu da iznose preko 100 °C, ali visok pritisak koji vlada u cevi onemogućava isparavanje vode iz vlažne prehrambene sirovine. Potiskivanjem kroz specifični otvor i izlaskom iz polja visokog pritiska, voda iz mase naglo isparava, usled čega dolazi do širenja tretiranog materijala u manjoj, ili većoj meri. U nastavku procesa, on se dalje hladi, očvršćava i skuplja, kako je prikazano na Slici 2.8 (Riaz, 2007).



Slika 2.8 Ekspanzija i naknadno očvršćavanje čestica

Proces ekstrudiranja prvi put se spominje 1797. godine u Engleskoj, kada ga je *Joseph Braham* primenio za proizvodnju sapuna, pasti i mase za crep, upotrebom ručne pištolj-prese (Riaz, 2000). Ubrzo nakon što se upotreba jednopužnog ekstrudera raširila u proizvodnji plastičnih masa, krenula je i primena u proizvodnji hrane. Prvi dvopužni ekstruder razvijen je sredinom tridesetih godina dvadesetog veka i bio je namenjen prehrambenoj industriji (Mościcki *et al.*, 2011). Savremeni dizajn ovih uređaja je

naglo povećao stepen njihove zastupljenosti u proizvodnji hrane za ljude i životinje. Danas se koriste za kuvanje, oblikovanje, mešanje i teksturiranje, pod uslovima koji obezbeđuju visok kvalitet i produktivnost, a smanjuju troškove proizvodnje (Riaz, 2000). Jednostavan i jeftin mašinski ekstruder prvobitno je razvijen u SAD šesdesetih godina dvadesetog veka, a primenjivan je na farmama za kuvanje sojinog zrna i hrane za životinje dobijene od cerealijskih. Glavni razlog za obradu sojinog semena bila je termička inaktivacija tripsin-inhibitora (inhibitor rasta). Samo deceniju kasnije, dizajnirani su ekstruderi za upotrebu u prehrambenoj industriji, koji se danas koriste i u slabije razvijenim zemljama.

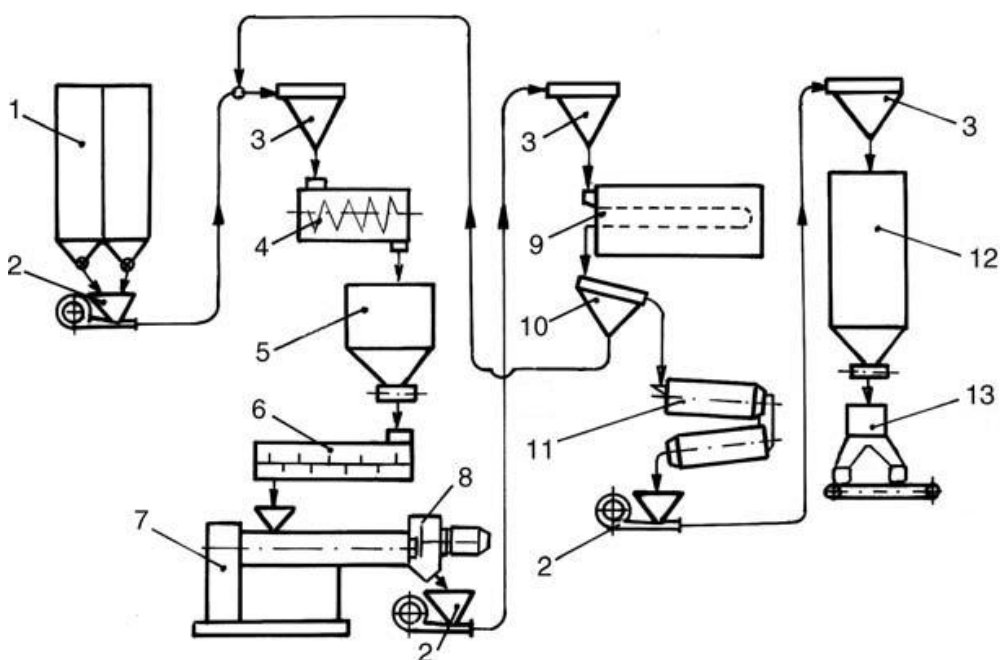
Podela ekstrudera može se izvršiti na osnovu tri kriterijuma (Mościcki et al., 2011).

- 1) Prema načinu oslobađanja toplote tokom obrade materijala, ekstruderi se dele na:
 - Autogene – izvor toplote je frikcija čestica materijala izazvana obrtanjem puža pri velikim brzinama
 - Izotermičke – spoljašnji izvor toplote
 - Politropske – izvor toplote je kombinovan
- 2) Prema količini mehaničke energije koja se generiše, ekstruderi se dele na:
 - Niskopritisne ekstrudere kod kojih su sile smicanja relativno ograničene i niske
 - Visokopritisne ekstrudere kod kojih se javljaju izuzetno jake sile smicanja i oslobađa se velika količina mehaničke energije.
- 3) Prema konstrukciji cevi ekstrudera i puža, ekstruderi se dele na:
 - Uniformne sa integrisanim telom
 - Sa povezanim odvojenim segmentima.

Principijelna prednost ekstrudiranja nad tradicionalnim metodama proizvodnje hrane za životinje ogleda se prvenstveno u znatno široj primenljivosti na različite sirovine (Riaz, 2000). Minimalne promene u sastojcima i uslovima rada uređaja, značajno utiču na rezultujuće karakteristike proizvoda (Van Zuilichem, 1992). Veoma jednostavno se mogu dobiti različiti oblici i forme, što se ovoliko lakoćom ne postiže ni u jednoj drugoj tehnologiji (Karwe, 2003). Ekstruderi rade pri relativno niskom sadržaju vlage, čime se štedi energija potrebna za sušenje proizvoda. Prostor potreban za

obavljanje svih operacija je znatno manji, nego kod tradicionalnih sistema za termičku obradu. Takođe su manji i troškovi eksploatacije uređaja. Ušteda u sirovom materijalu iznosi oko 19 %, radnoj snazi 14 %, a kapitalnim investicijama 44 %. S obzirom da je ekstrudiranje kratkotrajan tretman visokom temperaturom (HTST – High Temperature-Short Time), degradacija nutrijenata svedena je na minimum, a delimičnom denaturacijom proteina i želatinizacijom skroba povećava se svarljivost hrane. Veoma je važno spomenuti i da su nusprodukti i gubici tokom procesa gotovo zanemarljivi, što je, posmatrano sa strane zaštite životne sredine i regulacije prerade otpadnih materija, naročito bitno. Rezultati koji se dobijaju u laboratorijskim uslovima i pilot postrojenjima reproduktibilni su na industrijske uslove proizvodnje, čime je proces ugradnje i pokretanja u fabrikama pojednostavljen (Riaz, 2000; Riaz, 2007).

Uobičajeni postupak proizvodnje ekstrudirane hrane prikazan je na Slici 2.9.

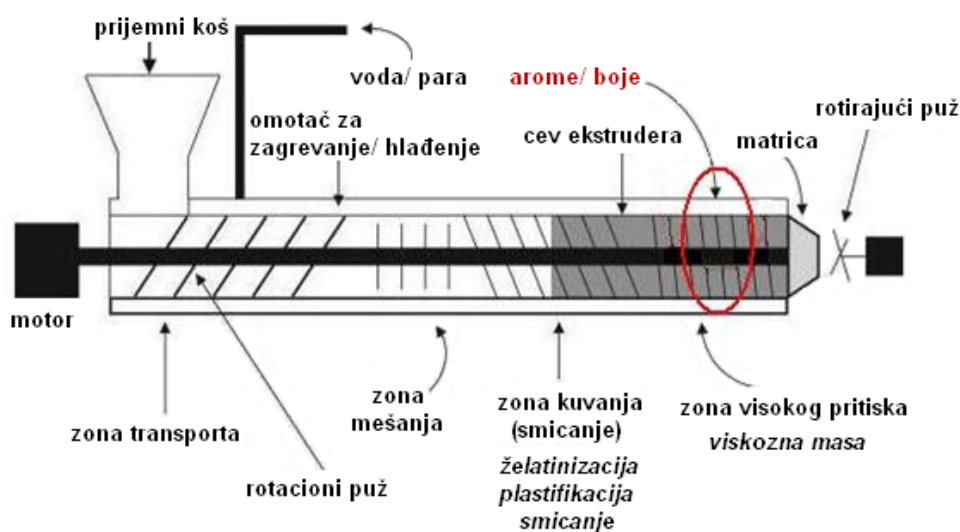


- 1 - silosi, 2 - pneumatski konvejer, 3 - usipni koš, 4 - mešalica, 5 - vaga za sirovine, 6 - kondicioner, 7 - ekstruder, 8 - nožev, 9 - sušnica, 10 - sito, 11 - vakuum kouter, 12 - silos za gotov proizvod, 13 - pakericica

Slika 2.9 Tehnološki dijagram procesa proizvodnje ekstrudirane hrane (Mościcki et Zuilichem, 2011)

2.4.1 Jednopusni ekstruderi

Kao što je ranije već spomenuto, jednopusni ekstruderi su relativno jednostavne konstrukcije, prikazane na slici 2.10. Vrlo su rasprostranjeni u prehrambenoj industriji sa oko 70 % zastupljenosti (Karwe, 2003). Ovi uređaji mešaju, kuvaju, kompresuju, gnječe, „tope“ i plasticiziraju obrađivani materijal, da bi ga na kraju cevi prisilili da pod pritiskom izlazi u spoljašnju sredinu, kroz male otvore na matrici ekstrudera (Mościcki et Zuilichem, 2011). Matrice ekstrudera konstruisane su tako da daju željeni oblik obrađenoj i osušenoj masi, ili da je samo rasprše. Poželjno je da se termolabilne komponente, kao što su arome i vitamini, ubrizgavaju neposredno pre matrice (Slika 2.10), kako bi se umanjio uticaj toplote i smicanja i izbegli veći gubici (Riaz, 2007; Riaz, 2000).



Slika 2.10 Šema osnovnih delova jednopusnog ekstrudera sa mestom dodatka termolabilnih komponenti (Wang et al, 2008)

Jednopusni ekstruder se može podeliti u tri zone (Slika 2.12): zonu punjenja, ili transporta, zonu gnječenja, koju sačinjavaju zona mešanja i zona kuvanja, i poslednju, zonu visokog pritiska. U prvoj zoni ekstruder se preko usipnog koša puni sirovim materijalom, koji se obrtanjem puža transportuje ka zoni gnječenja. U njoj se tretirana smeša sabija, a najveći deo mehaničke energije prelazi u toplotnu, što izaziva zagrevanje

materijala. Dolazi do želatinizacije skroba i masa postaje povezanija. Daljim kretanjem, materijal dospeva u zonu visokog pritiska, nakon koje se gura kroz otvore matrice i ekspanduje (Muntean et al., 2003).

Većina jednopužnih ekstrudera poseduje puž čiji je korak navoja konstantne dužine (Karwe, 2003). Neophodan uslov za pravilno kretanje materijala kroz cev jednopužnog ekstrudera je odgovarajući kapacitet punjenja i protok materijala, koji onemogućava lepljenje materijala na površinu puža. Kod ekstrudera namenjenih prehrambenoj industriji efekat slepljivanja je smanjen, ili potpuno izbegnut pomoću zazora unutar cevi (longitudinalni, ili spiralni zazori), koji uzrokuju pojavu frikcije između čestica obrađivane smeše i zidova cevi ekstrudera. Uloga ovih zazora je da povećaju otpor uvrtnju čestica materijala i da usmere njihovo kretanje ka izlazu. Princip delovanja zazora je sledeći: što je frikcija izraženija, manje je uvrtnje čestica oko sopstvene ose i smeša se lakše transportuje napred (Mościcki et Zuilichem, 2011).

Jedna od najbitnijih karakteristika jednopužnog ekstrudera je odnos dužine cevi ekstrudera i njenog prečnika (L/D). Na osnovu ovog odnosa, ekstruderi se mogu podeliti na ekstrudere niskog stepena smicanja (5-8), ekstrudere srednjeg stepena smicanja (4-12) i ekstrudere visokog stepena smicanja (10-20) (Muntean et al., 2012). Druga bitna karakteristika je stepen komresije, koji predstavlja odnos između maksimalne i minimalne širine kanala između puža ekstrudera i zidova cevi. Ovaj stepen se u prehrambenoj industriji uglavnom kreće između 1 i 3 (Karwe, 2003).

Jednopužni ekstruderi se uglavnom koriste za proizvodnju relativno „lakah“ proizvoda, male gustine, kao što su kukuruzni ili pirinčani ekstrudati, koje karakteriše visok koeficijent frikcije. Ovakvi ekstrudati mogu se dobiti čak i pri pritiscima oko 15-20 MPa, a za njihovu proizvodnju dovoljna je upotreba najjednostavnijih autogenih jednopužnih ekstrudera, sa niskim odnosom L/D od oko 4-6. Nedostatak jednopužnih ekstrudera je slabo mešanje materijala, zbog čega je neophodno prethodno homogenizovanje svih komponenti u mešalici. Ovi uređaju pokazuju ograničenu efikasnosti kod obrade višekomponentnih smeša, pa se ne preporučuje mešanje više od dve sirovine (Mościcki et Zuilichem, 2011).

Kod upotrebe jednopužnih ekstrudera veoma je važno obratiti pažnju na vlagu sirovog materijala i veličinu njegovih čestica, koje moraju biti homogene kako bi se omogućilo pravilno funkcionisanje ekstrudera i sprečilo njegovo blokiranje, odnosno

naglo ponovno kretanje. Samo u slučaju homogene smeše dobiće se konsantan željeni kvalitet ekstrudata. Blokiranje nekoliko otvora na matrici ekstrudera uzrokuje naglo povećavanje pritiska i pojavu snažnog povratnog toka materijala, a ponekad čak i potpunu blokadu uređaja. Plasticizirani materijal u unutrašnjosti ekstrudera može izazvati trajna oštećenja uređaja po ponovnom pokretanju ekstrudera (*Mościcki et Zuilichem, 2011*).

Ono o čemu je takođe potrebno voditi računa pri upotrebi jednupužnih ekstrudera je intenzivno hlađenje cevi ekstrudera, što naglo snižava temperaturu i pojačava sile frikcije u materijalu. Sa padom temperature u ekstruderu, povećava se viskozitet materijala, pa je veoma bitno uskladiti režim hlađenja ekstrudera sa željenim kvalitetom ekstrudata (*Mościcki et Zuilichem, 2011*).

2.4.2 Kritični faktori pri procesu ekstrudiranja

Unutar cevi ekstrudera odvijaju se specifične hemijske promene, koje u kombinaciji sa raznorodnim sastavom namirnica, predstavljaju poseban izazov za prehrambene naučnike. Mada je ekstrudiranje hrane prenešeno iz tehnologije proizvodnje sintetskih polimera, plastika je znatno homogenija, pa se tokom njene obrade ne nailazi na veće probleme. S druge strane, oblikovanje i vođenje procesa ekstrudiranja hrane mora uzeti u obzir prirodne varijacije materijala u sadržaju vlage, skroba i proteina, kao i eksperimentalne promene. Osnovne hemijske promene koje se javljaju tokom ekstrudiranja su: cepanje molekula, rekombinacija molekulskih fragmenata i termička degradacija, dok su fizičko-hemijske promene: sjedinjavanje manjih molekula, gubitak prirodne strukture i gubitak pri izlasku iz matrice. Sastav ekstrudirane hrane menja se i usled materijalnih gubitaka, kao što su isticanje ulja, ili isparavanje vode i drugih isparljivih komponenti, pri izlasku iz matrice (*Riaz, 2007*).

Parametri ekstrudiranja se mogu podeliti na primarne i sekundarne, koji su određeni primarnim. U primarne faktore spadaju:

- Temperatura cevi
- Geometrija matrice
- Model ekstrudera

- Sastav materijala
- Vlažnost materijala
- Veličina čestica materijala
- Step en napunjenosti cevi
- Konfiguracija puža
- Brzina obrtanja puža

U sekundarne faktore spadaju:

- Temperatura produkta
- Pritisak
- Specifična mehanička energija.

Ovi faktori utiču na viskozitet hrane unutar cevi, vreme zadržavanja materijala u ekstruderu i primenjeno smicanje. Razlike u sastavu obrađivanog materijala i njegova prethodna obrada, takođe su važni uzročnici promena u eksperimentu.

Tip upotrebljenog ekstrudera značajno utiče na hemijske reakcije. Veći ekstruderi imaju duže cevi i relativno dugo vreme zadržavanja materijala, u odnosu na male laboratorijske i stone ekstrudere. Manji ekstruderi zahtevaju srazmerno manju količinu materijala, s obzirom na kraći period prolaska kroz cev, što je prednost u istraživačkom radu, jer je time omogućena upotreba sastojaka dostupnih samo u malim količinama (*Riaz, 2000*).

2.4.3 Promena fizičko-hemijskih karakteristika sirovina u postupku ekstrudiranja

U tehnologiji ekstrudiranja hrane za ljude i životinje, osnovnu količinu tretiranog materijala čine sirovine biljnog porekla. Posmatrano sa strane promena koje se tokom procesa dešavaju, najznačajnije grupe jedinjenja su: skrob, proteini, mast, ugljeni hidrati, vlakna (celuloza), vitamini i fitogeni sastojci (*Schaaft Tehnologie GmbH, 1995*).

U zavisnosti od konstrukcije samog uređaja (suvi, vlažni, jednopužni, ili dvopužni ekstruder), na obrađivanoj masi se dešavaju sledeće promene (*Riaz, 2007*):

- *Aglomeracija* - sastojci se sabijaju i povezuju u odvojene komadiće.
- *Degasiranje* - sastojci se oslobađaju gasnih „džepova“.

- *Dehidracija* - tokom normalne ekstruzije dolazi do gubitka vlage, a količina varira od 4 do 7 % u odnosu na početni sadržaj, pri proizvodnji hrane za životinje.
- *Ekspanzija* - podešavanjem parametara ekstrudiranja može se regulisati gustina dobijenog proizvoda (što je naročito bitno kod hrane za ribu, jer određuje da li će materijal plutati na površini vode, ili potonuti).
- *Želatinizacija* - termička obrada tokom ekstrudiranja ubrzava želatinizaciju skroba, nezavisno od njegovog porekla.
- *Mlevenje* - prilikom prolaska kroz cev ekstrudera, sastojci se mogu usitniti do određenog stepena.
- *Homogenizacija* - nepoželjni sastojci se restrukturiraju do prikladnijih i prihvatljivijih formi, čime se materijal delimično homogenizuje.
- *Mešanje* - različitost dostupnih puževa za sve vrste ekstrudera omogućava dobro mešanje za sve odnose dodatih komponenata.
- *Pasterizacija i sterilizacija* - usled primene povišenih temperatura, materijal se može pasterizovati, ili sterilizovati.
- *Denaturacija proteina* - proteini životinjskog i biljnog porekla se pri termičkoj obradi denaturišu, čime postaju svarljiviji.
- *Oblikovanje* - jednostavnom promenom matrice na kraju cevi ekstrudera, lako se mogu dobiti proizvodi najrazličitijih oblika.
- *Smicanje* - specijalni oblici cevi ekstrudera obezbeđuju željeno smicanje, što je od naročitog značaja u proizvodnji hrane za životinje.
- *Promena teksture* - tokom ekstrudiranja menja se tekstura, kako sa fizičkog, tako i sa hemijskog aspekta.
- *Termička obrada* - postiže se željeni efekat kuvanja.
- *Sjedinjavanje* - odabirom polaznih sirovina u različitim odnosima, utiče se na karakteristike konačnog proizvoda, koji nakon tretmana postaje jedinstvena masa.

2.4.4 Uticaj ekstrudiranja na masti

Ekstruzija uglavnom nema veliki uticaj na masti, ali masti imaju značajnu fizičku funkciju u procesu ekstrudiranja, s obzirom da kao lubrikanti ograničavaju ekspanziju ekstrudata. Pri povećanom sadržaju masti, obrtni momenat pužnice ekstrudera opada, jer masti i ulja smanjuju frikciju u cevi, pa se smanjuje i ekspanzija proizvoda, usled nedovoljno razvijenog pritiska tokom procesa (Riaz, 2000). Proizvodu se istovremeno smanjuje nasipna masa, kao i brzina tonjenja, koja je izuzetno značajna karakteristika ekstrudirane hrane za ribe (Čolović et al., 2011). Ovo se naročito dešava ukoliko se lipidi ne dodaju pažljivo i postepeno pre ekstrudiranja, ili na samom početku procesa, jer dolazi do raslojavanja ulja i efekta podmazivanja. Pri temperaturama ekstrudiranja svi lipidi prelaze u tečno stanje i neophodno je dispergovati ih u vidu sitnih kapljica, čije dimenzije ne prelaze 1 μ m (Ilo et al., 2000). Ukoliko se doda prevelika količina masne faze, kapljice ulja oblepiće biopolimere (Guy, 1994). Generalno, dodatak oko 0,5 % biljnog ulja u smešu na bazi cerealijsa značajno snižava unos specifične mehaničke energije, ukoliko se ostali parametri održavaju na konstantnom nivou. Gubitak unosa mehaničke energije sniziće temperaturu ekstrudiranog materijala, ali će povećati pritisak na matricu ekstrudera (Ilo et al., 2000).

Hemijske promene lipidne komponente u ekstrudiranom materijalu nisu izrazite, ali se ne mogu ni zanemariti. Generalno je utvrđeno da u toku procesa ekstrudiranja dolazi do slabe oksidacije masne faze zbog povišenih temperatura i dejstva različitih sila u procesu (Ilo et al., 2000). Rao i Arzt su ispitivali lipidnu oksidaciju smeše na bazi kukuruza tokom ekstrudiranja pri temperaturama od 115 do 175 °C. Sa porastom temperature ekstrudiranja, rastao je i peroksidni broj dobijenog ko-ekstrudata zbog ubrzane oksidacije masti pod dejstvom visoke temperature. Isti naučnici su ispitivali stabilnosti proizvoda skladištenog pri temperaturi od 37 °C i utvrdili da ekstrudati proizvedeni pri višim temperaturama imaju slabiju oksidativnu stabilnost od onih koji su proizvedeni pri nižim temperaturama (Rao et Arzt, 1989). Sa druge strane, Alvarez i saradnici utvrdili su da ekstrudiranje smeše na bazi mesa pri temperaturama od 71 do 115 °C nema uticaj na porast peroksidnog broja u ekstrudatu (Alvarez et al., 1990). Može se zaključiti da je primenjena temperatura veoma bitan faktor koji određuje brzinu nastajanja peroksida i dugih produkata oksidacije masti tokom ekstrudiranja.

Još jedan razlog zbog čega su ekstrudati podložni oksidaciji tokom skladištenja jeste njihova fizička forma. Za ekstrudirani materijal karakteristična je porozna struktura sa mnoštvom šupljina, što povećava kontaktnu površinu između proizvoda i kiseonika i omogućava prodiranje kiseonika u samu unutrašnjost ekstrudata (Zademowski *et al.*, 1997). Na taj način, oksidacija se ne odvija samo na spoljašnjoj površini granule, već ravnomerno u čitavoj njenoj zapremini. Pored toga, ne treba zaboraviti da ekstrudiranje redukuje koncentraciju prirodno prisutnih antioksidanasa u tretiranom materijalu, koji spadaju u nestabilna i lako reaktivna jedinjenja (Zademowski *et al.*, 1999). Da bi se sprečila oksidativna užeglost u toku skladištenja, proizvodima se često dodaju različiti antioksidansi, kao što su BHA, BHT, etoksikvin, mešavina tokoferola, ili fero acetat, u količini od 0,2 % ukupnog sadržaja masti u sirovini. Limunska i askorbinska kiselina najčešće se dodaju u količini od oko 0,01 % kao promotori antioksidanasa, koji potpomažu njihovo dejstvo (Riaz, 2000).

Kada se ispituje masnokiselinski sastav ekstrudirane hrane, neophodno je obratiti pažnju na promene kod polinezasićenih masnih kiselina dugih lanaca, koje su visoko reaktivne i podložnije degradaciji. Takođe, Zadernowski i saradnici su u svojim eksperimentima sa ječmom pokazali da ekstrudiranje može uticati na *cis-trans* poziciju izomerizaciju dvostrukih veza (Zadernowski *et al.*, 1999).

Ekstrudirani proizvodi generalno nisu podložni ezimatskom kvarenju. Ono je najčešće posledica hidrolize, ili oksidativnih promena. Glavni uzročnici su slobodne masne kiseline, jer su osetljivije na oksidaciju od triglicerida (Riaz, 2000; Nawar, 1998; Warho *et al.*, 2011). Proces hidrolitičkih promena lipida tokom ekstrudiranja takođe je moguće zaustaviti primenom visokih temperatura (oko 120 °C), vlage materijala od oko 20 % i slabijim dejstvom mehaničkih sila. Pod ovakvim uslovima uspešno se deaktivira enzim lipoksigenaza i sprečava hidroliza lipida. Sa daljim povišenjem temperature i sadržaja vlage u materijalu, deaktivacija enzima je intenzivnija (Ilo *et al.*, 2000).

Stvaranje kompleksa između lipida i amilozne frakcije skroba veoma je važna reakcija koja se odvija tokom ekstrudiranja, jer utiče na formiranje strukture proizvedenog ekstrudata i na njegovu teksturu. Ovoj reakciji naročito su podložni monogliceridi, slobodne masne kiseline i njihovi estri. Zbog toga se pomenuta jedinjenja često upotrebljavaju kao emulgatori, koji menjaju viskozitet obrađivane mase. Primenom visokih temperatura tokom ekstrudiranja, kompleksi lipida i amiloze se

razlažu, da bi se ponovo formirali tokom hlađenja ekstrudata (Guy, 1994). Kapacitet formiranja amilozno-lipidnih kompleksa zavisi od prisutnog skroba u tretiranom materijalu, pa prekomerno dodavanje lipida u smešu ne izaziva efekat daljeg emulgovanja, već dolazi do pojave lubrikacije.

Ukoliko se masti ekstrudiraju u kombinaciji sa ugljenim hidratima i proteinima, pri niskom sadržaju vlage (manje od 20 %) i povišenim temperaturama (više od 150 °C), formiraju se kompleksi lipidi-ugljeni hidrati i lipidi-proteini, čime im se smanjuje rastvorljivost u etru. Posebno su reaktivni polarni lipidi i slobodne masne kiseline. Ovo se mora uzeti u obzir pri određivanju sadržaja ukupnih masti ekstrudiranih proizvoda, naročito ukoliko se primenjuje kisela hidroliza. Stvaranje kompleksa je poželjno sa nutritivnog aspekta, jer se poboljšavaju tekstura i ukus proizvoda. Naime, stvara se utisak manje količine masnoće, nego što je zaista prisutno, a da se pri tome ne utiče na svarljivost proizvoda. (Riaz, 2007; Woodrooffe, 1993).

U procesu ekstrudiranja, prisutni lipidi mogu da deluju kao plastifikatori, koji povećavaju pokretljivost polimernih molekula, snižavajući viskozitet biopolimera, a time i temperaturu njihovog topljenja i temperaturu prelaska u staklastu formu. Smanjeni viskozitet uzrokuje slabije smicanje, što dalje negativno utiče na formiranje strukture biopolimera. Pravilnim dodavanjem lipida u smeše, mogu se kontrolisati funkcionalne karakteristike ekstrudata i prelazak mehaničke energije u toplotnu (Ilo et al., 2000).

Nije samo količina dodate masti značajna za proces ekstrudiranja, već i sirovina iz koje je dobijena, kao i mesto na kojem se inkorporira u proces. Utvrđeno je da mast koja je kao komponenta neke druge sirovine dodata u smešu, ima manji uticaj na ekspanziju, nego mast koja je naknadno dodata u prečišćenom obliku. Zagrevanje masti na temperaturu od 40 do 60 °C pre sitnjenja i mešanja u skladu sa prethodnim proračunima, umanjuje promene viskoziteta mase usled temperature, potpomaže termičku obradu i redukuje negativne efekte na ekspanziju (Riaz, 2007). Kao izvori lipida koriste se salo, loj, živalska mast, različite uljarice i biljna ulja, ulje morskih plodova, kao i mešavine svega navedenog (Riaz, 2000).

Pri odabiru sirovine, masti imaju prednost nad uljima, jer onemogućavaju isticanje i migraciju masnih komponenti u gotovim proizvodima. Monogliceridi i emulgatori (npr. lecitin) dodati u količini od 0,5 % do 1,0 % takođe redukuju migraciju,

izgradnjom kompleksa sa amilozom i proteinima, čime se smanjuje lepljivost ekstrudata (Riaz, 2007).

2.4.5 Problem ekstrudiranja uljarica i upotreba suncokretove sačme u cilju prevazilaženja problema

Kao što je već rečeno, veliki problem prilikom ekstrudiranja sirovina bogatih mastima predstavljaju lubrikacija i ograničena ekspanzija proizvedenog ekstrudata. Još jedan nedosatak koji se javlja jeste ceđenje ulja, čime se menja nutritivni sastav proizvedenog ekstrudata, što je slučaj i sa ekstrudiranjem lanenog semena (Ivanov *et al.*, 2012b). Da bi se pomenuti problem prevazišao, uljaricama se često dodaje još jedna sirovina, uglavnom proteinska komponenta, koja pokazuje dobru sposobnost adsorpcije ulja. U literaturi su poznati primeri ko-ekstruzije lanenog semena sa sirovinama bogatim proteinima, a kao dodatna komponenta uglavnom se koristio grašak (Juárez *et al.*, 2010; Htoo *et al.*, 2008; Thacker *et al.*, 2004).

Suncokret je naša najvažnija uljarica, tako da je suncokretova sačma jedno od najrasprostanjenijih i najčešće korišćenih hraniva u Srbiji. Suncokretova sačma (Slika 2.11) se u ishrani životinja uglavnom koristi zbog bogatog sadržaja proteina, ali ona takođe sadrži i značajne količine ugljenih hidrata. U Srbiji, sadržaj sirovih proteina konvencionalne suncokretove sačme varira u granicama između 33 i 37 %, dok sadržaj sirove celuloze varira od 18 do 23 %. Kao što se može primetiti, količine ova dva nutrijenta su u inverznom odnosu. Odgovarajućom preradom može da se proizvede i sačma sa više od 44 % sirovih proteina, što joj omogućava uporedivost sa sojinom sačmom. Takođe, aminokiselinski sastav ta dva hraniva je komplementaran (Delić *et al.*, 1992; Vilamide *et San Juan*, 1998; Đorđević *et Dinić*, 2011). S obzirom da je dobijena kao nusproizvod proizvodnje suncokretovog ulja, pokazuje dobru moć upijanja masti, pa se nameće kao dodatna komponenta u rešavanju navedenog problema prilikom ekstrudiranja uljarica. Ako se poredi moć absorpcije vode i masti, visokoproteinska suncokretova sačma (43,6 % sirovih proteina) ima slabiju moć upijanja vode od sojine sačme (2,00:2,68 cm³/g) i veću moć upijanja masti (2,05:1,30 cm³/g) (Lević *et al.*, 2005; Lević *et Sredanović*, 2012).



Slika 2.11 Suncokretove sačme različitog kvaliteta

Pored izražene sposobnosti vezivanja masti, ovo hranivo pokazuje čitav niz drugih prednosti u ishrani životinja. U odnosu na druge uljane sačme, vitamini B grupe su daleko najzastupljeniji u suncokretovoj sačmi, a smatra se da je, posle stočnog kvasca, ona najbogatiji izvor ovih vitamina u ishrani životinja. U odnosu na sojinu sačmu, sadrži znatno veće količine tiamina (33:3 mg/kg), niacina (240:30 mg/kg) i biotina (1:0,35 mg/kg). Što se tiče mineralnog sastava, suncokretova sačma u poređenju sa sojinom sadrži znatno veće količine fosfora (1:0,6 %), magnezijuma (0,50:0,26 %), joda (0,70:0,15 mg/kg) i selena (0,70:0,10 mg/kg), a dva puta manju količinu kalijuma (1,1:2,1 %) (Lević, 1995).

Skrob koji sadrži je skoro potpuno svarljiv (od 90 do 100 %) i usvojiv u ishrani monogastričnih životinja. Ipak, s obzirom na nizak sadržaj u sačmi, ne doprinosi mnogo njenom ukupnom energetsom potencijalu. Nivo slabo svarljivih, neskrobnih polisaharida i lignina u suncokretovoj sačmi daleko je viši, što joj smanjuje hranljivu vrednost. Velika količina lignina kojeg ima u suncokretovoj ljuski čini sačmu rezistentnom na bakterijsku degradaciju u gastrointestinalnom traktu životinja. Da bi se usvojivost suncokretove sačme povećala, u hranivo se često dodaju egzogeni enzimi, ili se veštački stvaraju uslovi za bolju svarljivost i absorpciju u digestivnom traktu. Pomenuti postupci daju najbolje rezultate kada se primenjuju u ishrani nepreživara, jer oni prirodno ne poseduju endogeni enzimski sistem sposoban da razgradi strukturne polisaharide. Enzimski preparati pokazuju visoku specifičnost u pogledu uslova u kome deluju (pH vrednost i temperatura), kao i u pogledu supstrata na koji deluju, pa ih je potrebno pažljivo odabrati. Takođe se moraju uzeti u obzir fiziološke karakteristike same životinje i karakteristike sirovina i aditiva u obroku. Enzimi moraju biti stabilni i aktivni

pri normalnim vrednostima pH i temperature u digestivnom traktu životinje. Vrlo često, hranivo se pre dodatka enzimskih preparata podvrgava različitim predtretmanima, kao što su usitnjavnje i razaranje parom, različiti kiseli, bazni i oksidativni tretmani, ili biološki postupci. Cilj ovih postupaka je smanjenje kristalnosti celuloze i ostalih neskrobnih polisaharida, uklanjanje lignina, povećanje dostupne površine i razaranje ćelijskih zidova, da bi se na taj način povećala efikasnost dejstva enzima (Lević et Sredanović, 2012).

Od antinutritivnih materija, u suncokretovoj sačmi identifikovane su hlorogenska i kafena kiselina, ali su njihove koncentracije ispod toksičnih, pa ne predstavljaju problem u ishrani životinja. U nekim literaturnim navodima postoje podaci o štetnom dejstvu antinutritivnih faktora suncokretove sačme u ishrani svinja. Međutim, smatra se da su u pomenutim istraživanjima upotrebljavane sačme lošijeg kvaliteta, pa negativan uticaj potiče od visokog sadržaja suncokretove ljuske, a ne od antinutritivnih faktora, kako je ranije pretpostavljano (Lević, 1995; Senkoğlu et Dale, 1999).

Negativna karakteristika suncokretove sačme, sa aspekta ishrane životinja, je mali procenat lizina i visok udeo sirovih vlakana iz ljuske, kao i nedovoljno riboflavina, dok holina gotovo da uopšte ne sadrži. Sve navedeno predstavlja ograničavajući faktor u ishrani nepreživara. (Đorđević et Dinić, 2011; Đorđević et al., 2009). Najveću hranljivu vrednost ima sačma od oljuštenog suncokretovog semena, koja sadrži preko 50 % proteina i ispod 8 % celuloze.

Sačma suncokreta se prema članu 17 Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje 4/2010 može podeliti u četiri klase kvaliteta (Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, 2010). Prva klasa sadrži minimalno 42% sirovih proteina i maksimalno 12% sirove celuloze, a dobija se prosejavanjem standardne suncokretove sačme. Ovim postupkom se od 100 kg semena dobija oko 15 kg sačme prve klase (Lević et al., 1990). Pre prosejavanja, sačma se melje u specijalnim mlinovima sa kuglama kako bi se usitnilo jezgro, a da se pritom ljuska minimalno ošteti. Kao ostatak nakon prosejavanja dobija se hranivo sa 24 % sirovih proteina i 33 % sirove celuloze, koje se svrstava u suncokretovu sačmu IV klase kvaliteta (minimalno 20 % sirovih proteina i maksimalno 34 % celuloze). Ovakvo hranivo preporučuje se isključivo za ishranu preživara. Presovanjem i ekstrakcijom delimično oljuštenog zrna suncokreta dobija se sačma II klase kvaliteta,

koja prema Pravilniku mora da sadrži minimalno 33 % sirovih proteina i maksimalno 21 % sirove celuloze, dok sačma III klase kvaliteta pored zadovoljenja ovih kriterijuma, može da sadrži i do 8 % masti, što nije dozvoljeno za suncokretovu sačmu II klase (maksimalan sadržaj masti je 2 %).

2.4.6 Uticaj ekstrudiranja na prirodne toksine

Jedna od najznačajnijih prednosti ekstrudiranja nad drugim procesima obrade sirovina je redukcija prirodnih toksina i antinutrijenata koji se nalaze u hrani za životinje. Ova jedinjenja izazivaju trovanja, ili redukuju upotrebljivost nutrijenata. Iako neka od njih imaju blagotvorne efekte na odrastao organizam, kod mladunčadi mogu da izazovu retardiranost i zaostatak u razvoju. Obično se nekoliko prirodnih toksina istovremeno uništava, što olakšava i ubrzava postupak. Tako se, na primer, inhibitori lecitina i α -amilaze potpuno uništavaju pri ekstrudiranju zrnevlja, osim pri temperaturi od 140 °C i vlažnosti od 30 % (Riaz, 2000).

Verovatno najrasprostranjenije jedinjenje ove grupe je tripsin-inhibitor, koji se nalazi u leguminozama, a reaguje sa enzimom varenja proteina kod životinja. Dugotrajna konzumacija ovog jedinjenja vodi do nesrazmernosti u rastu i hipertrofije pankreasa, jer telo na njegovo prisustvo reaguje produkcijom većeg sadržaja enzima. Da bi se omogućila nesmetana upotreba leguminoza u ishrani životinja, ove sirovine se najčešće ekstrudiraju, uz kondicioniranje vodenom parom (Van den Hout et al., 1998). Tokom ekstrudiranja, kako je ranije već objašnjeno, generiše se toplota usled dejstva mehaničkih sila, koja se prenosi konvekcijom kroz čitavu cev ekstrudera. Povišena temperatura, vlaga prisutna u materijalu i intenzivne sile smicanja koje se javljaju usled velike brzine obrtanja puža, inaktiviraju dejstvo prisutnog tripsin inhibitora i na taj način detoksifikuju tretirani materijal. Sile smicanja deluju na inaktivaciju enzima njegovom fizičkom deformacijom, pri čemu mu se narušava sekundarna, ili tercijerna struktura, a nekada čak i osnovni proteinski lanac. Smatra se da je već raskidanje nekovalentnih interakcija između reaktivnih grupa u enzimu dovoljno za njegovu inaktivaciju (Van den Hout et al., 1998).

Lektini (fitohemaglutinini) su glikoproteini koji se specifično i povratno vezuju za odgovarajuće ugljene hidrate, ili druge glikoproteine. Ova jedinjenja koja su u leguminozama prisutna u značajnim količinama, pokazuju čitav niz značajnih pozitivnih dejstava, ali takođe i negativan uticaj na životinjski organizam, koji se ogleda u inhibiciji proteaze (*Silva et al.*, 2012). Lektini se smatraju odgovornim za aglutinaciju membranskih receptora u crevima (*Eys et al.*, 2004). Primena parnog kondicioniranja i ekstrudiranja pri temperaturi od 145 °C i više, dali su dobre rezultate u eliminaciji fitohemaglutininske aktivnosti, koja je pokazatelj prisutnih lektina u sirovini (*Kelkar et al.*, 2012). Smatra se da je inaktivacija lektina posledica povišenih temperatura uz mehanički tretman sirovine tokom ekstrudiranja.

Sačma od pamukovog semena je nusproizvod ekstrakcije pamukovog ulja i u sebi sadrži od 41 do 44 % proteina, ali je, i pored visokog sadržaja proteina, upotreba ovog hraniva je prilično ograničena zbog prisutne toksične supstance – gosipola. Prisustvo ovog jedinjenja u hrani za živinu povezuje se sa lošim performansama rasta i povećanom stopom mortaliteta kod pilića. Ekstrudiranje se preporučuje kao jednostavan i efikasan način za kontrolisano postizanje visokih temperatura i uspešnu redukciju slobodnog gosipola, uz dodatak lizina (*Henry et al.*, 2001). Slobodan gosipol se lako vezuje za lizin pri visokim temperaturama, čime se mu smanjuje koncentracija koja može biti reaktivna u organizmu pilića.

Cijanogeni glikozidi, kako je već napred rečeno, predstavljaju antinutritivne faktore lanenog semena i za njihovu redukciju i inaktivaciju potrebna je primena termičkog tretmana uz prisustvo vlage, ili vodene pare. Ekstrudiranje lanenog semena smatra se pogodnim za uklanjanje HCN iz materijala, jer se u postupku kombinuje nekoliko različitih uticaja: usitnjavanje, mešanje, zagrevanje pod visokim pritiskom u prisustvu vlage, frikcija i smicanje. Usitnjavanje materijala uz istovremeno zagrevanje u prisustvu vlage ubrzava proces hidrolize i formiranje HCN. Nakon opadanja radnog pritiska po izlasku materijala iz cevi ekstrudera, nastala kiselina naglo isparava zajedno sa vodom. Istovremeno visoki pritisak u cevi ekstrudera razara molekule cijanogenih glikozida onemogućavajući na taj način oslobađanje HCN (*Wu et al.*, 2008).

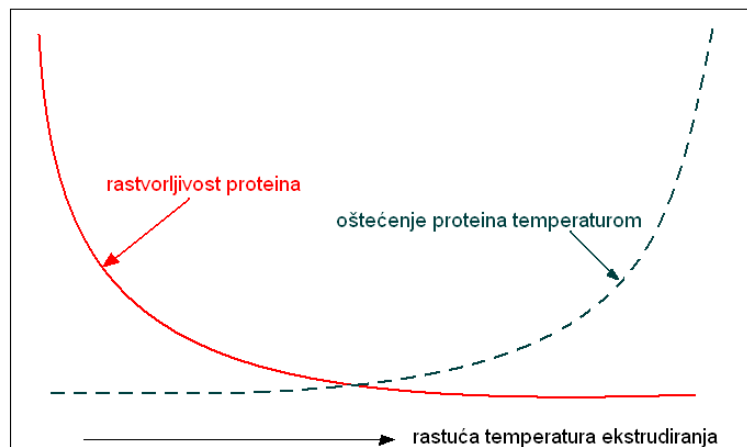
Još jedan značajan aspekt tiče se alergena u hrani. Iako ekstrudiranje ne može eliminisati sve alergenske proteine, razvoj procesa vodi u ovom smeru. Upotreba puža sa diskovima za gnječenje obezbeđuje uništavanje navedenih komponenti pri relativno

niskim temperaturama, izazivajući denaturaciju, prvenstveno povećanjem primenjenog smicanja. Povišenje temperature takođe smanjuje sadržaj alergena, ali promene u količini napojne mase i brzini obrtanja puža nisu dale uspeha (Riaz, 2000).

2.4.7 Uticaj ekstrudiranja na proteine

Proteinski sastojci su jedni od najznačajnijih konstituenata ekstrudirane hrane za životinje i u većini slučajeva čine od 20 do 75 % obrađivane smeše. Njihova važnost ne ogleda se samo u doprinosu nutritivnoj vrednosti, već i u funkcionalnim karakteristikama, kao što su absorpcija vode, elastičnost i vezivnost (Riaz, 2007). Izlaganje proteina konstantnim uslovima povišene temperature, pritiska i mehaničkog dejstva sile smicanja tokom ekstrudiranja, prevodi ih u denaturisano stanje, smanjujući pri tome njihovu rastvorljivost (Harper, 1989). U procesu ekstrudiranja, proteini se razlažu i potom ponovo povezuju disulfidnim vezama, vodoničnim vezama i nekovalentnim interakcijama, pri čemu nastaju vlaknaste strukture u ekstrudatu (Guerrero et al., 2012). Međutim, Zang i saradnici su u svojim eksperimentima pokazali da se ekstrudiranjem frakcija proteina soje sa vrlo malim sadržajem glicerola dobijaju izuzetno krte ekstrudati koji ne poseduju vlaknastu strukturu. Stoga su naučnici su zaključili da je za pokretljivost i ponovo vezivanje proteinskih lanaca neophodno prisustvo dovoljne količine glicerola (Zang et al., 2001). Nakon raskidanja prvobitnih veza u proteinima, nove orijentacije lanaca proteina i njihovo povezivanje intermolekularnim vezama uzrokuju formiranje stabilne trodimenzionalne proteinske mreže.

Veoma često je u proizvodnji hrane za životinje poželjno pažljivo denaturisati protein ekstruzijom, jer umereno raskidanje proteinske strukture poboljšava svarljivost. Drugi proteinski sastojci, opet, inhibiraju normalnu svarljivost ili smanjuju životni vek proizvoda. Primer za to je ureaza sojinog zrna, nepoželjan enzim koji se lako inaktivira ekstruzijom. Slika 2.12 prikazuje promenu rastvorljivosti i stepen denaturacije proteina u zavisnosti od temperature ekstrudiranja.



Slika 2.12 Zavisnost rastvorljivosti i stepena denaturacije proteina od temperature ekstrudiranja

Pri ekstruziji materijala bogatih proteinima u prisustvu redukujućih šećera, interakcijom pomenutih komponenata, formiraju se produkti Maillard-ove reakcije, što utiče na smanjenje nutritivne vrednosti finalnog produkta. Veći sadržaj vlage pri ekstrudiranju, kao i manji sadržaj redukujućih šećera, smanjuje opasnost od ove pojave (Woodroffe, 1993).

Lizin je daleko najreaktivnija amino kiselina u granulama cerealija, zbog čega je njegovo očuvanje u ekstrudiranim proizvodima specijalno važan zadatak. Dokazano je da porast sadržaja vlage sa 13 na 18 % pri 200 °C može drastično da smanji degradaciju lizina. Pod oštrijim uslovima procesa, prisutnost ostalih aminokiselina, kao što su cistin, arginin i histidin, smanjuje se u finalnoj masi. Sa druge strane, analitički podaci pokazuju da je metionin vrlo postojan na širok spektar uslova kondicioniranja.

Sa stanovišta ekstruzije, postoje dve forme proteina koje bi trebalo razmatrati: denaturisani i nendenaturisani proteini. Denaturisani proteini su u pripreмноj fazi izloženi kuvanju do stepena pri kojem se neki od aminokiselinskih lanaca cepaju do pojedinačnih aminokiselina, ili do kraćih lanaca (mesni obrok, riblji obrok, ekstrahovani sojin obrok). Ovi proteini nisu u mogućnosti da želatiniziraju tokom ekstruzije, tako da ne doprinose vezivnim osobinama smeše sirovih materijala.

Nedenturisani proteini su oni koji prethodno nisu bili tretirani toplotom, ili na neki drugi način. Njihovi aminokiselinski lanci su neoštećeni i pod određenim uslovima ekstruzije, formiraju gelove na isti način kao i škrob. Ponašaju se kao vezivni materijal, pa se praktično mogu koristiti samostalno kao jedini sastojak za dobijanje teksturisanih

biljnih proteina. Nedenaturisani protein u kompleksu sa skrobom može da formira stabilan proizvod u odnosu na vodu. Ipak, ukoliko su uslovi ekstruzije preoštri, nedenaturisani protein će proći kroz stanje gela i vratiti se u inertno stanje denaturisan.

Sirovine koji sadrže proteine dele se na biljne i životinjske. U izvore biljnih proteina ubrajaju se seme uljarica, kao što je sojino, i gluten iz pšenične, ili kukuruzne klice. Izražene funkcionalne karakteristike biljnih proteina zahtevaju da se sa povećanjem njihovog udela u sirovinama, povećava i sadržaj vlage. Generalno, biljni proteini poseduju sledeće osobine (Riaz, 2007):

- 1) Visok indeks rastvorljivog azota i visok indeks proteinske disperzibilnosti
- 2) Odlična sposobnost absorpcije vode i vezivne karakteristike
- 3) Neka ograničenja u profilu amino kiselina, koja mogu zahtevati dodatak specifičnih esencijalnih aminokiselina
- 4) Niska cena
- 5) Proteinski sastojci mogu sadržati i značajnu količinu masti, koja je dobar izvor energije
- 6) Doprinosu zagušenju matrice usled nakupljanja materijala

Animalni proteini strukturno ne doprinose ekstrudiranoj masi, s obzirom da ne ekspanduju, niti se kombinuju i povezuju sa ostalim sastojcima na način na koji to rade skrobovi, ili biljni proteini. Ovo je na prvom mestu posledica visokog stepena termičke obrade kojoj se podvrgavaju u pripremnoj fazi. U poslednje vreme, inovacije u obradi sirovina proizvele su proteine sa visokim indeksom rastvorljivosti, čineći ih tako korisnim sastojcima sa aspekta funkcionalnih osobina.

2.5 Eksperimentalni dizajn i metoda odzivne površine

Prilikom ispitivanja nekog sistema, njegovog razvoja i optimizacije, neophodno je izvesti mnogobrojne eksperimente, bilo da je u pitanju laboratorija, pilot postrojenje, industrijski pogon, ili kliničko istraživanje. S obzirom na veliki obim posla koji prethodi dobijanju bilo kakvog praktično upotrebljivog rezultata, povećanje efikasnosti istraživanja je od izuzetne važnosti. Jedan od načina da se to postigne jeste primena statističkih matematičkih metoda, ili dizajniranje eksperimenta. Eksperimentalni dizajn

može da se definiše kao planirani pristup nekom naučnom problemu, sa ciljem da se odredi uzročno-posledična veza između zavisnih i nezavisnih parametara nekog procesa. Njegova osnovna svrha je da se prikupi maksimalna količina relevantnih podataka, uz minimalan utrošak vremena i eksploataciju uređaja i sirovina. Eksperimentalni dizajn trebalo bi da bude što jednostavniji i konzistentniji, a da pritom ispunjava zahteve postavljenog problema (*Lazić, 2004*).

Danas je poznat čitav niz različitih tipova eksperimentalnog planiranja, kao što su: centralni kompozitni dizajn (CCD), centralni kompozitni rotacioni dizajn (CCRD), centralni kompozitni ortogonalni dizajn (CCOD), potpuni eksperimentalni dizajn, Doehlert-ove matrice (DM), Box – Behnken-ov dizajn (BBD) i mnogi drugi (*Lazić, 2004; Ferreira et al, 2007; Batmaz et Dokuz, 2002*). Koji će od pomenutih biti primenjen u planiranju eksperimenta, zavisi od cilja istraživanja. Tako se, na primer, jednostavan komparativni dizajn primenjuje u početnim istraživanjima i ispitivanju uticaja samo jednog faktora na jednu zavisnu veličinu procesa. Za utvrđivanje osnovnih interakcija i dobijanje regresionog modela (polinoma) prvog reda, preporučuje se potpuni eksperimentalni dizajn (*Lazić, 2004; Batmaz et Dokuz, 2002*). Kada je krajnji cilj istraživanja optimizacija nekog postupka, onda je za opisivanje uzročno-posledičnih veza između nezavisno i zavisno promenljivih veličina procesa neophodno primeniti polinome drugog reda. U tom slučaju, najčešće se uoptrebljavaju CCD, CCRD, DM i BBD, a svaki od posmatranih nezavisnih parametara (faktora) mora imati tri, ili pet nivoa vrednosti, što zavisi od konkretnog dizajna (*Lazić, 2004; Batmaz et Dokuz, 2002; Ferreira et al, 2007; del Castillo, 2007*).

Jedna od prednosti BBD nad ostalim tipovima dizajna je ta da ne sadrži kombinacije parametara u kojima su svi faktori na svojim najvišim, ili najnižim nivoima. Zbog toga je ovaj tip dizajna podesan za izbegavanje ekstremnih uslova rada, pod kojima se često dobijaju nezadovoljavajući rezultati sa velikim odstupanjima (*Ferreira et al., 2007*). U Tabeli 2.2 upoređene su efikasnosti različitih tipova eksperimentalnog dizajna, pri čemu je efikasnost definisana kao odnos broja koeficijenata u matematičkom modelu i broja neophodnih eksperimenata.

Tabela 2.2 Efikanost različitih tipova eksperimentalnog dizajna (*Ferreira et al., 2007*)

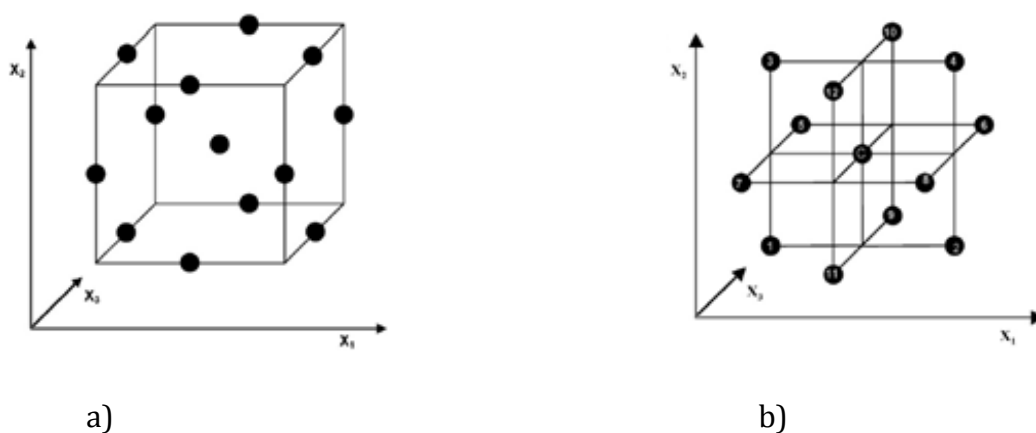
Faktor i (k)	Broj koeficijent a (p)	Broj eksperimenata (f) bez ponavljanja u centralnoj tački			Efikasnost (p/f)		
		CCD	DM	BBD	CCD	DM	BBD
2	6	9	7	-	0,67	0,86	-
3	10	15	13	13	0,67	0,77	0,77
4	15	25	21	25	0,60	0,71	0,60
5	21	43	31	41	0,49	0,68	0,61
6	28	77	43	61	0,6	0,65	0,46
7	36	143	57	85	0,25	0,63	0,42
8	45	273	73	113	0,16	0,62	0,40

Metoda odzivne površine (RSM – Response Surface Methodology) predstavlja jednostavan i široko upotrebljavan postupak ispitivanja odnosa između nezavisnih parametara procesa i različitih karakteristika dobijenog proizvoda, ili zavisnih veličina procesa. U današnje vreme postala je najčešće upotrebljavana tehnika za razvijanje različitih matematičkih modela. Metoda predstavlja empirijsku statističku tehniku koja se primenjuje za regresionu analizu podataka dobijenih u eksperimentima, rešavanjem sistema jednačina. Svaka od dobijenih jednačina predstavlja po jednu funkciju odziva (zavisno promenljivu veličinu koju želimo da ispitamo). Ove funkcije mogu se grafički prikazati kao odzivne površine, po čemu je metoda i dobila ime (*del Castillo, 2007*).

Protekli niz godina, RSM se u kombinaciji sa različitim eksperimentalnim dizajnima uspešno primenjuje u optimizaciji parametara ekstrudiranja. Mnogobrojni su primeri optimizacije ekstrudiranja primenom ove metode u proizvodnji različitih dvokomponentnih smeša, kao što su ječam - groždana komina (*Altan et al., 2008*), kukuruz - soja (*Pérez et al., 2008*), soja – indijski krompir (*Iwe et al., 2004*), brašno pirinča - amarantus (*Ilo et Berghofer, 1999*), pektin – proteini soje (*Bueno et al., 2009*), itd. Metoda se pokazala pogodnom za modelovanje procesa ekstrudiranja cerealijskih i škroba (*Vainionpää, 1991, 1995; El-Dash et al., 1983*), zatim žitarica i njihovih produkata

(Zang et al., 2011; Guha et al., 2003; Reyes-Moreno et al., 2003), kao i u proizvodnji brze hrane (Yağcı et Göğüş, 2008; Pansawat et al., 2008).

BBD spada u grupu rotacionih, ili približno rotacionih tipova dizajna drugog reda, a baziran je na nepotpunom faktorskom dizajnu na tri nivoa. Za tri faktora, ovaj tip eksperimentalnog dizajna može se grafički predstaviti kao kocka sa centralnom tačkom i središnjim tačkama na ivicama (Slika 2.13 a), ili kao tri ukrštena 2^2 faktorska dizajna sa centralnom tačkom (Slika 2.13 b) (Ferreira et al., 2007).



Slika 2.13 Grafičko predstavljanje Box-Behnken dizajna (Ferreira et al, 2007)

Broj tretmana neophodan za primenu BBD definisan je kao:

$$N = 2 \times k \times (k - 1) + C_0 \quad (3)$$

gde je N – broj tretmana, k - broj faktora (nezavisnih parametara procesa), a C_0 - broj centralnih tačaka.

Dizajn se smatra nepotpunim jer se ne variraju sve nezavisno promenljive istovremeno, pri svakom tretmanu, već se formiraju takozvani „blokovi“, čiji izgled zavisi od broja faktora (nezavisno promenljivih).

RSM uglavnom se fokusira na probleme u kojima se posmatra samo jedan odziv, odnosno jedna zavisno promenljiva karakteristika. Međutim, prilikom razvijanja nekog proizvoda ili procesa, mnogo češće je neophodno uskladiti nekoliko odziva, kako bi se dobilo najbolje rešenje, posmatrano sa različitih aspekata (Jeong et Kim, 2009). U literaturi se ovakav problem uglavnom naziva “problem višestrukih odziva” (Khuri,

1996). Kada se govori o procesima sa nekoliko odziva, postavljeni cilj se najčešće rešava kroz sledeće tri faze (*Costa, 2011*):

- Prikupljanje podataka – eksperimentalno se dobijaju podaci, koji se sakupljaju i obrađuju, kako bi se utvrdilo koji od njih ima statistički značajan uticaj na ispitivane veličine procesa.
- Izrada modela – pronalaze se kvadratne jednačine koje opisuju ispitivane kvalitativne karakteristike kao funkcije kontrolnih faktora (nezavisno promenljivih).
- Optimizacija – modeli se ispituju kako bi se utvrdili nivoi nezavisno promenljivih parametara pri kojima će se postići optimalni uslovi sistema.

Optimizacija problema višestrukih odziva se može predstaviti izrazom 4:

$$\begin{array}{ll} \text{Optimizacija} & \{y_1(x), y_2(x), \dots, y_i(x)\} \\ \text{Predmet} & x \in \Omega \end{array} \quad (4)$$

Gde je: $y_i(x)$ i -ti određeni model odziva, a Ω je opseg merenja (*Jeong et Kim, 2009*).

Postoji nekoliko načina za optimizaciju, a jedan od najčešće upotrebljivanih je takozvani postupak „poželjne funkcije“ (desirability function) (*Deringer, 1994; Jeong et Kim, 2009*). U pomenutom pristupu, koji je prvi put predstavio *Harrington* još 1965. godine, svaki utvrđeni odziv se transformiše u vrednost koja se naziva pojedinačna “poželjna funkcija” i može se kretati između 0 i 1. Što je vrednost bliža 1, to je funkcija poželjnija. Kombinacijom pojedinačnih poželjnih funkcija dobija se ukupna poželjna funkcija, čija vrednost opet treba da bude što bliže 1. Na osnovu nje se pronalazi kompromisno rešenje za zadovoljavanje višestrukih kriterijuma, koji su vrlo često u suprotnosti jedni sa drugima (*Trautmann et Weihs, 2006; Jeong et Kim, 2009*). S obzirom da nemaju svi odzivi jednak značaj u optimizaciji, svakom od njih se dodeljuje prioritet, od kojeg će zavisiti i optimalne vrednosti parametara. Najmanje značajnom odzivu dodeljuje se vrednost prioriteta 1, a najznačajnijem 5. Ukupna poželjna funkcija imaće vrednost 1 samo u slučaju da svaka pojedinačna poželjna funkcija ima maksimalnu vrednost. Kada makar jedna pojedinačna funkcija ima vrednost 0, tada će i ukupna poželjna funkcija imati vrednost 0, odnosno nemoguće je postići optimizaciju procesa (*Costa, 2011*).

3. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni deo doktorske disertacije u potpunosti je urađen na Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu. Procesi mlevenja sirovina, ko-ekstruzije i hlađenja nakon proizvodnje ko-ekstrudiranog hraniva izvedeni su u pilot postrojenju za proizvodnju hrane za životinje. Hemijske analize sirovina i proizvedenog hraniva urađene su u hemijskoj, a mikrobiološka ispitivanja u mikrobiološkoj laboratoriji Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Instrumentalne analize uzoraka izvedene su na odeljenju mikroanalitike u okviru objedinjene laboratorije Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Postupak skladištenja ko-ekstrudata pri kontrolisanim uslovima relativne vlažnosti vazduha i temperature sproveden je u okviru fizičke laboratorije Istraživačkog centra za tehnologiju hrane za životinje i animalnih proizvoda Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Na osnovu eksperimentalnih podataka formirani su matematički modeli, koji opisuju uticaj variranih parametara procesa na kvalitet dobijenog funkcionalnog hraniva i utvrđene su oksidativne i mikrobiološke promene ispitivanog ko-ekstrudata u toku skladištenja.

3.1. Materijal

Sirovine koje su korišćene u proizvodnji funkcionalnog hraniva su laneno seme i suncokretova sačma. Upotrebljeno laneno seme je autohtone sorte „Ljupko“, Centra za poljoprivredna i tehnološka istraživanja iz Zaječara. Proizvedeno je u opštini Zaječar, atar sela Veliki Izvor u dolini reke Beli Timok. Tip zemljišta na kojem je lan uzgajan je podzol. Suncokretova sačma korišćena u eksperimentu je nabavljena iz uljare „Victoria Oil“ a.d. iz Šida. Iz proizvodnog procesa uzeta je sačma sa oko 38 % proteina, računato na suhu materiju. Sačma je upotrebljena u cilju sprečavanja isticanja lanenog ulja, kao visokokvalitetnog nutritivnog sastojka, prilikom ekstrudiranja.

Radi produženja održivosti proizvedenog funkcionalnog hraniva, samlevenom ko-ekstrudatu su u toku skladištenja dodavani komercijalni preparati karvakrol i vitamin E, sa poznatim antioksidativnim i antimikrobnim dejstvom.

Primenjeni vitamin E bio je u obliku praha, pod komercijalnim nazivom Lutavit E50 proizvođača BASF Corporation, sledećih karakteristika:

- Izgled: prah, adsorens na bazi koloidne silike
- Sadržaj: minimum 50 % vitamin E acetata
- Rastvorljivost: nerastvorljiv u vodi
- Gubitak pri sušenju: maksimalno 5 %
- Veličina čestica < 0,84 mm
- Nasipna masa: 0,45 – 0,60 g/cm³

Upotrebljeni karvakrol, proizvođača Food Base Kft. (Gödöllő, Mađarska) imao je sledeće karakteristike:

- Hemijska formula: C₁₀H₁₄O
- Molekulska masa: 150,22 g/mol
- Izgled: bezbojna do bledožuta prozirna tečnost
- Temperatura ključanja: 238 °C
- Temperatura paljenja: 85 °C
- Gustina: 0,9650 – 0,9800 g/cm³
- Rastvorljivost: u alkoholima

3.2 Tehnološki postupak ekstrudiranja

Postupak ko-ekstrudiranja lanenog semena i suncokretove sačme u cilju dobijanja funkcionalnog hraniva izveden je u pilot postrojenju za proizvodnju hrane za životinje Istraživačkog centra za tehnologiju hrane za životinje i animalnih proizvoda u okviru Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Šematski prikaz linije proizvodnje dat je na Slici 3.1



Slika 3.1 Šematski prikaz linije za proizvodnju funkcionalnog hraniva

Za mlevenje lanenog semena upotrebljen je laboratorijski mlin čekićar sa četiri čekića u svakom od četiri postojeća reda (ukupno šesnaest čekića), Tip 11, proizvođača „ABC Inženjering“ (Pančevo, Srbija), sa sledećim karakteristikama (Slika 3.2):

- snaga motora – 2,2 kW
- kapacitet – 200 kg materijala/ h
- frekvencija – 50 Hz
- broj obrtaja motora – 2880 o/ min.
- prečnik sita – 31 cm
- dužina jednog čekića – 10 cm.

U eksperimentima je upotrebljeno sito prečnika otvora od 4 mm. Pokušana je i upotreba sita sa otvorima manjih prečnika, ali je zbog velike količine ulja u lanenom semenu to bilo nemoguće.



Slika 3.2 Laboratorijski mlin čekićar

Mešanje materijala izvedeno je u dvoosovinskoj lopatastoj mešalici – parnom kondicioneru, model SLHSJ0.2 „Muyang“ (Kina), sa duplim zidovima (plaštom), rezervoarom za doziranje tečnosti i vodovima za doziranje pare i vode. Svaka osovina na sebi sadrži četrnaest lopatica. Postupak parnog kondicioniranja u ovom eksperimentu nije korišćen, jer u tom slučaju ne bi bilo moguće precizno podesiti željenu vlažnost materijala. Zbog toga je smeši, preko rezervoara za doziranje tečnosti, postepeno dodavana voda. Karakteristike mešalice su sledeće:

- snaga motora – 2,2 kW
- kapacitet – 100 kg materijala/ šarži
- frekvencija – 50 Hz
- težina mešalice – 720 kg
- vreme mešanja – 90 s
- koeficijent varijacije smeše nakon mešanja – $CV \leq 5 \%$

Samlevene sirovine u odnosu 50:50 mešane su bez dodatka vode 45 s, nakon čega je postepeno dozirana odgovarajuća količina vode i mešanje je nastavljeno još 45 s.

Nakon mešanja, pristupilo se ekstrudiranju materijala na uređaju ekstruder/ekspander OEE 8, AMANDUS KAHL GmbH & Co. KG iz Nemačke (Slika 3.3), sledećih tehničkih karakteristika:

- maksimalan kapacitet - 100 kg/h
- maksimalna brzina obrtanja puža ekstrudera - 600 o/min.
- snaga motora - 11 kW
- snaga dozirnog sistema – 0,37 kW
- odnos dužine i prečnika cevi ekstrudera (L/D) – 8,5:1

Ukupna količina ekstrudiranog materijala iznosila je 378 kg. Ekstrudirano je 14 kg smeše po tretmanu, od čega je za dalje analize uzeto 2 kg ko-ekstrudata.



Slika 3.3 Ekstruder upotrebljen u eksperimentu

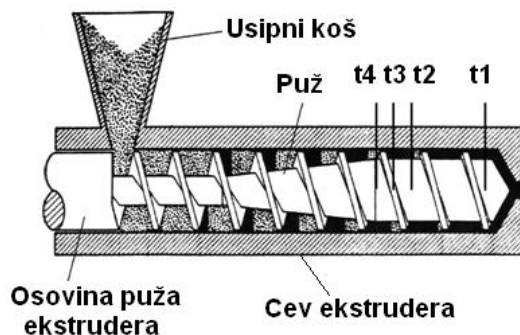
Brzina obrtanja puža ekstrudera, kapacitet napunjenosti cevi ekstrudera, tj. brzina protoka materijala kroz ekstruder i ukupna površina otvora na matrici podešavani su na osnovu vrednosti dobijenih eksperimentalnim dizajnom.

Utrošena energija tokom ekstrudiranja praćena je na digitalnom displeju ekstrudera. Kako je na uređaju moguće očitati samo procenat iskorišćenja snage motora, potrošnja energije izračunata je na sledeći način (5):

$$\text{Potrošnja energije } \left(\frac{\text{kWh}}{\text{t}} \right) = \frac{\text{Iskorišćen je motora } (\%) \times \text{Snaga motora } (\text{kW})}{\text{Kapacitet punjenja } \left(\frac{\text{kg}}{\text{h}} \right)} \times 10 \quad (5)$$

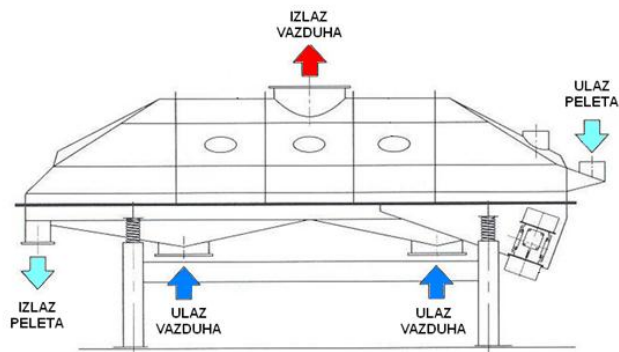
Potrošnja energije izražena je kao srednja vrednost deset uzastopnih merenja.

Temperature koje su postizane tokom ekstrudiranja, merene su kontaktnim termometrima izrađenim u Centru za mikroelektronske tehnologije i monokristale (IHTM, Beograd), na četiri mesta kao na Slici 3.4. Izmerene temperature izražene su kao srednja vrednost deset uzastopnih merenja.



Slika 3.4 Tačke merenja temperature u cevi ekstrudera

Dobijeni ko-ekstrudat je doziran uz pomoć vibrodzera u vibro sušnicu/hladnjak (model FB 500x200, "Amandus Kahl", Nemačka), gde je hlađen 10 minuta pri temperaturi od 25 °C i protoku materijala od 18 kg/h (Slika 3.5).



Slika 3.5 Vibro sušnica/hladnjak

3.3 Osnovne hemijske analize sirovina i ko-ekstrudata

Vlažnost materijala određena je prema AOAC 950.46 metodi, sušenjem na temperaturi od 103 ± 2 °C u sušnici, do konstantne mase (AOAC, 2000). Za utvrđivanje sadržaja sirovih proteina upotrebljena je Kjeldalova titrimetrijska metoda (Sl. list SFRJ, br. 15/87), a sadržaj sirovog pepela određen je po AOAC 942.05 metodi (AOAC, 2000). Ukupna količina sirovih vlakana određena je metodom AOAC 978.10 (AOAC, 2000).

Ukupan sadržaj masti određen je na uređaju za ekstrakciju masti, prema proceduri proizvođača (Soxtec System HT, model 1043 Extraction unit, „Foss Tecator AB“, Švedska) i u skladu sa metodom AOCS Ba 3-38 (AOCS, 2001) i Pravilnikom o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane (Sl. list SFRJ, br. 15/87).

Sadržaj kalcijuma i fosfora u lanenom semenu koje je upotrebljeno za proizvodnju ko-ekstrudata određen je prema metodama Sl. list SFRJ, br. 15/87. Sadržaj gvožđa, magnezijuma, mangana, kalijuma i cinka određen je u skladu sa metodom SPRS ISO 6869:2004.

Indeks rastvorljivosti azota (NSI – Nitrogen Solubility Index) određen je u skladu sa JUS ISO E.N8.001:2000.

Kiselost masne faze ko-ekstrudata određena je standardnom metodom alkalimetrijske titracije JUS E.K8.026/1991, (Dimić et Turkulov, 2000), nakon hladne ekstrakcije masne faze. Hladna ekstrakcija masne faze iz uzoraka izvedena je pomoću smeše dietiletar/ etanol (95 % vol) u odnosu 1:1. Pre ekstrakcije, uzorci su fino samleveni u laboratorijskom mlinu sa hlađenjem (FOSS Knifetec™ 1095, Tecator technology, Denmark). Ekstrakcija se izvodila u trajanju od 24 sata, uz blago mućkanje. Nakon filtriranja ekstrakta, rastvarač je uklonjen uparavanjem u vakuum uparivaču. Kiselost je izražena je kao sadržaj slobodnih masnih kiselina (SMK) u ko-ekstrudatu i predstavlja maseni procenat slobodnih masnih kiselina u masnoj fazi ko-ekstrudata, računato na oleinsku masnu kiselinu (C 18:1), u skladu sa JUS ISO 729:1992.

Svi uzorci su inertizovani u struji azota i čuvani u sterilnim vrećicama za uzorkovanje u zamrzivaču na temperaturi od -20 °C do momenta izvođenja analiza.

3.4 Određivanje sadržaja cijanogenih glikozida preko sadržaja cijanovodonične kiseline u uzorcima

Sadržaj HCN u uzorcima lanenog semena i ko-ekstrudata lan-suncokretova sačma određen je alkalnom titracijom sa srebro nitratom (AgNO₃), prema zvaničnoj AOAC metodi broj 915.03, sekcija b (AOAC, 2000), koja se preporučuje za biljne toksine. Dvadeset grama samlevenog uzorka izmereno je u Kjeldalovu tikvicu u koju je potom

dodato 200 ml vode radi hidrolize uzorka i oslobađanja HCN. Prema originalnoj metodi, ovako pripremljen uzorak trebalo bi da se hidrolizuje od 2 do 4 sata u tikvici koja je direktno povezana sa aparaturom za destilaciju vodenom parom. S obzirom da je primećeno da 4 sata nije dovoljno za potpunu hidrolizu, metoda je modifikovana tako da su uzorci ostavljani da odstoje najmanje 8 - 10 sati u hermetički zatvorenoj tikvici, koja se neposredno pred destilaciju otvarala i brzo priključivala na već pripremljenu aparaturu za destilaciju.

Zadnji kraj destilacionog hladnjaka uranja se u erlenmajer zapremine 500 ml, prethodno napunjen sa 20 ml vodenog rastvora NaOH (0,5g u 20 ml vode) u koji se sakuplja oko 150 do 160 ml destilata. Potom se destilat razblažuje vodom do zapremine od 250 ml, iz čega je uziman alikvot od 100 ml koji se prebacuje u manji erlenmajer (250 ml), gde je destilatu dodato 8 ml 6M amonijum hidroksida i 2 ml 5 % rastvora kalijum jodida. Na isti način pripremana je i slepa proba. Analit je titrisan 0,02 molarnim rastvorom AgNO₃ pomoću mikrobirete. Završna tačka titracije lako se uočavala, naročito naspram tamne podloge, kao svetlo, blago, ali trajno zamućenje.

Kako srebro iz AgNO₃ u reakciji sa HCN postaje dvovalentno, sadržaj cijanovodonične kiseline izračunavan je preko jednačine 6:

$$X = C \times (V - V_0) \times 54 \times \frac{\text{razblaženj e}}{\text{aliquot}} \times \frac{1000}{m} \quad (6)$$

Gde je: X – sadržaj cijanovodonične kiseline u uzorku (mg/kg uzorka)

m – masa uzorka (g)

C – koncentracija AgNO₃ (mol/l)

V – zapremina utrošenog standardnog rastvora AgNO₃ (ml) za titraciju destilata

V₀ – zapremina utrošenog standardnog rastvora AgNO₃ (ml) za titraciju slepe probe

Stepen uklanjanja HCN iz uzoraka (%) nakon ekstrudiranja izračunat je preko jednačine 7:

$$\% \text{ uklanjanja HCN} = \left(1 - \frac{\text{sadržaj HCN nakon ekstrudiranja}}{\text{sadržaj HCN u netretiran om materijalu}}\right) \times 100 \quad (7)$$

3.5 Određivanje sastava masnih kiselina u uzorcima

Za analizu masnokiselinskog sastava, masti su se iz uzoraka ekstrahovale superkritičnom ekstrakcijom sa CO₂ na FAT analyzer-u 2000 (Leco Corporation, USA). Kao fluidni rastvarač korišćen je superkritični CO₂, čistoće 99,995 % i konstantnog protoka od 2 l/min. Infuzorijska zemlja sastava: do 54 % kristalne silike, manje od 50 % kristobalita i manje od 4 % kvarcnog peska, upotrebljena je kao adsorbens za vezivanje tragova vode iz uzoraka, a dodavana je direktno u uzorak u količini od 2g/g uzorka.

S obzirom na to da proizvođač nije razvio metodu za ekstrakciju masti iz lanenog semena, pre analize uzoraka pristupilo se optimizaciji parametara procesa, prilagođenih ovoj vrsti uzoraka. Za ekstrakciju masti iz lanenog semena utvrđeni su sledeći optimalni parametri (Ivanov *et al.*, 2012a):

- Ekstrakcioni pritisak, $p_e = 62,05$ MPa
- Vreme dinamičke ekstrakcije, DET = 45 minuta
- Zapremina dodatog etanola kao ko-rastvarča, $V_e = 1$ ml
- Temperatura ćelije i promenljivog toplotnog restriktora = 100 °C

Isti uslovi ekstrakcije primenjeni su i na ko-ekstrudat lan-suncokretova sačma, jer se pokazalo da daju zadovoljavajuće rezultate. Ekstrakcija je izvedena pod uslovima i prema postupku opisanim u radu Ivanov *et al.* (2012a). Ovako dobijeni ekstrakti dalje su upotrebljavani za pripremu metil-estara masnih kiselina i masnokiselinsku analizu.

Metil-estri masnih kiselina pripremani su metodom po Verešbaraniju kao preporučenom za ovaj tip uzoraka, u procesu transmetilacije sa 14 % metanolnim rastvorom bortrifluorida (Karlović *et Andrić*, 1996). Kao rastvarač upotrebljen je n-heptan, a za inertizaciju i oslobađanje metil estara masnih kiselina od ostataka rastvarača primenjivano je uparavanje u struji azota.

Pripremljeni uzorci analizirani su na gasnom hromatografu (GC) Agilent 7890A system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) sa plameno-jonizujućim detektorom (FID – Flame Ionization Detector) i autoinjektujućim sistemom za tečnosti, na kapilarnoj

koloni od mešane silike DB-WAX 30 m, 0,25 mm, 0,50 um. Kao gas nosač upotrebljen je helijum čistoće 99,9997 vol %, pri protoku od 1,5 ml/min i pritisku od 1,092 bara. Uzorci su ubrizgavani u kolonu u takozvanom split režmu, čiji je odnos iznosio 30:1. Primenjeni temperaturni režim prikazan je na Slici 3.6. Ukupno vreme jedne analize iznosilo je 41,311 minuta.

	Rate °C/min	Value °C	Hold Time min	Run Time min
▶ (Initial)		40	0.5	0.5
Ramp 1	25	195	5	11.7
Ramp 2	3	205	8.5	23.533
Ramp 3	9	230	15	41.311
*				

Slika 3.6 Temperaturni režim rada GC-FID pri analizi sastava masnih kiselina uzoraka

Pikovi metil estara masnih kiselina identifikovani su poređenjem retencionih vremena iz uzoraka sa retencionim vremenima iz standarda "Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix" kao i sa internim podacima dobijenim u prethodnim ispitivanjima masnih kiselina na gasnom hromatografu sa masenim detektorom.

Dobijeni rezultati izražavani su kao masa pojedinačne masne kiseline, ili grupe masnih kiselina (g) u 100 g masnih kiselina iz uzorka, tj. kao relativni maseni sadržaji.

3.6 Eksperimentalni plan i statistička obrada podataka

U eksperimentu je primenjen BBD pre svega kako bi se izbegli ekstremni uslovi rada uređaja. Izgled blokova ovog dizajna za četiri faktora, koliko je u eksperimentu varirano, prikazan je u tabeli 3.1 (*del Castillo, 2007*).

Tabela 3.1 Box-Behnken-ov dizajn za četiri faktora (nezavisno promenljive)

X_1	X_2	X_3	X_4
± 1	± 1	0	0
0	0	± 1	± 1
0	0	0	0
0	± 1	± 1	0
± 1	0	0	± 1
0	0	0	0
± 1		± 1	
	± 1		± 1
0	0	0	0

Kao što se može primetiti, kompletan eksperiment sastoji se iz tri bloka od po osam tretmana. Ako se svakom bloku doda po jedna centralna tačka, svaki od njih postaje ortogonalan u odnosu na ostale, a ukupan broj tretmana iznosi 27.

BBD se upotrebljava za fitovanje kvadratnih polinoma, pa je model odzivne površine predstavljen jednačinom 8 (*del Castillo, 2007, Lazić, 2004*):

$$Y = b_i X_i + b_{ii} X_{ii}^2 + b_{ij} X_{ij} + b_0 \quad (8)$$

Gde je: Y – odzivna funkcija

X_i - procesni parametri

b_i - linearni koeficijenti

b_{ii} - kvadratni koeficijenti

b_{ij} - koeficijenti interakcije

b_0 – odsečak

Broj parametara koji se na osnovu dobijenih podataka iz eksperimenta mogu izračunati iznosi 15, prema jednačini 9 (*del Castillo, 2007*):

$$p = k + 1 \times (k + 2)/2 \quad (9)$$

Gde je: p - broj parametara polinoma drugog reda.

Ispitivani faktori ekstrudiranja (nezavisni parametri procesa) i njihovi nivoi prikazani su u tabeli 3.2.

Tabela 3.2 Vrednosti nivoa ispitivanih faktora ekstrudiranja

Faktor	Simbol	Nivoi ispitivanih faktora		
		-1 (nizak nivo)	0 (srednji nivo)	+1 (visok nivo)
Vlaga polaznog materijala (%)	X ₁	7	11,5	16,0
Brzina obrtanja pužnice (o/min)	X ₂	240	390	540
Kapacitet punjenja (kg/h)	X ₃	16	24	32
Površina otvora matrice (mm ²)	X ₄	19,8	39,6	59,4

Za statističku obradu podataka upotrebljen je program STATISITICA, version 10. Značajnost uticaja svakog od faktora kao i njihovih interakcija određivana je poređenjem t -vrednosti i p -vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini, dok je značajnost samog modela određena pomoću njegove F -vrednosti i p -vrednosti. Procenat ukupnih varijacija koje se mogu objasniti empirijskim modelom je opisan pomoću koeficijenta determinacije (R^2). Smatra se da je poklapanje eksperimentalnih podataka sa predloženim modelom dobro ukoliko R^2 prelazi 0,80 (Myers et al., 1995). Granična t -vrednost za primenjeni eksperimentalni dizajn iznosi 1,78, a F -vrednost 2,6169 (Lazić, 2004; NIST/SEMATECH 2012). Statistički značajnim su se smatrale vrednosti veće od graničnih. Površine odziva crtane su tako što su dva parametra održavana na konstantnoj vrednosti iz centra plana, dok su preostala dva parametra varirana.

Za optimizaciju parametara, odnosno faktora korišćena je modifikovana Harringtonova metoda poželjene (tražene) funkcije, a rađena je u softverskom paketu DESIGN-EXPERT 8.1. Relativna greška modela za svaki od odziva izračunata je preko jednačine:

$$\text{Relativna greška} = \frac{\Delta x}{x} \times 100 (\%) \quad (10)$$

Gde je: Δx - razlika između izračunate i izmerene vrednosti odziva

x - izmerena vrednost odziva

Za poređenje srednjih vrednosti merenih parametara u toku procesa skladištenja upotrebljen je Tuckey HSD test. Statistički značajnom razlikom između srednjih vrednosti posmatranih veličina smatrana je ona za koju je *p-vrednost* bila jednaka, ili manja od 0,05.

3.7 Skladištenje funkcionalnog hraniva pri kontrolisanim uslovima relativne vlažnosti vazduha i temperature; hemijske i mikrobiološke analize

Nakon proizvodnje ko-ekstrudata, pristupilo se ispitivanju njegove održivosti. U tu svrhu uzorci su skladišteni u klima komori proizvođača Binder (Tuttlingen, Nemačka) sa mogućnošću kontrolisanog podešavanja temperature, relativne vlažnosti i cirkulacije vazduha. Za praćenje održivosti proizvoda primenjen je modifikovan *Schaal-oven* test, koji se uobičajeno upotrebljava za ubrzano ispitivanje stabilnosti masti i ulja, kao i prehrambenih proizvoda koji ih u većoj količini sadrže (Nawar, 1998). Temperatura skladištenja je održavana na 63 ± 2 °C, a modifikacija metode sastoji se u podešavanju relativne vlažnosti vazduha na konstantnu vrednost od 40 %, što klasičnom metodom nije propisano. Ovolika vlažnost vazduha odabrana je na osnovu relativne vlažnosti koja je u trenutku postavljanja uzoraka u klima komoru izmerena u prostoriji pomoću digitalnog manometra proizvođača Cole-Palmer (USA). Cirkulacija vazduha podešena je na 100 %. Uzorci su smešteni u klima komoru u staklenkama zapremine 350 ml, napunjenim do polovine i poklopcem blago naslonjenim na ivice staklenke, kako bi se omogućio kontakt uzorka sa vazduhom.

U cilju ispitivanja uticaja antioksidanasa na oksidativnu stabilnost proizvoda, uzorcima su dodavani komercijalni preparati karvakrol, vitamin E i smeša ova dva antioksidansa. Pre dodatka antioksidanasa, ko-ekstrudat je samleven na laboratorijskom mlinu sa hlađenjem (Foss knifetec 1095, Denmark). Vitamin E je dodavan u količini od 135 mg/100 g ko-ekstrudata tako što je prvobitno pomešan sa manjom količinom samlevenog ko-ekstrudata, a zatim je ta smeša pomešana sa ostatkom materijala.

Karvakrol je dodavan u količini od 200 mg/100 g ko-ekstrudata u mešalici sa mlaznicama za dodavanje tečnosti, kapaciteta 6 dm³ (Forberg, Norveška). Dobijeni rezultati upoređeni su sa ispitivanjima kontrolnog uzorka koji nije sadržao dodatak. Za praćenje oksidativnih i hemijskih promena ko-ekstrudata, određivani su:

- peroksidni broj,
- kiselost
- promene u sastavu masnih kiselina uzoraka.

Kako je poznato da karvakrol pokazuje i izrazito antimikrobno dejstvo, praćene su i mikrobiološke promene na svim uzorcima tokom skladištenja pod navedenim uslovima. Sva ispitivanja izvedena su u tri ponavljanja.

Hladna ekstrakcija masne faze iz uzoraka izvedena je pomoću izo-oktana za dalje određivanje peroksidnog broja, odnosno pomoću smeše dietiletar/ etanol (95% vol) u odnosu 1:1, za dalje određivanje kiselosti masne faze. Kiselost masne faze ko-ekstrudata određena je prema napred već pomenutoj proceduri u skladu sa JUS E.K8.026/1991, a peroksidni broj kao pokazatelj stepena oksidacije ko-ekstrudata, po metodi SRPS ISO 3960:2001, tj. putem jodometrijske titracije (*Dimić et Turkulov*, 2000). Ispitivanje sastava masnih kiselina funkcionalnog hraniva tokom skladištenja izvedena je po već opisanoj proceduri. Za ova ispitivanja celokupan sadržaj uzorka ko-ekstrudata iz jedne staklenke (100 g) je promešan i prebačen u sterilnu vrećicu, inertizovan u struji azota i čuvan na temperaturi od -20°C do momenta izvođenja analiza.

Ispitivanje ukupnog broja mikroorganizama izvršeno je u skladu sa SRPS EN ISO 4833:2008, horizontalnom metodom za određivanje mikroorganizama – tehnika brojanja kolonija. Prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka ispitivano je prema SRPS EN ISO 6888-1:2009, horizontalnom metodom za određivanje koagulaza pozitivnih stafilocoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) – deo 1, tehnika upotrebom agara po berd Parkeru. Za utvrđivanje prisustva *Clostridium perfringens* primenjena je tehnika brojanja kolonija, prema SRPS EN ISO 7973:2008, a za detekciju *Salmonella spp.* upotrebljena je horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella spp.*, SRPS EN ISO 6579:2008. Ukupan broj kvasaca i plesni utvrđen je prema ISO 21527-2, primenom horizontalne metode za određivanje kvasaca i plesni – deo 2.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Hemijski i masnokiselinski sastav polaznih sirovina

Procesu ekstrudiranja prethodilo je ispitivanje hemijskog sastava sirovina. U tabeli 4.1 dat je hemijski i mineralni sastav lanenog semena upotrebljavanog u eksperimentu. Kao što se iz rezultata može videti, pored visokog sadržaja ulja, laneno seme sadrži i znatnu količinu proteina - 22,52 % (računato na suhu materiju), što je više nego kod semena suncokreta i uljane repice (*Sauvant et al.*, 2000). Takođe, sadrži manje sirovih vlakana (6,55 %) od ove dve uljarice. Ako se posmatra mineralni sastav, seme je bogato kalijumom (7006 mg/kg) i magnezijumom (1832,98 mg/kg). *Bhatty i Cherdkiatgumchai* (1990) čak smatraju da je unos od 100 g lanenog semena dnevno, dovoljan da čovekov organizam zadovolji svoje potrebe za ovim mineralima.

Tabela 4.1 Hemijski i mineralni sastav lanenog semena upotrebljenog u eksperimentima

	Sadržaj (% s.m.)	Standardna devijacija (SD)
Proteini	22,52	± 0,01
Pepeo	3,79	± 0,02
Sirova vlakna	6,55	± 0,01
Ulje	37,62	± 0,21
<i>Mineralni sastav</i>		
Kalcijum	0,40 %	± 0,02
Fosfor	0,58 %	± 0,09
Gvožđe	62,53 mg/kg	± 0,43
Magnezijum	1832,98 mg/kg	± 0,65
Mangan	20,99 mg/kg	± 0,23
Kalijum	7006 mg/kg	± 0,95
Cink	69,18 mg/kg	± 0,13

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja

Tabela 4.2 prikazuje hemijski sastav suncokretove sačme korišćene u proizvodnji funkcionalnog hraniva kao adsorbens lanenog ulja. Prema svim parametrima, od kojih je

naročito značajan sadržaj proteina (38,46 % na s.m., odnosno 36,32 % na ukupnu masu), ova suncokretova sačma spada u grupu sačme drugog kvaliteta (*Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, 2010*) i može se reći da ima relativno visok sadržaj proteina.

Tabela 4.2 Hemijski sastav suncokretove sačme upotrebene u eksperimentima

	Sadržaj (% s.m.)	Standardna devijacija (SD)
Proteini	38,46	± 0,01
Pepeo	6,65	± 0,01
Sirova vlakna	12,09	± 0,08
Ulje	1,98	± 0,01

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja

Pored osnovnog hemijskog, određen je i masnokiselinski sastav polaznih sirovina, što je prikazano u tabeli 4.3. Iz rezultata se vidi da je upotrebjeno laneno seme izuzetno bogato esencijalnom ALA, omega-3 (n-3) masnom kiselinom, sa preko 50 % zastupljenosti u ukupnim masnim kiselinama (50,31 %). Sa druge strane suncokretova sačma sadrži svega 0,3 % ove masne kiseline, dok je daleko zastupljenija linolna omega-6 (n-6) masna kiselina (63,15 %). Suncokretova sačma se u smešu za proizvodnju hraniva dodavala prvenstveno kao adsorbens ulja lanenog semena, budući da njen ukupan sadržaj ulja u suvoj materiji iznosi samo 1,98 %. Stoga suncokretova sačma zanemarljivo malo utiče na sastav masnih kiselina u funkcionalnom hranivu.

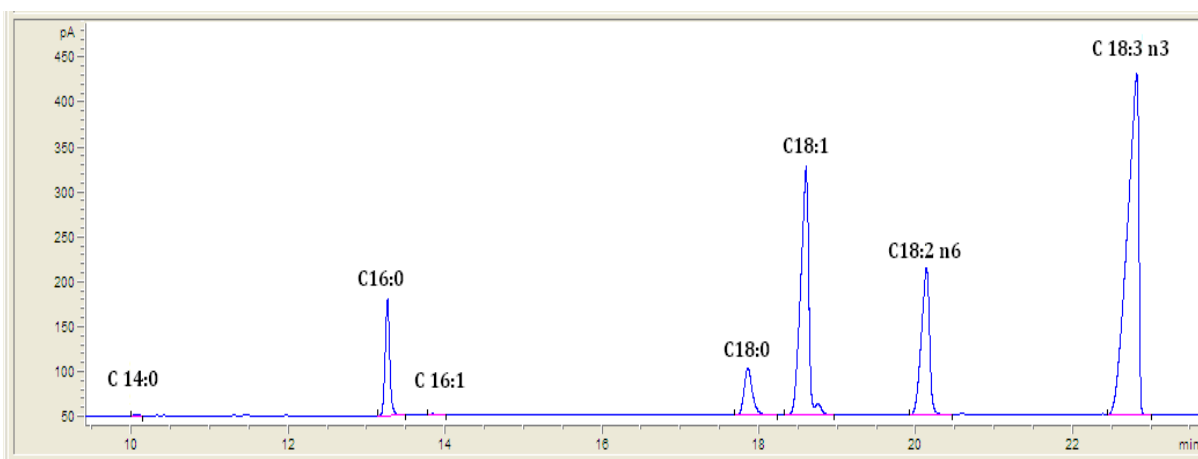
Laneno seme, uz visok sadržaj ALA, odlikuje i povoljan odnos n-6 i n-3 masnih kiselina, koji je iznosio 0,34. Smatra se da je savremena ljudska ishrana neuravnotežena, što podrazumeva unošenje nedovoljnih količina n-3 masnih kiselina (n-6/n-3 odnos iznosi između 20:1 i 15:1). Preporučena vrednost ovog odnosa mora biti snižena barem na nivo od 4:1 (*FAO, 2008; Scollan et al, 2006*).

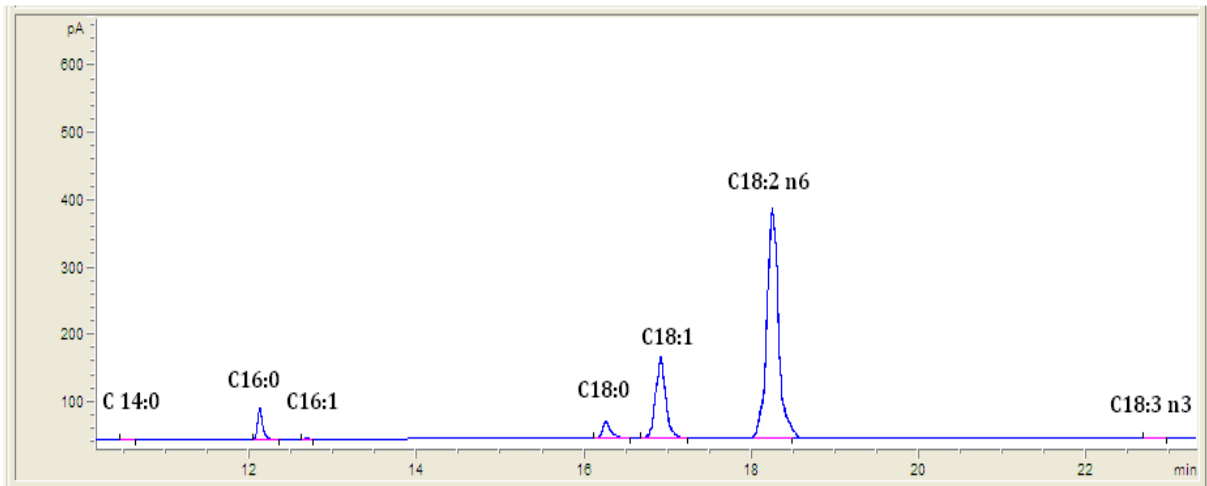
Tabela 4.3 Masnokiselinski sastav ulja ekstrahovanog iz lanenog semena i suncokretove sačme

Masna kiselina	Udeo masne kiseline (%) u ukupnim masnim kiselinama	
	Laneno seme	Suncokretova sačma
C14:0 (miristinska)	0,04 ± 0,03	0,2 ± 0,01
C16:0 (palmitinska)	5,30 ± 0,06	5,98 ± 0,03
C16:1 (palmitoleinska)	0,08 ± 0,01	0,4 ± 0,01
C18:0 (stearinska)	4,31 ± 0,02	4,28 ± 0,03
C18:1 n9 (oleinska)	23,02 ± 0,10	25,69 ± 0,09
C18:2 n6 (linolna)	16,94 ± 0,13	63,15 ± 0,11
C18:3 n3 (α -linolenska)	50,31 ± 0,11	0,3 ± 0,02
SFA	9,65	10,64
MUFA	23,10	26,09
PUFA	67,25	63,45
PUFA/SFA	6,97	5,96

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja \pm SD; SFA – zasićene MK, MUFA-mononezasićene MK, PUFA-polinezasićene MK

Na slikama 4.1 i 4.2 prikazani su gasni hromatogrami ekstrahovanog ulja iz lanenog semena i suncokretove sačme, gde se takođe jasno može videti razlika u njihovom masnokiselinskom sastavu. Na slici 4.1 daleko je najdominantniji poslednji pik, koji predstavlja odziv ALA (C18:3, n-3), dok na slici 4.2 najveću površinu zahvata pik linolne kiseline (C18:2, n-6).

**Slika 4.1** Gasni hromatogram sastava masnih kiselina lanenog semena



Slika 4.2 Gasni hromatogram sastava masnih kiselina suncokretove sačme

Analizama sastava masnih kiselina, utvrđeno je da je laneno seme pogodno za proizvodnju funkcionalnog hraniva sa povećanim sadržajem omega-3 masnih kiselina.

4.2 Uticaj variranih parametara procesa na sadržaj HCN i redukciju cijanogenih glikozida u dobijenom ko-ekstrudatu

Prisustvo cijanogenih glikozida, antinutritivnih materija lanenog semena, osnovni je razlog zbog čega se ono podvrgava nekom termičkom tretmanu pre upotrebe u ishrani životinja. Sadržaj cijanogenih glikozida se, kao što je već rečeno, određuje na osnovu sadržaja HCN u hranivu. U tabeli 4.4 prikazana je promena sadržaja HCN u ko-ekstrudatu u zavisnosti od parametara procesa čije su vrednosti varirane prema eksperimentalnom dizajnu. U tabeli 4.5 prikazani su koeficijenti regresione jednačine za sadržaj HCN u ekstrudiranom hranivu, kao rezultati fitovanja modelovanog odziva sa polinomom drugog reda (jednačina 14).

Tabela 4.4 Promena sadržaja HCN u ekstrudiranom hranivu u zavisnosti od primenjenih uslova ekstrudiranja

Uslovi ekstrudiranja				
Vlaga materijala (%)	Brzina obrtanja puža (o/min)	Kapacitet punjenja (kg/h)	Ukupna površina otvora matrice (mm ²)	Sadržaj HCN (mg/kg)
11,5	240	32	39,6	98,46
11,5	540	32	39,6	80,01
11,5	240	16	39,6	84,13
11,5	540	16	39,6	72,58
11,5	390	24	39,6	53,52
11,5	390	24	39,6	53,22
11,5	390	24	39,6	53,78
16	390	24	19,8	96,62
16	240	24	39,6	94,65
16	540	24	39,6	92,65
16	390	32	39,6	83,69
16	390	16	39,6	97,00
16	390	24	59,4	91,43
11,5	390	16	19,8	30,33
11,5	390	32	19,8	39,94
11,5	540	24	19,8	40,85
11,5	240	24	19,8	77,32
11,5	390	16	59,4	25,42
11,5	390	32	59,4	64,69
11,5	240	24	59,4	94,96
11,5	540	24	59,4	49,36
7	390	24	19,8	94,59
7	240	24	39,6	126,00
7	540	24	39,6	96,61
7	390	32	39,6	97,10
7	390	16	39,6	50,99
7	390	24	59,4	96,04

U regresionoj jednačini koja opisuje sadržaj HCN u ko-ekstrudatu (jednačina 11), najveću značajnost ($p = 0,0002$) pokazuje kvadratni uticaj vlage materijala (b_{11}), a nakon njega linearni član istog parametra (b_1), za koji je $p = 0,011$. Ovakav rezultat je očekivan i u potpunosti se slaže sa podacima prikazanim u literaturi. Koliko je prisustvo vlage značajno za uklanjanje cijanogenih glikozida iz materijala, govori i činjenica da se prema

pojedinih istraživanjima, suvo zagrevanje lanenog semena ne preporučuje, jer se detoksifikacija zasniva prvenstveno na deaktivaciji β -glukozidaze, što ne podrazumeva trajno uklanjanje HCN iz materijala (Majak et al., 1990).

$$Y_1 = 278,99 - 32,91X_1 - 0,73X_2 + 7,79X_3 + 0,52X_4 + 0,01X_1X_2 - 0,41X_1X_3 - 0,01X_1X_4 - 0,01X_2X_3 - 0,001X_2X_4 + 0,05X_3X_4 + 1,71X_{11} + 0,001X_{22} - 0,03X_{33} - 0,01X_{44} \quad (11)$$

Gde je: Y_1 – sadržaj HCN u ko-ekstrudatu (mg/kg)

X_1 - vlaga polaznog materijala (%)

X_2 - brzina obrtanja puža ekstrudera (o/min)

X_3 - kapacitet punjenja ekstrudera(kg/h)

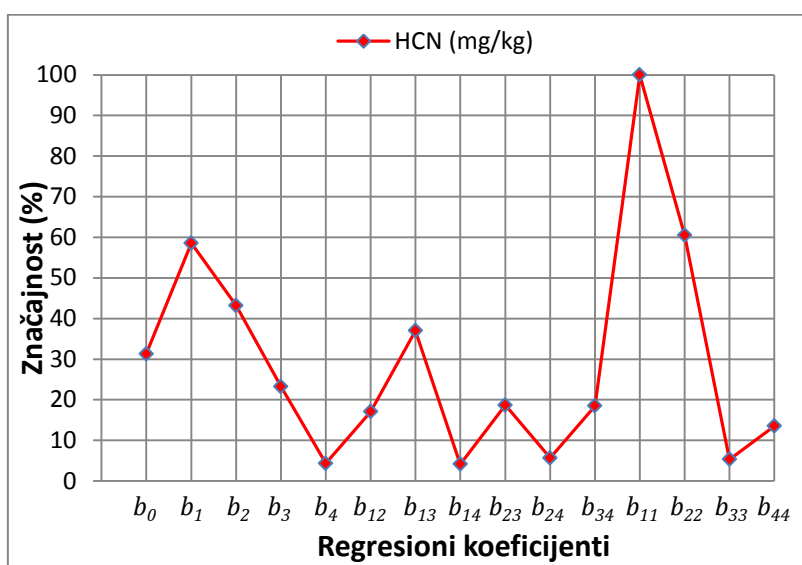
X_4 - ukupna površina otvora na matrici (mm²)

Tabela 4.5 Koeficijenti regresione jednačine za modelovani odziv sadržaja HCN u ko-ekstrudatu

Koeficijenti	Vrednost	<i>p</i> - vrednost	<i>t</i> - vrednost
Odsečak			
b_0	278,9902	0,140051	1,58018
Linearni			
b_1	-32,9112	0,011968	-2,95785
b_2	-0,7329	0,049626	-2,18301
b_3	7,7966	0,262877	1,17476
b_4	0,5182	0,830027	0,21940
Interakcije			
b_{12}	0,0101	0,405832	0,86153
b_{13}	-0,4126	0,086215	-1,86901
b_{14}	-0,0186	0,838062	-0,20886
b_{23}	-0,0062	0,363972	-0,94363
b_{24}	-0,0008	0,778876	-0,28718
b_{34}	0,0468	0,369247	0,93293
Kvadratni			
b_{11}	1,7173	0,000283	5,05220
b_{22}	0,0009	0,009928	3,05840
b_{33}	-0,0290	0,792309	-0,26925
b_{44}	-0,0120	0,507505	-0,68312

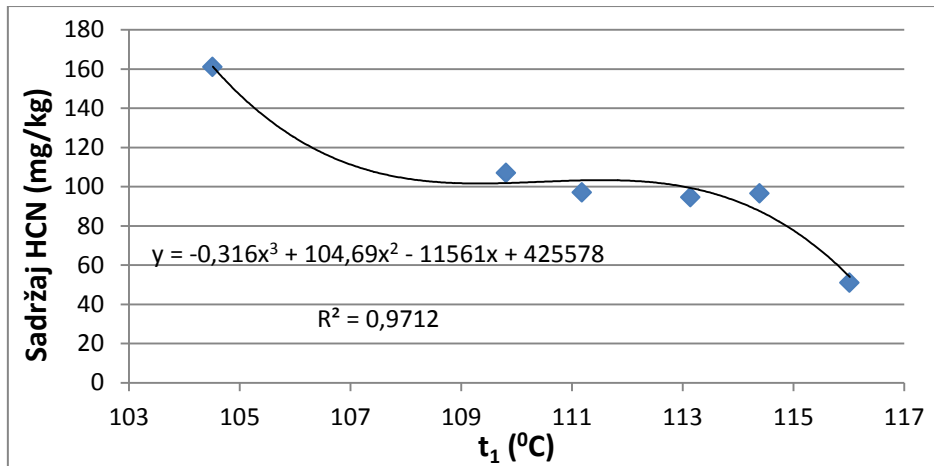
U cilju lakšeg poređenja značajnosti pojedinih koeficijenata u regresionoj jednačini, na slici 4.3 prikazani su udeli (frakcije) t -vrednosti svakog pojedinačnog koeficijenta u najvećoj t -vrednosti u posmatranoj korelaciji.

Veliku značajnost ($p = 0,009$) pokazao je i kvadratni uticaj brzine obrtanja puža ekstrudera (b_{22}), kao i linearni uticaj (b_2) ovog parameta ($p = 0,04$). Za interakciju vlage materijala i kapaciteta punjenja (b_{13}) može se reći da pokazuje tendenciju značajnosti, jer je t -vrednost ovog koeficijenta (1,87) veća od granične (1,78) (Lazić, 2004), ali p -vrednost nije manja od 0,05 (Tabela 4.5 i slika 4.3).

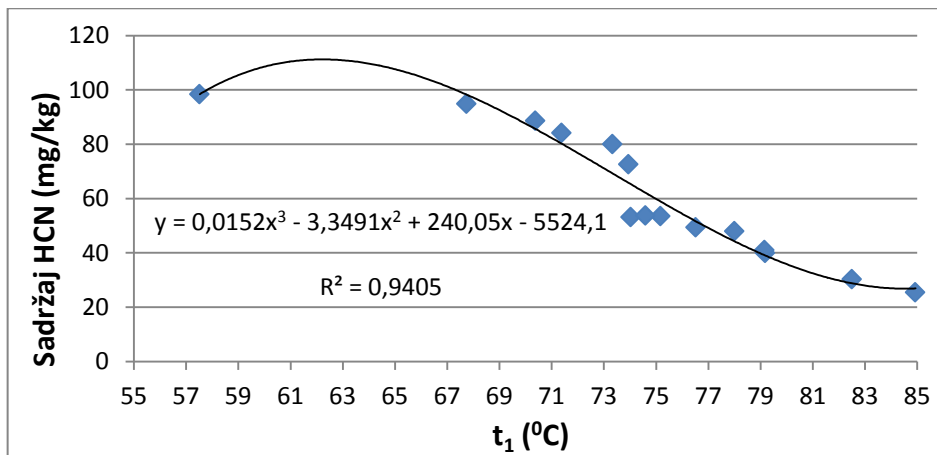


Slika 4.3 Značajnost regresionih koeficijenata u korelaciji sadržaja HCN u ko-ekstrudatu tokom ekstrudiranja.

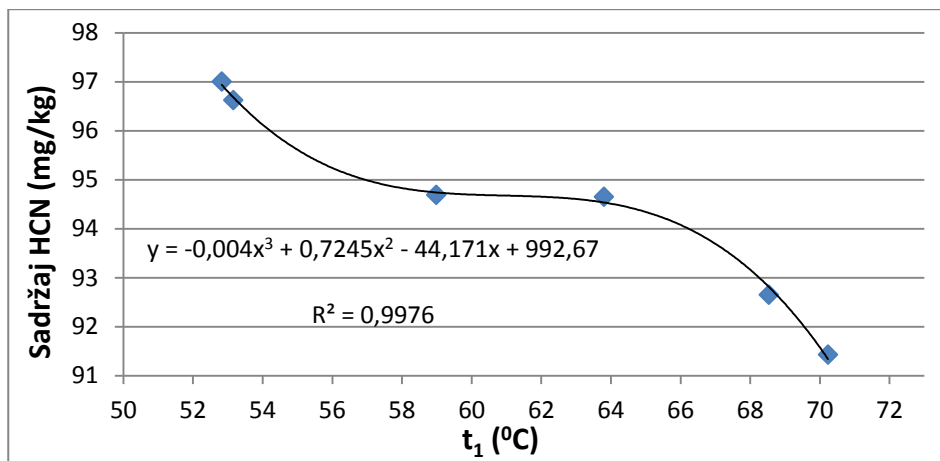
Slike 4.4a, 4.4b i 4.4c prikazuju promene sadržaja HCN u ko-ekstrudatu pri konstantnim vrednostima polazne vlage materijala. Kao što se sa sva tri grafika može videti, pri konstantnim vrednostima polazne vlage materijala, sa povećanjem temperature u cevi ekstrudera, dolazi da redukcije cijanogenih glikozida, što se registruje smanjenjem sadržaja HCN u hranivu.



(a)



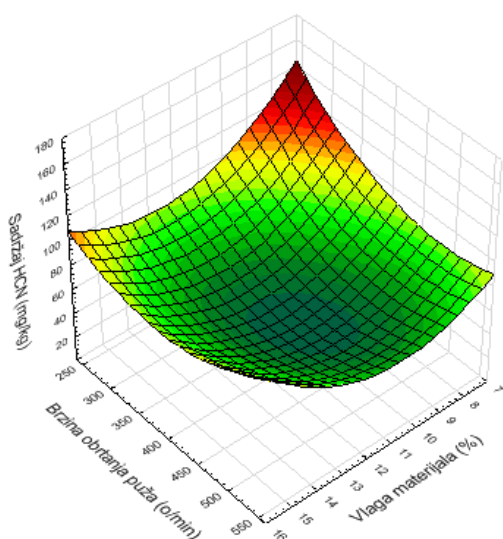
(b)



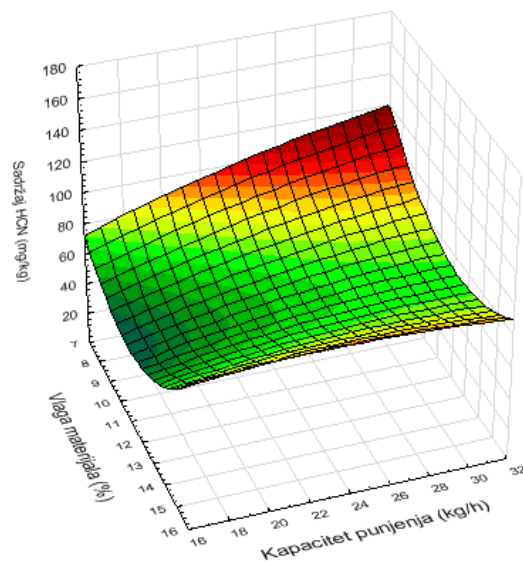
(c)

Slika 4.4 Promene sadržaja HCN u ko-ekstrudatu u zavisnosti od postignute temperature ekstrudiranja pri konstantnim vrednostima polazne vlage materijala od 7 % (a), 11,5 % (b) i 16 % (c)

Na slikama 4.5, 4.6 i 4.7 prikazani su uticaji variranih procesnih parametara na sadržaj HCN u ko-ekstrudatu. Sa slike 4.5a, jasno se primećuje da je sadržaj HCN u ekstrudiranom materijalu bio najviši (126 mg/kg) pri najnižem sadržaju vlage polaznog materijala (7 %), iako je brzina obrtanja puža takođe niska bila što je uslovljavalo i nižu temperaturu, pritisak i sile smicanja i frikcije. Pri niskim brzinama obrtanja puža material se duže zadržavao u cevi ekstrudera, a postignute temperature bile su dovoljne za ubrzavanje reakcije hidrolize cijanogenih glikozida. Međutim, može se zaključiti da je uticaj vlage materijala na sadržaj cijanogenih glikozida izraženiji od uticaja brzine obrtanja puža. Povišena temperatura, a naročito vlaga podstiču i ubrzavaju reakciju hidrolize cijanogenih glikozida iz kojih se oslobađa HCN, koja, opet, pod dejstvom povišene temperature isparava iz tretiranog materijala (Feng et al., 2003). Zbog toga nije dovoljno obezbediti samo zagrevanje materijala kako bi se laneno seme detoksifikovalo, već je od izuzetnog značaja da u supstratu bude prisutna i odgovarajuća količina vode. S obzirom da su u ekstruderu tokom tretiranja materijala postignute temperature od preko 115 °C, došlo je do isparavanja HCN i njenog nepovratnog uklanjanja iz ko-ekstrudata. Na taj način sprečena je ponovna sinteza cijanogenih glikozida nakon ekstrudiranja.



(a)



(b)

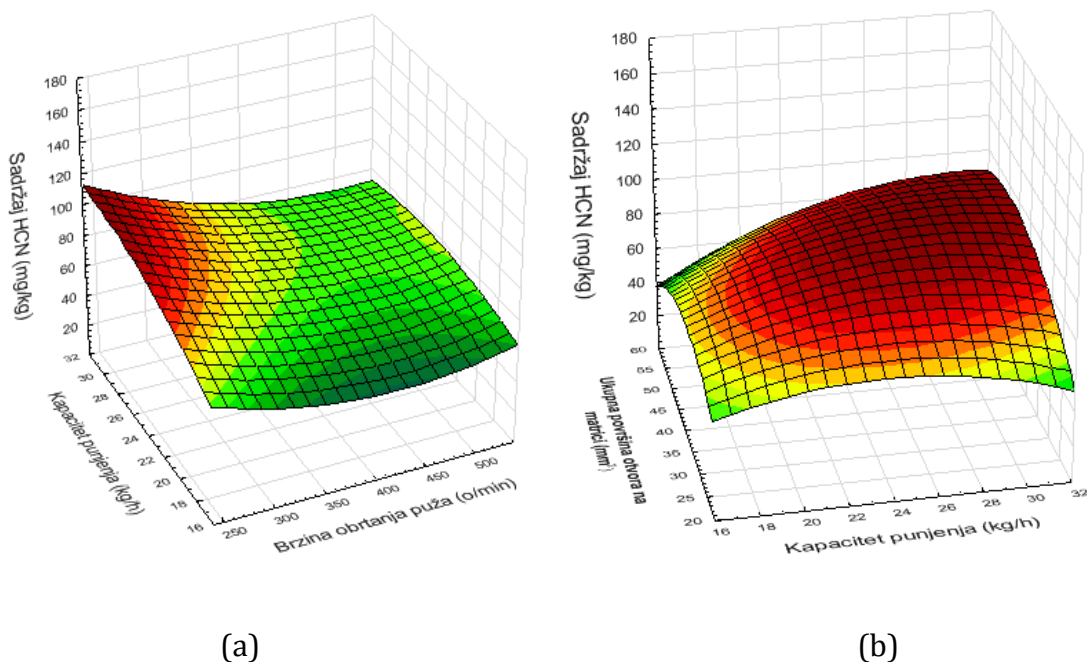
Slika 4.5 Uticaj vlage materijala i brzine obrtanja puža (a), odnosno kapaciteta punjenja ekstrudera (b) na sadržaj HCN u ko-ekstrudatu

Na istom grafiku vidi se da sa daljim povećanjem vlage od 11,5 % do 16 % sadržaj HCN u tretiranom materijalu počinje vrlo blago da raste, pri konstantnoj brzini obrtanja puža, uz konstantne centralne vrednosti kapaciteta punjenja i površine otvora na matrici. Povećana vlaga materijala, nakon određenog nivoa, utiče na bolju protočnost smeše kroz cev ekstrudera, jer se smanjuje viskozitet materijala usled čega se masa, pri jednakoj brzini obrtanja puža kraće zadržava u ekstruderu. Samim tim je i dejstvo enzima, kao i drugih uticaja na materijal kraće, pa je redukcija cijanogenih glikozida nešto slabijeg intenziteta.

Slika 4.5b prikazuje uticaj vlage materijala i kapaciteta punjenja ekstrudera na sadržaj HCN, pri konstantnim centralnim vrednostima brzine obrtanja puža i površine otvora na matrici. Najveći sadržaj HCN zapaža se pri uslovima najmanje vlage materijala i najvećeg kapaciteta punjenja ekstrudera. Uticaj vlage na hidrolizu cijanogenih glikozida je već ranije objašnjen. Visok kapacitet punjenja pri konstantnoj brzini obrtanja puža uzrokovao je brži prolazak materijala kroz cev ekstrudera i kratkotrajno izlaganje termičkom tretmanu i dejstvu sila u ekstruderu, zbog čega je i redukcija HCN slabija. Drugo objašnjenje za ovakav uticaj kapaciteta punjenja na sadržaj HCN dato je u radu Wu i saradnika, prema kojima se sa povećanjem kapaciteta punjenja, povećava i opterećenje puža ekstrudera materijalom u jednakom vremenskom intervalu. Na taj način se smanjuje mešanje materijala u cevi ekstrudera, pa se ostvaruje lošiji kontakt između cijanogenih glikozida i β -gulozidaze koja se prirodno nalazi u semenu lana. Aktivnost enzima je u tom slučaju manjeg intenziteta, jer nema kontakta sa supstratom, pa je i oslobađanje HCN slabije izraženo (Wu et al., 2008).

Na Slici 4.6 a vidi se da je sadržaj HCN u ko-ekstrudatu najmanji pri najnižim vrednostima kapaciteta punjenja ekstrudera i središnjim vrednostima brzine obrtanja puža ekstrudera, uz konstantne središnje vrednosti preostala dva parametra. U ovakvim uslovima, ispitivani parametri su usklađeni tako da se ostvaruje dovoljna temperatura u cevi ekstrudera za postizanje redukcije cijanogenih glikozida, uz istovremeno dovoljno dugo zadržavanje materijala u ekstruderu i mogućnost reakcije između enzima i supstrata. Pri povećanju brzine obrtanja puža do vrednosti od oko 415 o/min, smanjenje sadržaja HCN je intenzivnije, usled pojačanog mešanja materijala, što rezultuje boljim kontaktom cijanogenih glikozida sa β -glukozidazom, kako je objašnjeno u radu Wu et al.,

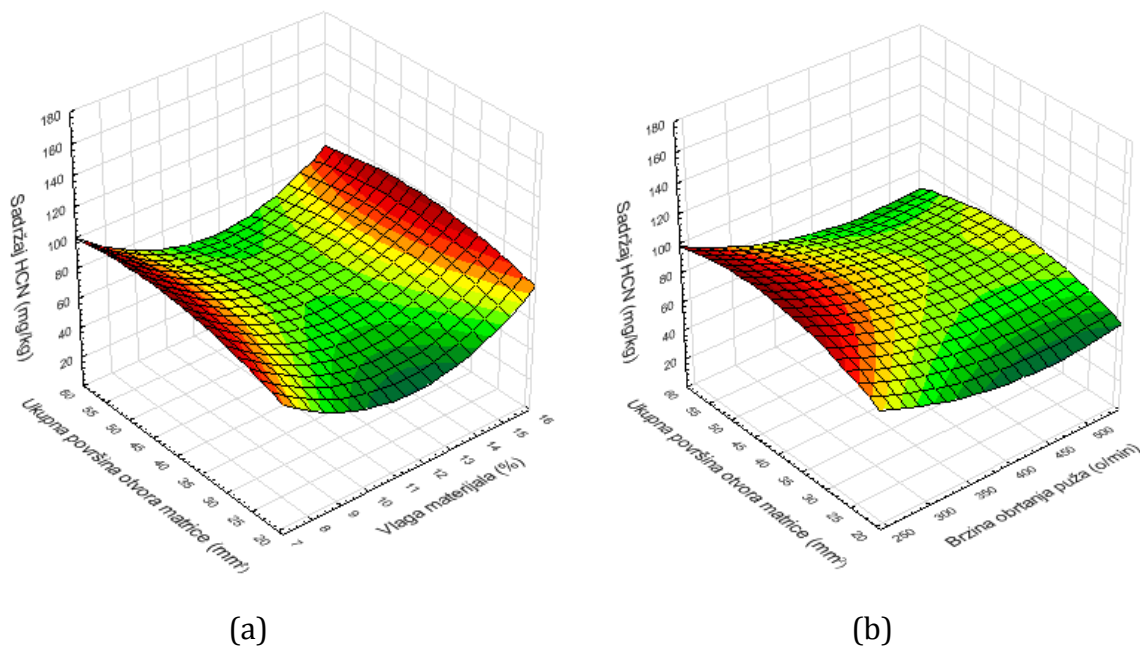
2008. Daljim povećavanjem brzine obrtanja puža, materijal se nedovoljno dugo zadržava u ekstruderu i redukcija HCN blago opada.



Slika 4.6 Uticaj kapaciteta punjenja i brzine obrtanja puža (a), odnosno ukupne površine otvora na matrici (b) na sadržaj HCN u ko-ekstrudatu

Na Slici 4.6b primećuje se da je najveći sadržaj HCN u ko-estrudatu, pri fiksiranim središnjim vrednostima vlage materijala i brzine obrtanja puža, izmeren pri uslovima najveće ukupne površine otvora na matrici i najvećeg kapaciteta punjenja, uz konstantne središnje vrednosti preostala dva parametra u oba slučaja zbog brzog prolaska materijala kroz cev ekstrudera i nedovoljno dugog izlaganja procesu ekstrudiranja.

Slike 4.7a i b opisuju prvenstveno uticaj ukupne površine otvora na matrici na sadržaj HCN u ko-ekstrudatu, uz konstantne središnje vrednosti preostala dva nezavisno promenljiva parametra ekstrudiranja. Kako se sa oba grafika može videti, uticaj ukupne površine otvora na matrici slabije je izražen od uticaja vlage materijala i brzine obrtanja puža ekstrudera, jer se pri konstantnim vrednostima ova dva parametra, sadržaj HCN neznatno promenio. Zaključak potvrđuju i *p*- odnosno *t*-vrednosti pomenutog faktora iz tabele 4.5 na osnovu kojih se može uočiti slaba značajnost i linearnog i kvadratnog uticaja ukupne površine otvora na matrici na sadržaj HCN u ekstrudiranom hranivu.



Slika 4.7 Uticaj ukupne površine otvora na matrici i vlage materijala (a), odnosno brzine obrtanja puža (b) na sadržaj HCN u ko-ekstrudatu.

Maksimalan stepen uklanjanja HCN iznosio je 86,56 % i tada je prisutna količina HCN u ko-ekstrudatu smanjena sa početnih 189,12 mg/kg na 25,42 mg/kg, a minimalan 33,38 %, (količina HCN u ko-ekstrudatu bila je 126 mg/kg).

4.3 Uticaj variranih parametara procesa na masnokiselinski sastav dobijenog ko-ekstrudata i sadržaj esencijalne α -linolenske kiseline

Cilj proizvodnje funkcionalnog hraniva bio je da se poboljša masnokiselinski sastav hrane za životinje, pre svega kroz povećan udeo esencijalne omega-3 kiseline, ALA. Sadržaj ulja polazne smeše iznosio je 21,77 % s.m., a sastav masnih kiselina neekstrudirane smeše lanenog semena i suncokretove sačme dat je u tabeli 4.6.

Ako se uporede tabele 4.3 i 4.6 vidi se da je masnokiselinski sastav polazne smeše gotovo isti kao i masnokiselinski sastav lanenog semena, usled vrlo male količine prisutnog ulja u suncokretovoj sačmi.

Tabela 4.6 Masnokiselinski sastav polazne smeše

Masna kiselina	Udeo masne kiseline (%) u ukupnim masnim kiselinama
C 14:0	0,04 ± 0,01
C16:0	5,70 ± 0,04
C16:1	0,07 ± 0,01
C18:0	4,30 ± 0,02
C18:1 <i>n</i> 9	24,11 ± 0,11
C18:2 <i>n</i> 6	16,66 ± 0,08
C18:3 <i>n</i> 3	49,12 ± 0,12
SFA	10,04
MUFA	24,18
PUFA	65,78
PUFA/SFA	6,65

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja

Polinezasićene masne kiseline, kakva je ALA sa tri dvostruke veze, veoma su podložne dejstvu slobodnih radikala, koji reaguju sa njihovim dvostrukim vezama (*Schnitzer et al., 2007*). Zbog toga je bilo veoma važno ispitati na koji način proces ekstrudiranja utiče na promenu sadržaja ALA u proizvedenom ko-ekstrudatu. U tabeli 4.7 prikazan je kompletan masnokiselinski sastav ko-ekstrudata u svim probama ekstrudiranja.

Tabela 4.7 Masnokiselinski sastav ko-ekstrudata dobijenog pod različitim uslovima ekstrudiranja

Uslovi ekstrudiranja				Sastav masnih kiselina (% u ukupnim masnim kiselinama)							
Vlaga materijala (%)	Brzina obrtanja puža (o/min)	Kapacitet punjenja (kg/h)	Ukupna površina otvora matrice (mm ²)	C 14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1n9	C18:2n6	C18:3n3	
11,5	240	32	39,6	0,04	5,97	0,09	4,92	25,87	15,33	47,78	
11,5	540	32	39,6	0,07	5,71	0,09	4,64	25,26	15,12	49,10	
11,5	540	16	39,6	0,05	5,91	0,09	4,99	25,78	15,21	47,97	
11,5	240	16	39,6	0,04	5,91	0,08	4,90	25,84	15,28	47,96	
11,5	390	24	39,6	0,05	5,86	0,09	4,70	25,35	15,17	48,78	
11,5	390	24	39,6	0,05	5,86	0,10	4,76	25,35	15,17	48,71	
11,5	390	24	39,6	0,05	5,86	0,10	4,67	25,39	15,17	48,76	
16	390	24	19,8	0,08	5,70	0,08	4,73	26,06	15,27	48,08	
16	240	24	39,6	0,06	5,95	0,10	4,79	27,23	15,19	46,68	
16	540	24	39,6	0,09	5,48	0,40	5,01	27,30	14,96	46,76	
16	390	32	39,6	0,06	5,77	0,06	4,92	26,09	15,14	47,97	
16	390	16	39,6	0,05	5,80	0,06	5,00	26,20	15,08	47,81	
16	390	24	59,4	0,04	5,66	0,06	5,01	26,05	15,23	47,94	
11,5	390	16	19,8	0,04	5,78	0,08	4,86	25,88	15,22	48,14	
11,5	390	32	19,8	0,04	5,97	0,09	4,86	25,75	15,24	48,06	
11,5	540	24	19,8	0,05	6,12	0,11	5,12	25,81	15,34	47,45	
11,5	240	24	19,8	0,04	6,02	0,08	4,90	25,86	15,34	47,75	
11,5	390	16	59,4	0,05	5,95	0,08	4,87	25,52	15,14	48,38	
11,5	390	32	59,4	0,04	5,93	0,08	4,89	25,49	15,13	48,43	
11,5	240	24	59,4	0,05	6,03	0,09	4,88	25,96	15,20	47,79	
11,5	540	24	59,4	0,05	6,05	0,09	4,84	25,31	15,09	48,58	
7	390	24	19,8	0,13	6,33	0,21	4,55	27,25	15,21	46,32	
7	240	24	39,6	0,04	5,95	0,07	4,88	26,88	15,07	47,07	
7	540	24	39,6	0,03	6,36	0,18	5,30	27,70	15,04	45,39	
7	390	32	39,6	0,05	5,84	0,06	4,76	25,91	15,29	48,09	
7	390	16	39,6	0,08	5,95	0,08	4,89	26,02	15,23	47,75	
7	390	24	59,4	0,08	5,84	0,14	4,78	25,48	15,48	48,20	
Polazna smeša				0,04	5,70	0,07	4,30	24,11	16,66	49,12	
Srednja standardna devijacija za pojedinačne masne kiseline				± 0,02	± 0,14	± 0,01	± 0,11	± 0,21	± 0,13	± 0,28	

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja za svaki uzorak

Tabela 4.8 daje pregled koeficijenata regresione jednačine 12 za odziv sadržaja ALA (u ukupnim masnim kiselinama) u ekstrudiranom materijalu.

$$Y_2 = 38,51 + 1,29X_1 + 0,01X_2 - 0,14X_3 + 0,08X_4 + 0,001X_1X_2 - 0,001X_1X_3 - 0,006X_4 + 0,0001X_2X_3 + 0,001X_3X_4 - 0,05X_{11} + 0,001X_{33} - 0,001X_{44} \quad (12)$$

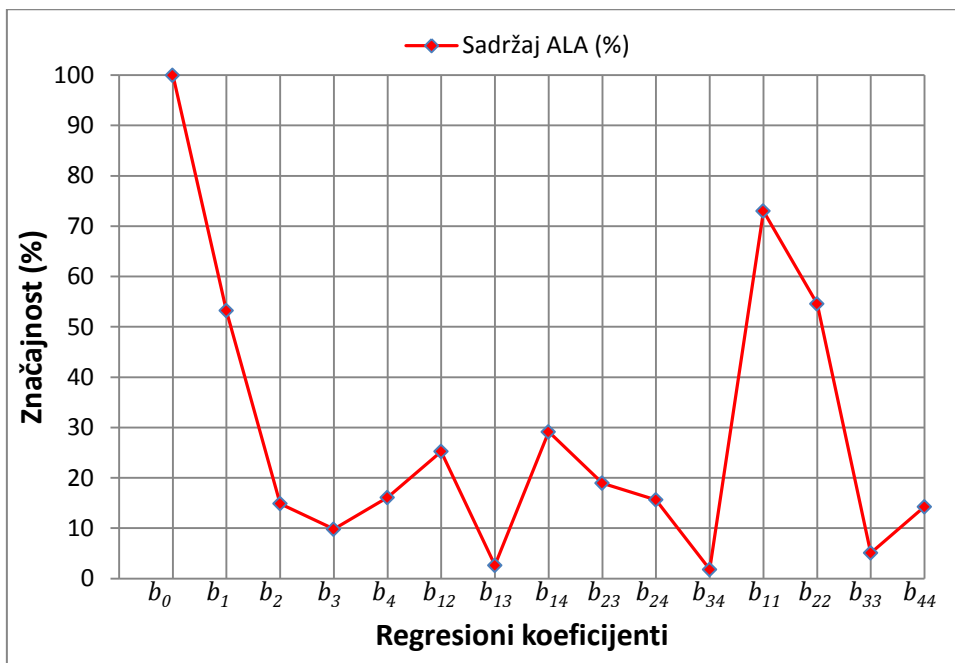
Gde je: Y_2 – sadržaj ALA u ekstrudiranom materijalu (%)

Tabela 4.8 Koeficijenti regresione jednačine za modelovani odziv sadržaja α -linolenske kiseline u ukupnim masnim kiselinama

Koeficijenti	Vrednost	p – vrednost	t – vrednost
Odsečak			
b_0	38,50942	0,000026	6,58730
Linearni			
b_1	1,29162	0,004335	3,50584
b_2	0,01089	0,346513	0,97983
b_3	-0,14213	0,529944	-0,64679
b_4	0,08303	0,309304	1,06163
Interakcije			
b_{12}	0,00065	0,122461	1,66166
b_{13}	-0,00126	0,865976	-0,17243
b_{14}	-0,00567	0,079011	-1,91949
b_{23}	0,00027	0,235864	1,24792
b_{24}	0,00009	0,323900	1,02872
b_{34}	0,00020	0,908003	0,11802
Kvadratni			
b_{11}	-0,05411	0,000428	-4,80765
b_{22}	-0,00004	0,003685	-3,59418
b_{33}	0,00119	0,744419	0,33363
b_{44}	-0,00055	0,365852	-0,93980

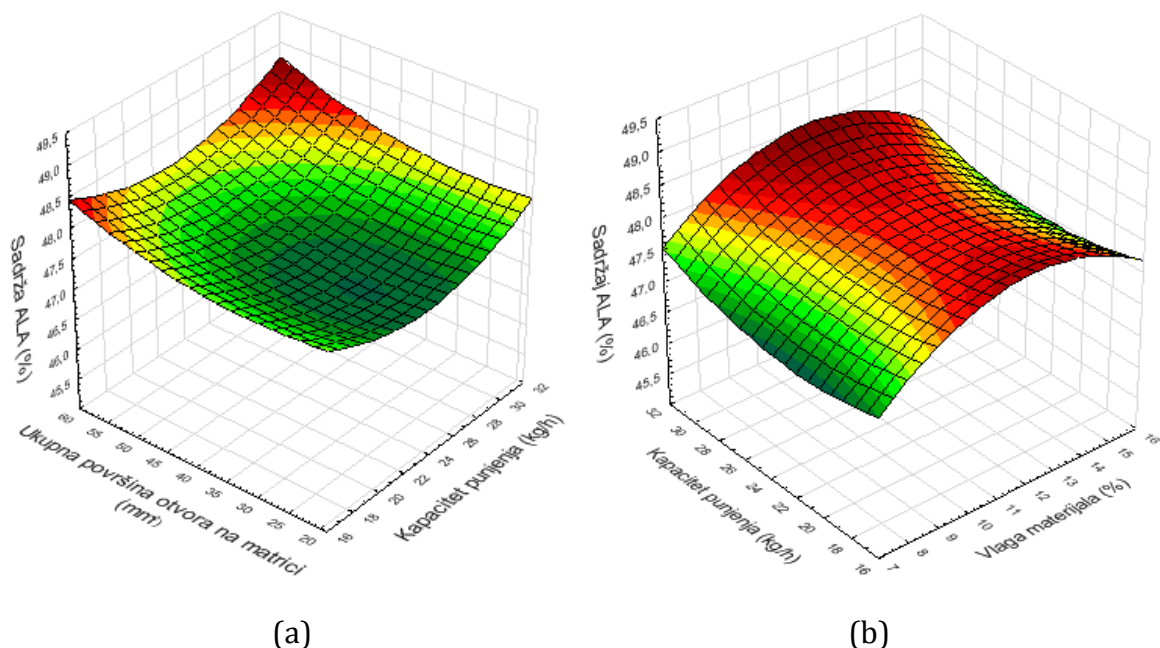
U regresionoj jednačini (jednačina 12) koja opisuje promenu sadržaja ALA tokom procesa ekstrudiranja, najznačajniji je slobodan član. To znači da i pored promena koje se javljaju u sadržaju ALA, njene vrednosti ne odstupaju drastično jedne od drugih. Najveći, kako kvadratni ($p = 0,0004$), tako i linearni uticaj ($p = 0,004$) na sadržaj ALA u

ko-ekstrudatu imala je vlaga materijala. Veliku značajnost ($p = 0,003$) uticaja pokazao je kvadratni član brzine obrtanja puža ekstrudera, a tendenciju značajnosti imala je interakcija između vlage materijala i ukupne površine otvora na matrici ($p = 0,07$, $t = -1,919$). Slika 4.8 grafički prikazuje značajnost pojedinih koeficijenata jednačine.



Slika 4.8 Značajnost regresionih koeficijenata u korelaciji sadržaja α -linolenske kiseline u ukupni masnim kiselinama ko-ekstrudata tokom ekstrudiranja

Na slikama 4.9, 4.10 i 4.11 prikazani su uticaji parametara ekstrudiranja na promenu sadržaja ALA u ko-ekstrudatu. Slika 4.9 objašnjava promenu posmatranog odziva u zavisnosti od kapaciteta punjenja i ukupne površine otvora na matrici (4.9a), odnosno vlage materijala (4.9b), pri konstantnim centralnim vrednostima preostala dva nezavisna parametra ekstrudiranja. Najveći sadržaj ALA izmeren je primenom matrice sa najvećom ukupnom površinom otvora, bez obzira na kapacitet punjenja ekstrudera. Ovo se može objasniti bržim prolaskom materijala kroz cev ekstrudera, tako da je i dejstvo povišene temperature, pritiska i sile frikcije kraće trajalo (oko 30 s), pa nije došlo do oštećenja nezasićenih masnih kiselina i njihove degradacije.

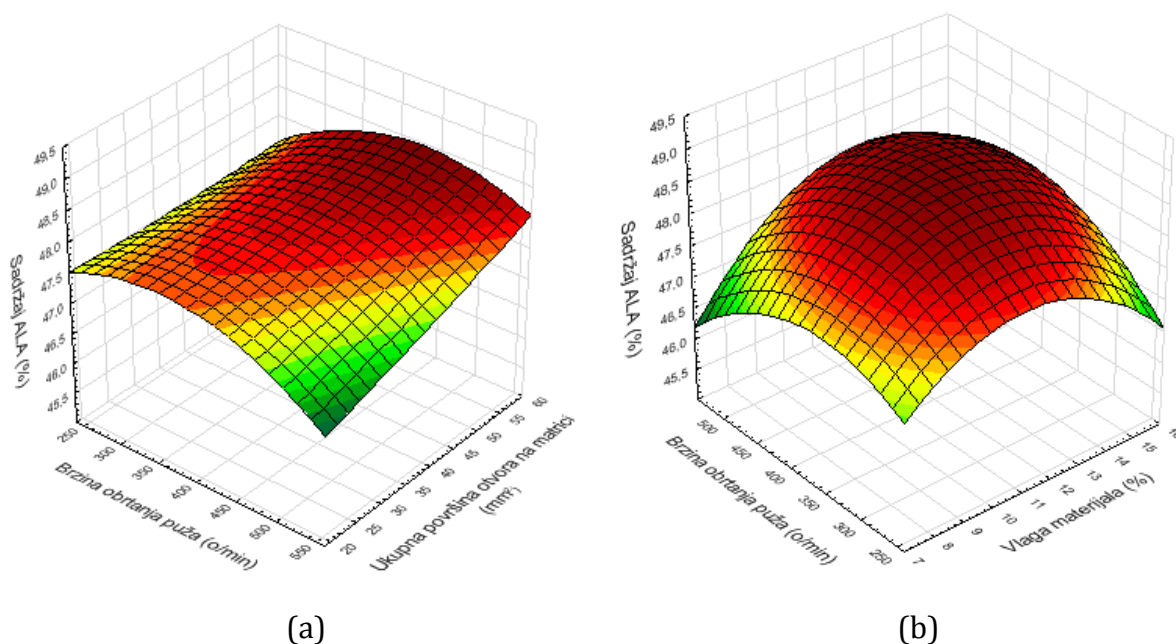


Slika 4.9 Uticaj kapaciteta punjenja ekstrudera i ukupne površine otvora na matrici (a) odnosno vlage polaznog materijala (b) na sadržaj α -linolenske kiseline u ukupnim masnim kiselinama dobijenog ko-ekstrudata

Takođe se može primetiti da je promena sadržaja posmatrane kiseline sa promenom kapaciteta punjenja bila neznatna, bez obzira na ukupnu površinu otvora na matrici (4.9a). Prema ovome, kapacitet punjenja ekstrudera nema značajan uticaj na promenu sadržaja ALA, što potvrđuju visoke p - vrednosti njegovog linearnog i kvadratnog člana u jednačini ($p = 0,52$ i $p = 0,74$, redom), kao i niske t - vrednosti ($t = -0,64$ i $t = 0,33$). Isti zaključak može se izvesti i ako se posmatra grafik 4.9b, gde se opet vide minimalne promene u sadržaju posmatrane masne kiseline sa promenom kapaciteta punjenja, a pri konstantnoj vlazi materijala.

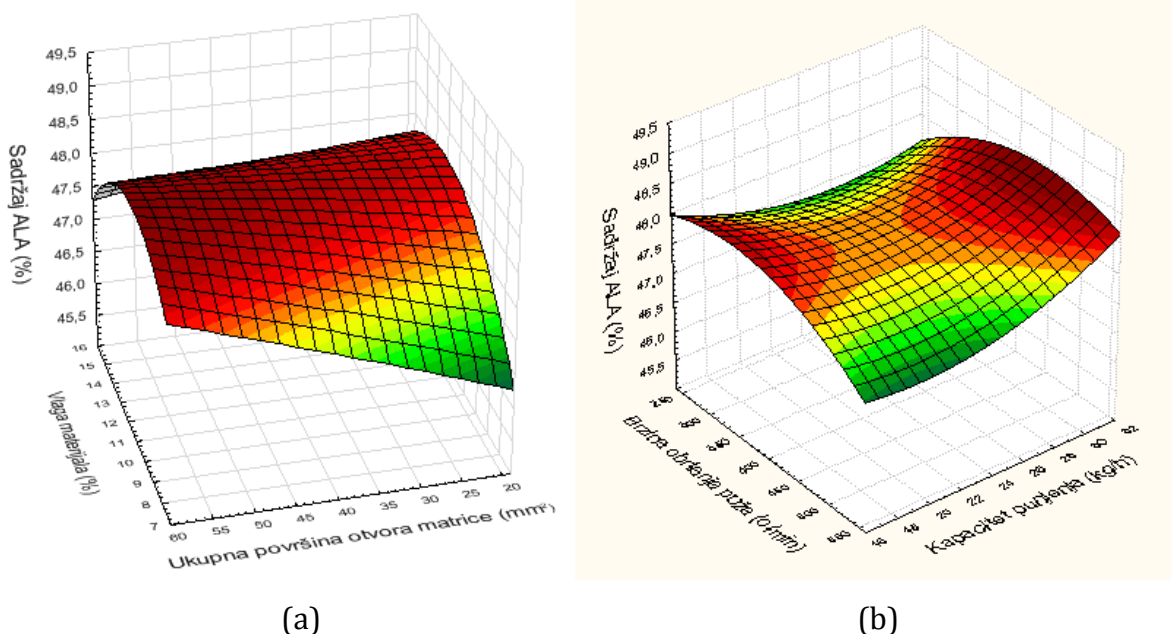
Sa slike 4.10a vidi se da je najniži sadržaj ALA izmeren pri najmanjoj ukupnoj površini otvora matrice i najvećim vrednostima brzine obrtanja puža, kada su druga dva parametra ekstrudiranja fiksirana na svojim centralnim vrednostima. Kao što je ranije već rečeno, pri najvećim brzinama obrtanja puža, sile smicanja, trenja i frikcije, kao i pritisak i temperatura su najintenzivniji, što sve utiče na raskidanje dvostrukih veza i degradaciju nestabilne i reaktivne ALA. Mala površina otvora na matrici uticala je na nakupljanje materijala u cevi ekstrudera, zbog otežanog prolaska kroz matricu. Ovo

nakupljanje takođe izaziva povećanje pritiska i temperature u cevi ekstrudera, a posredno i smanjenje sadržaja ALA.



Slika 4.10 Uticaj brzine obrtanja puža i ukupne površine otvora na matrici (a), odnosno vlage polaznog materijala (b) na sadržaj α -linolenske kiseline u ukupnim masnim kiselinama dobijenog ko-ekstrudata

Slika 4.10b prikazuje uticaj brzine obrtanja puža i vlage na sadržaj ALA u ko-ekstrudatu, pri konstantnim središnjim vrednostima kapaciteta punjenja ekstrudera i ukupne površine otvora na matrici. Sa grafika se jasno vidi da su maksimalne vrednosti ALA izmerene pri srednjim vrednostima brzine obrtanja puža i vlage materijala. Pri minimalnim, odnosno maksimalnim vrednostima parametara ekstrudiranja, došlo je do razlaganja ALA, zbog ekstremnih uslova ekstrudiranja i prevelike vlage materijala koja takođe narušava masnokiselinsku strukturu usled pojačanog dejstva enzima (16 %).



Slika 4.11 Uticaj ukupne površine otvora matrice i vlage polaznog materijala (a) odnosno kapaciteta punjenja ekstrudera i brzine obrtanja puža (b) na sadržaj ALA u ukupnim masnim kiselinama dobijenog ko-ekstrudata

Ukoliko se posmatra slika 4.11a, vidi se da je degradacija ALA (najmanji izmereni sadržaj) pri konstantnim središnjim uslovima brzine obrtanja puža i kapaciteta punjenja ekstrudera, najizraženija pri najmanjoj ukupnoj površini otvora matrice i najnižoj vlazi materijala. Kao i ranije, ovo se može objasniti povišenim temperaturama usled niske vlage i povišenim pritiskom, zbog težeg prolaska materijala kroz otvore na matrici. Na slici 4.11b uočava se da je će se najniži sadržaj ALA postići pri najvećim vrednostima brzine obrtanja puža i pri vrednosti kapaciteta punjenja od oko 20 kg/h, ukoliko se preostala dva parametra ekstrudiranja odžavaju konstantnim na svojim središnjim nivoima. Najviši sadržaj ALA izmeren je pri središnjim vrednostima brzine obrtanja puža, uz maksimalne i minimalne vrednosti kapaciteta punjenja ekstrudera. Ipak u takvim uslovima, kapacitet punjenja ima slabije izražen uticaj na sadržaj ALA, što se vidi sa grafika 4.11b.

Iako je proces ekstrudiranja statistički značajno ($p < 0,00001$, $R^2 = 0,82$) uticao na smanjenje sadržaja ALA u ukupnim masnim kiselinama (Tabela 4.7), realno se sadržaj ALA maksimalno smanjio za svega 3,71 % (Tabela 4.7). Ako se zna da je sadržaj ALA u polaznom materijalu iznosio 49,12 % u ukupnim masnim kiselinama, ovo smanjenje je

relativno malo, što je jedna od najznačajnijih prednosti procesa ekstrudiranja nad drugim termičkim tretmanima. Ono obezbeđuje dobro očuvanje esencijalnih masnih kiselina, zbog kratkotrajnog zadržavanja materijala u cevi ekstrudera. Sa smanjenjem sadržaja ALA, primećeno je povećavanje sadržaja mononezasićenih masnih kiselina sa 25,35 % na 27,88 % (Tabela 4.7).

4.4 Uticaj variranih parametara procesa na saržaj slobodnih masnih kiselina u dobijenom ko-ekstrudatu

Kako su slobodne masne kiseline izuzetno reaktivne i podložnije oksidaciji od masnih kiselina vezanih u trigliceridima, bilo je neophodno ispitati da li i na koji način proces ekstrudiranja utiče na njihov sadržaj u ko-ekstrudatu. U tabeli 4.9 prikazani su rezultati promene SMK u ko-ekstrudatu usled variranja nezavisno promenljivih parametara procesa. U tabeli 4.10 dati su koeficijenti regresione jednačine (jednačina 13) koja opisuje promenu SMK u toku ekstrudiranja.

Tabela 4.9 Promena SMK u masnoj fazi ekstrudiranog hraniva u zavisnosti od primenjenih uslova ekstrudiranja

Uslovi ekstrudiranja				
Vlaga materijala (%)	Brzina obrtanja puža (o/min)	Kapacitet punjenja (kg/h)	Ukupna površina otvora matrice (mm ²)	SMK (% oleinske kiseline)
11,5	240	32	39,6	3,35
11,5	540	32	39,6	3,19
11,5	240	16	39,6	3,16
11,5	540	16	39,6	3,38
11,5	390	24	39,6	3,32
11,5	390	24	39,6	3,31
11,5	390	24	39,6	3,35
16	390	24	19,8	3,46
16	240	24	39,6	3,16
16	540	24	39,6	3,31
16	390	32	39,6	5,80
16	390	16	39,6	3,98
16	390	24	59,4	5,29
11,5	390	16	19,8	3,04
11,5	390	32	19,8	3,18
11,5	540	24	19,8	3,24
11,5	240	24	19,8	3,27
11,5	390	16	59,4	3,34
11,5	390	32	59,4	3,28
11,5	240	24	59,4	3,47
11,5	540	24	59,4	3,25
7	390	24	19,8	7,70
7	240	24	39,6	8,27
7	540	24	39,6	8,25
7	390	32	39,6	6,54
7	390	16	39,6	7,78
7	390	24	59,4	6,64
Polazna smeša				1,41

$$Y_3 = 33,08 - 4,13X_1 + 0,001X_2 - 0,25X_3 - 1,18X_4 + 0,0001X_1X_2 + 0,02X_1X_3 + 0,16X_1X_4 - 0,0003X_2X_4 - 0,006X_3X_4 + 0,126X_{11} + 0,0005X_{33} - 0,07X_{44} \quad (13)$$

Gde je: Y_3 - SMK u masnoj fazi ko-ekstrudata (% oleinske kiseline)

Tabela 4.10 Koeficijenti regresione jednačine za modelovani odziv SMK u masnoj fazi ko-ekstrudata

Koeficijenti	Vrednost	p – vrednost	t – vrednost
Odsečak			
b_0	33,07947	0,000410	4,83340
Linearni			
b_1	-4,13162	0,000001	-9,57925
b_2	0,00128	0,923369	0,09823
b_3	-0,25537	0,340488	-0,99262
b_4	-1,17633	0,528645	-0,64887
Interakcije			
b_{12}	0,00006	0,893301	0,13700
b_{13}	0,02122	0,028988	2,47945
b_{14}	0,16010	0,037492	2,33843
b_{23}	0,00001	0,965387	0,04431
b_{24}	-0,00030	0,887075	-0,14506
b_{34}	-0,00590	0,880859	-0,15311
Kvadratni			
b_{11}	0,12626	0,000001	9,58249
b_{22}	-0,00000	0,836753	-0,21057
b_{33}	0,00053	0,900536	0,12765
b_{44}	-0,07319	0,788516	-0,27430

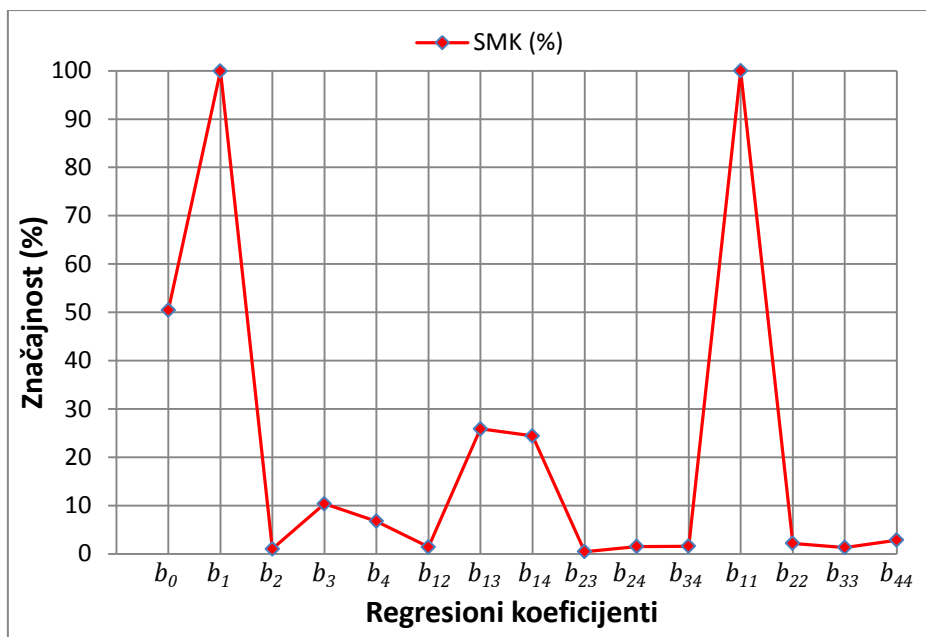
Slika 4.12 grafički prikazuje značajnosti uticaja pojedinih parametara procesa na merenu vrednost. Kako se u tabeli 4.10 i sa slike 4.12 može videti, daleko najveći značaj u promeni SMK tokom ekstrudiranja imali su linearni i kvadratni uticaji vlage prisutne u ekstrudiranom materijalu. U oba slučaja je $p = 0,000001$. Značajan uticaj pokazuju interakcije vlage materijala sa kapacitetom punjenja ekstrudera i površinom otvora na matrici.

Do povećavanja SMK u toku ekstrudiranja dolazi usled raskidanja veza između masnih kiselina i glicerola u trigliceridima. Dejstvom lipaze, lipoksigenaze i drugih enzima, zbog mešanja materijala i boljeg kontakta između supstrata i enzima, dolazi do oslobađanja masnih kiselina što povećava kiselost tretiranog materijala. Prilikom industrijske obrade uljarica i cerealija, kao što je slučaj sa ekstrudiranjem, kada je

sadržaj vlage u sirovinama visok, njen dalji porast uz dejstvo ostalih faktora, utiče na snižavanje enzimatske aktivnosti. Enzim lipaza može biti izuzetno termostabilan i otporan na spoljašnje uticaje i teško ga je inaktivirati, što zavisi pre svega od njegovog porekla. Tako se lipolitička aktivnost lipaze heljde zaustavlja tek na temperaturi od 120 °C pri tretmanu od minimalno 7 sekundi, a smatra se da se većina endogenih lipaza uljarica potpuno inaktivira na oko 100 °C pri tretmanu od nekoliko minuta. Optimalni uslovi aktivnosti ovog enzima u suncokretovom semenu su relativno visoka temperatura od 50 °C i pH vrednost 7,5 uz vreme inkubacije od 5 minuta, što ukazuje na njegovu aktivnost i pri povišenim temperaturama (Pahoja *et al.*, 2002). Zhu i saradnici su ispitivali dejstvo sadržaja vlage i temperature prilikom ekstrudiranja hrane za životinje na aktivnost lipoksigenaze i zabeležili da se njeno dejstvo snižavalo sa porastom temperature i vlage materijala tokom procesa (Zhu *et al.*, 1996).

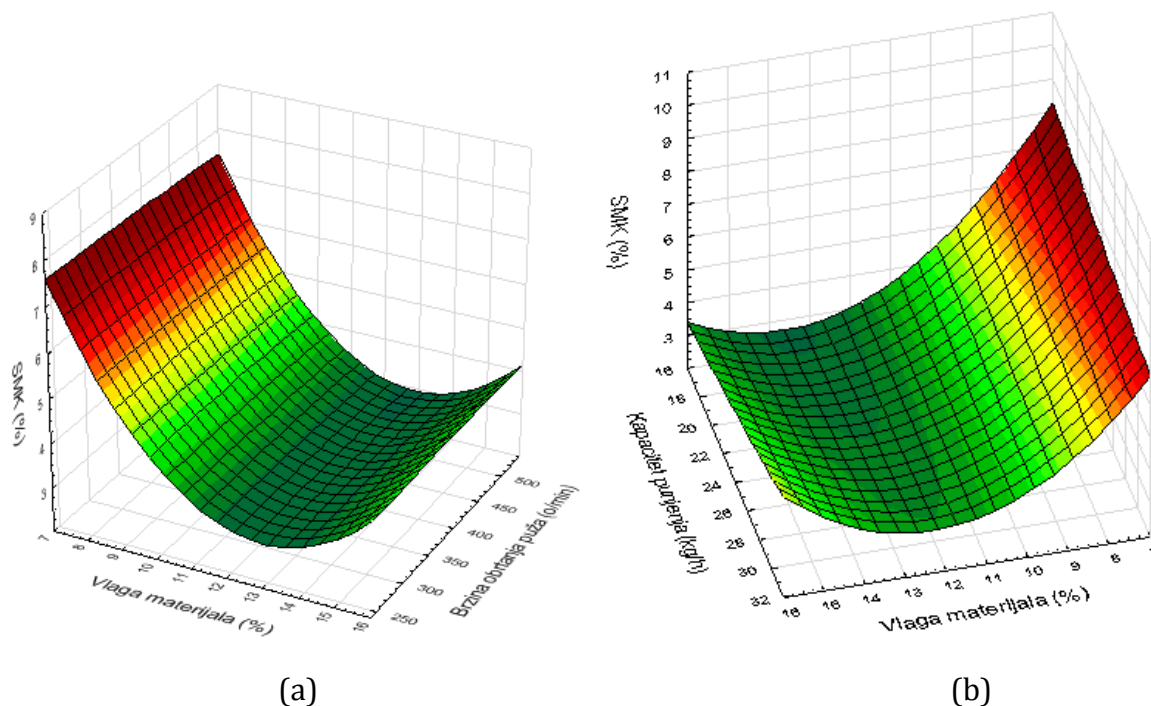
Pod odgovarajućim uslovima ekstrudiranja dejstvo enzima se može inaktivirati, što zaustavlja ili barem usporava oslobađanje masnih kiselina. Uslovi koji ovo omogućavaju su temperature od oko 120 °C, slabo dejstvo sila smicanja materijala i vlažnost od 20 % i više (Meister *et al.*, 1994). U ovom eksperimentu vlaga je, u poređenju sa ostalim nezavisno promenljivim parametrima procesa, imala daleko najznačajniji uticaj na promenu SMK. Inaktivacija enzima se intenzivirala sa porastom vrednosti ovog parametra sa 7 % na 16 %.

Kada se pogleda slika 4.12, jasno se vidi da je uticaj vlage materijala (b_1 i b_{11}) na SMK znatno izraženiji i značajniji u poređenju sa svim ostalim parametrima ekstrudiranja. Nivo značajnosti za ova dva koeficijenta na slici 4.12 iznosi oko 100 %, dok je prvi sledeći uticaj interakcije vlage materijala i kapaciteta punjenja ekstrudera sa svega oko 25 % (ne računajući slobodan član).



Slika 4.12 Značajnost regresionih koeficijenata u korelaciji sadržaja slobodnih masnih kiselina u ko-ekstrudatu tokom ekstrudiranja

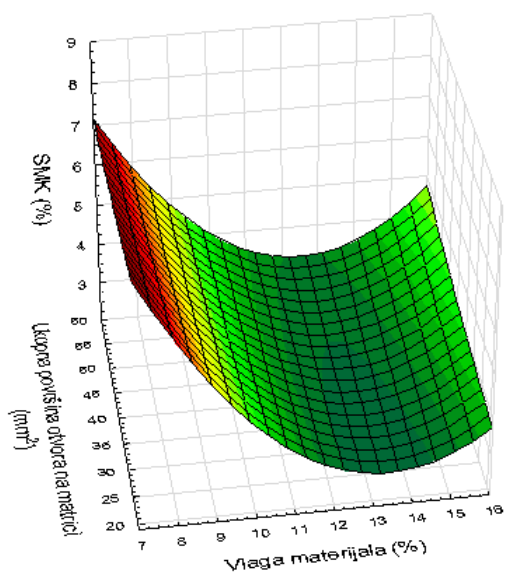
Na slici 4.13 prikazani su uticaji vlage materijala i brzine obrtanja puža ekstrudera (4.13a), odnosno kapaciteta punjenja ekstrudera (4.13b) na SMK u ko-ekstrudatu, uz konstantne središnje vrednosti preostala dva parametra ekstrudiranja. Kako se sa slike 4.13a vidi, smanjivanjem sadržaja vlage, povećava se sadržaj SMK i obrnuto. Kao što je ranije već objašnjeno, povećana vlaga materijala inaktivira dejstvo enzima lipaze, usled čega se masne kiseline teže i manje izraženo oslobađaju iz triglicerida, pa je i SMK niži. Najniža SMK vrednost zabeležena je pri vlazi materijala od oko 13 %, nakon čega SMK ponovo blago raste. Ovo se objašnjava snižavanjem temperature pri visokim sadržajima vlage. Naime, iako je vlažnost materijala u ovom slučaju visoka što pogoduje inaktivaciji enzima, temperatura u ekstruderu je opala, što opet pozitivno utiče na porast SMK, pa je zbog toga i SMK vrednost blago skočila. Sa slike se takođe vidi da je uticaj brzine obrtanja puža u odnosu na vlagu materijala praktično zanemarljiv, jer je pri bilo kojoj konstantnoj vrednosti vlage materijala, za različite brzine obrtanja puža SMK praktično nepromenjen.



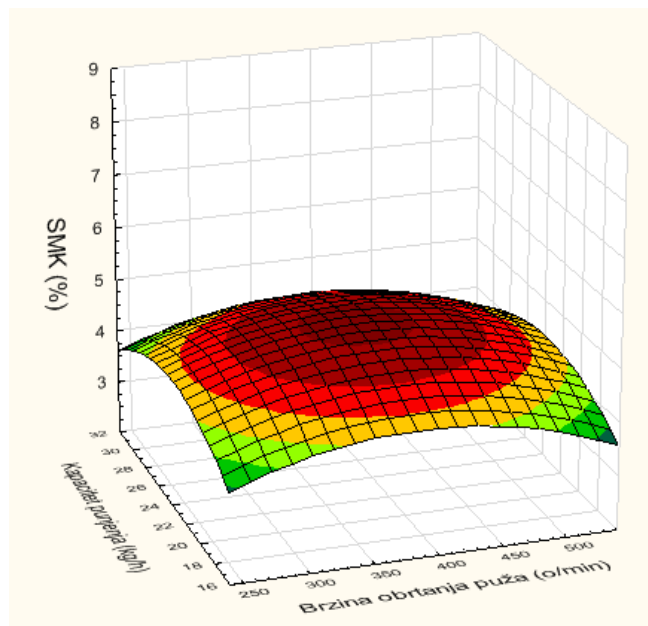
Slika 4.13 Uticaj vlage polaznog materijala i brzine obrtanja puža (a) odnosno kapaciteta punjenja ekstrudera (b) na sadržaj slobodnih masnih kiselina

Kada se posmatra slika 4.13b, mogu se izvesti slični zaključci, s tim da je uticaj kapaciteta punjenja ekstrudera bio nešto izraženiji, nego uticaj brzine obrtanja puža. Najviše vrednosti SMK izmerene su pri najmanjim sadržajima vlage materijala (7 %) i najmanjem kapacitetu punjenja (16 kg/h).

Na slici 4.14a prikazan je uticaj vlage materijala i ukupne površine otvora na matrici na SMK u ko-ekstrudatu, uz konstantne centralne vrednosti brzine obrtanja puža ekstrudera i kapaciteta punjenja. Još jednom, najviše vrednosti SMK izmerene su pri najnižim vrednostima vlage, ali i najvećoj ukupnoj površini otvora na matrici (59,4 mm²). Sa povećanjem površine otvora na matrici, postizane su niže temperature u cevi ekstrudera, zbog čega je inaktivacija enzima bila slabije izražena, pa je i vrednost SMK viša. Ovaj uticaj ukupne površine otvora najbolje se primećuje pri višim vrednostima vlage materijala, kada je u jednom trenutku (vlaga preko 13 %), temperature počela da opada zbog dvojakog uticaja vlage materijala i povećane površine otvora na matrici, što je rezultovalo porastom SMK.



(a)

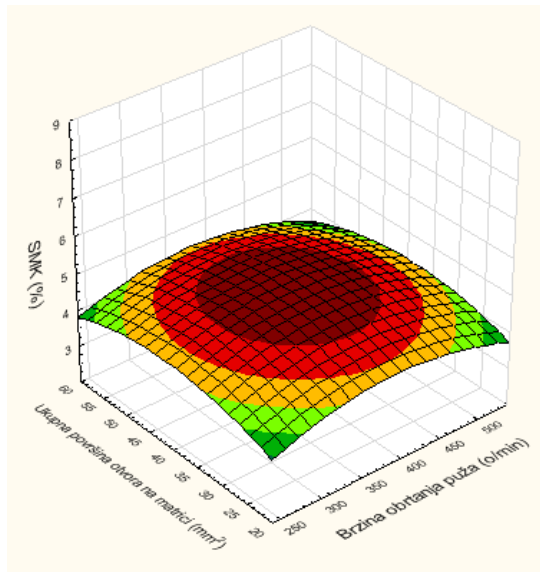


(b)

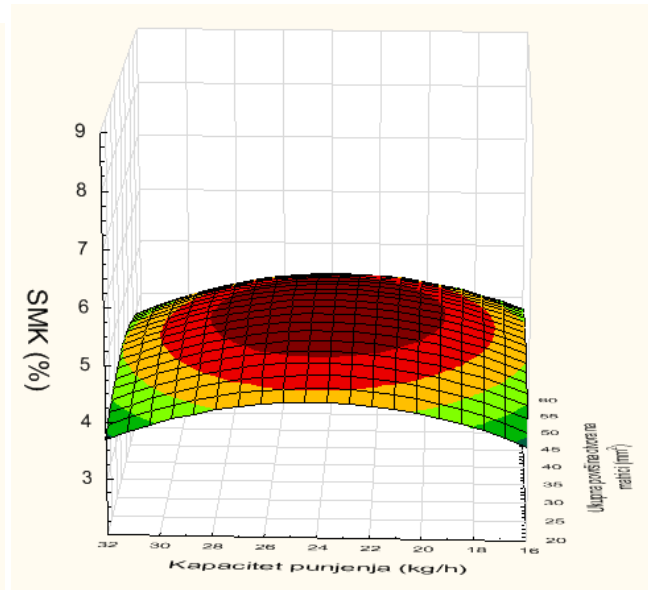
Slika 4.14 Uticaj vlage polaznog materijala i ukupne površine otvora na matrici (a) odnosno kapaciteta punjenja ekstrudera i brzine obrtanja puža (b) na sadržaj slobodnih masnih kiselina

Slika 4.14b objašnjava uticaj kapaciteta punjenja i brzine obrtanja puža ekstrudera na SMK kada su vlaga materijala i površina otvora na matrici održavane na svojim središnjim vrednostima. Ono što se može uočiti na slici, jeste veoma mali nagib površine koja opisuje zajednički uticaj pomenuta dva parametra, što znači da su se vrednosti SMK pri promeni ova dva parametra uz fiksiranu vlagu materijala i ukupnu površinu otvora na matrici veoma malo menjale i nisu statistički značajne. Ovo je i očekivano, s obzirom na izračunate značajnosti pomenutih parametara u regresionoj jednačini za posmatrani odziv. Maksimalan SMK izmeren je pri središnjim vrednostima brzine obrtanja puža ekstrudera i kapaciteta punjenja.

Slike 4.15a i 4.15b pokazuju isti trend, pre svega da zajednički uticaji ukupne površine otvora na matrici sa brzinom obrtanja puža i kapacitetom punjenja ekstrudera nisu statistički značajne, što potvrđuju niske *p*-vrednosti u tabeli 4.7.



(a)



(b)

Slika 4.15 Uticaj brzine obrtanja puža i ukupne površine otvora na matrici (a) kapaciteta punjenja ekstrudera i ukupne površine otvora na matrici (b) na sadržaj slobodnih masnih kiselina

4.5 Uticaj variranih parametara procesa na potrošnju energije tokom ekstrudiranja

Potrošnje energije u ogledu se kretala između 117 kWh/t i 295,44 kWh/t, u zavisnosti od primenjenih parametara ekstrudiranja. U tabeli 4.11 prikazani su rezultati potrošnje energije u zavisnosti od primenjenih parametara (jednačina 14).

Tabela 4.11 Potrošnja energije tokom ekstrudiranja u zavisnosti od primenjenih nezavisno promenljivih parametara

Uslovi ekstrudiranja				
Vlaga materijala (%)	Brzina obrtanja puža (o/min)	Kapacitet punjenja (kg/h)	Ukupna površina otvora matrice (mm ²)	Potrošnja energije (kWh/t)
11,5	240	32	39,6	162,96
11,5	540	32	39,6	170,91
11,5	240	16	39,6	241,69
11,5	540	16	39,6	274,19
11,5	390	24	39,6	223,72
11,5	390	24	39,6	223,25
11,5	390	24	39,6	223,27
16	390	24	19,8	160,28
16	240	24	39,6	217,57
16	540	24	39,6	166,88
16	390	32	39,6	121,28
16	390	16	39,6	145,45
16	390	24	59,4	117,00
11,5	390	16	19,8	173,29
11,5	390	32	19,8	150,97
11,5	540	24	19,8	267,63
11,5	240	24	19,8	238,96
11,5	390	16	59,4	165,72
11,5	390	32	59,4	150,24
11,5	240	24	59,4	182,60
11,5	540	24	59,4	200,04
7	390	24	19,8	181,61
7	240	24	39,6	222,80
7	540	24	39,6	295,45
7	390	32	39,6	168,78
7	390	16	39,6	181,36
7	390	24	59,4	175,76

Svi parametri ekstrudiranja imali su statistički značajan uticaj na potrošnju energije, bilo da su u pitanju linearni, ili kvadratni članovi, što se može videti iz tabele 4.12. Odsečak (slobodan član) u jednačini nije imao statistički značajan uticaj na ispitivani odziv, iako mu je *t-vrednost* bila veća od granične ($t = 1,83$). Međutim, drugi

kriterijum statističke značajnosti ($p \leq 0,05$) nije bio ispunjen, pa se može smatrati da je ovaj član jednačine pokazao tendenciju značajnosti.

$$Y_4 = -362,032 - 0,57X_1 + 28,05X_2 + 56,45 + 4,70X_4 - 0,004X_1X_2 - 0,046X_1X_3 + 0,001X_1X_4 - 0,08X_2X_3 + 0,02X_2X_4 - 0,105X_3X_4 + 0,002X_{11} - 0,605X_{22} - 1,65X_{33} - 0,063X_{44} \quad (14)$$

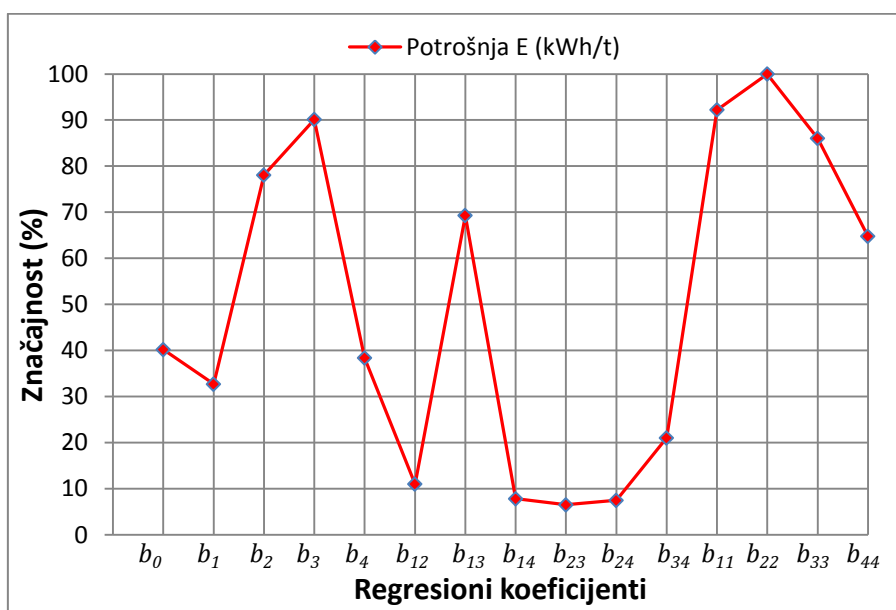
Gde je: Y_4 - potrošnja energije tokom ekstrudiranja (kWh/t)

Tabela 4.12 Koeficijenti regresione jednačine za modelovani odziv potrošnje energije tokom ekstrudiranja

Koeficijenti	Vrednost	p - vrednost	t - vrednost
Odsečak			
b_0	-362,032	0,109866	-1,72661
Linearni			
b_1	-0,572	0,185371	-1,40502
b_2	28,055	0,005729	3,35483
b_3	56,450	0,002214	3,87343
b_4	4,705	0,124952	3,87343
Interakcije			
b_{12}	-0,004	0,645851	-0,47134
b_{13}	-0,046	0,011556	-2,97672
b_{14}	0,001	0,742778	0,33586
b_{23}	-0,080	0,784586	-0,27955
b_{24}	0,020	0,754167	0,32041
b_{34}	-0,105	0,384093	-0,90340
Kvadratni			
b_{11}	0,002	0,001885	3,96258
b_{22}	-0,605	0,001037	-4,29736
b_{33}	-1,654	0,003052	-3,69717
b_{44}	-0,063	0,016544	-2,78345

Na slici 4.16, grafički su prikazane značajnosti svih koeficijenata regresione jednačine za potrošnju energije u procesu ekstrudiranja. Kao što se vidi na slici, najveću značajnost pokazao je kvadratni uticaj brzine obrtanja puža ekstrudera ($p = 0,001$), a

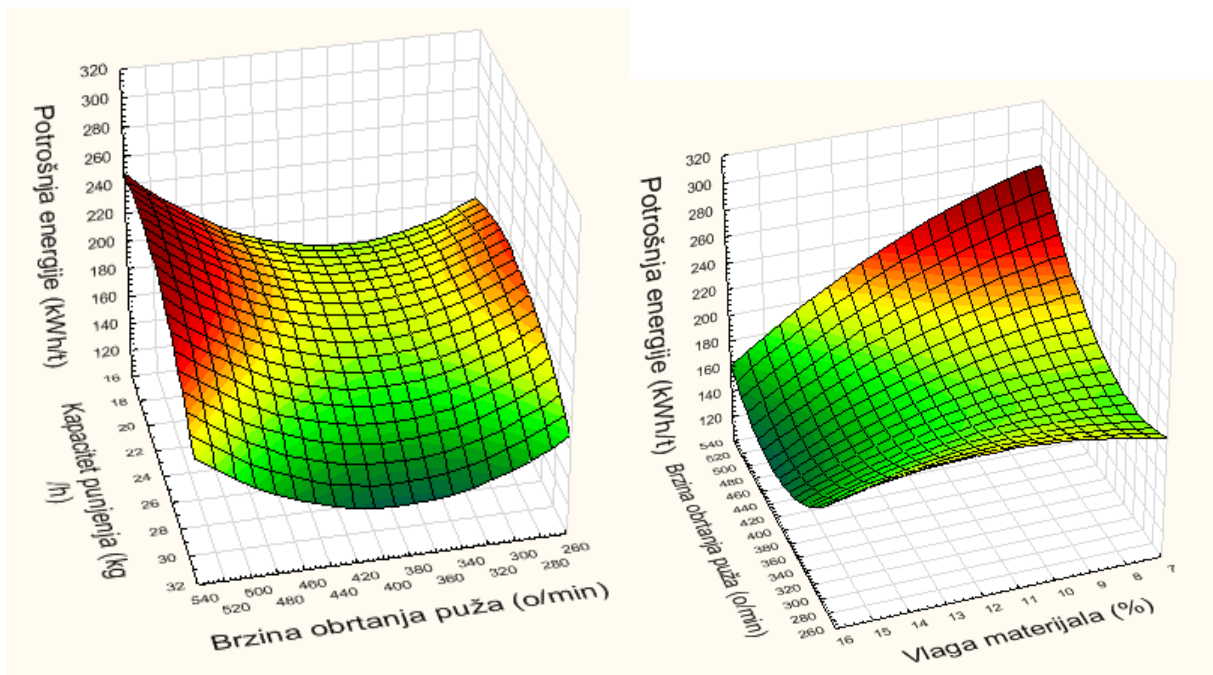
potom slede kvadratni uticaj vlage materijala ($p = 0,0018$) i linearni uticaj kapaciteta punjenja ekstrudera ($p = 0,002$). Veliku značajnost pokazali su još i kvadratni uticaji kapaciteta punjenja ekstrudera ($p = 0,003$) i vlage materijala ($p = 0,016$), kao i interakcija između vlage materijala i kapaciteta punjenja ekstrudera ($p = 0,011$). Najmanju značajnost u regresionoj jednačini pokazale su interakcije brzine obrtanja puža sa kapacitetom punjenja ekstrudera ($p = 0,78$), odnosno vlagom materijala ($p = 0,75$).



Slika 4.16 Značajnost regresionih koeficijenata u korelaciji potrošnje energije tokom ekstrudiranja

Na slikama 4.17, 4.18 i 4.19 prikazani su uticaji promenljivih parametara ekstrudiranja na potrošnju energije u procesu. Kako se vidi na slici 4.17a, najveća potrošnja energije postignuta je pri uslovima maksimalne brzine obrtanja puža i središnjim vrednostima kapaciteta punjenja ekstrudera (295,44 kWh/t). Povećavanje potrošnje energije sa povećanjem brzine obrtanja puža može se objasniti na sledeći način. Ukoliko je kapacitet punjenja konstantan, u cev ekstrudera će u istim vremenskim intervalima dospeti jednaka masa materijala, te da bi se taj materijal brže obrtao, potrebna je veća količina energije, nego pri manjim brzinama obrtanja puža.

Kada se posmatra promena potrošnje energije sa povećanjem kapaciteta punjenja pri konstantnoj brzini obrtanja puža, primećuje se da se sa povećanjem kapaciteta punjenja do vrednosti od 24 kg/h postižu maksimalne potrošnje energije. Ovo se objašnjava povećanjem zbijenosti čestica materijala u prostoru između navoja na pužu ekstrudera, što povećava otpor obrtanju puža i zahteva više mehaničke energije za pokretanje materijala u cevi ekstrudera (Liang et al., 2002). Drugi razlog za povećanu potrošnju energije može biti nagomilavanje materijala ispred matrice i stvaranje plastične mase, koja se opire prolasku kroz otvore na matrici. Daljim povećavanjem kapaciteta punjenja preko 24 kg/h potrošnja energije po masi materijala se postepeno smanjuje što se može objasniti povećanjem pritiska materijala na matricu ekstrudera i lakšim prolaskom kroz otvore, usled čega se potrošnja energije smanjuje. Tako je najmanja potrošnja energije postignuta pri brzini obrtanja puža od oko 380 o/min i kapacitetu punjenja od 32 kg/h, uz konstantne središnje vrednosti površine otvora na matrici i polazne vlage materijala.

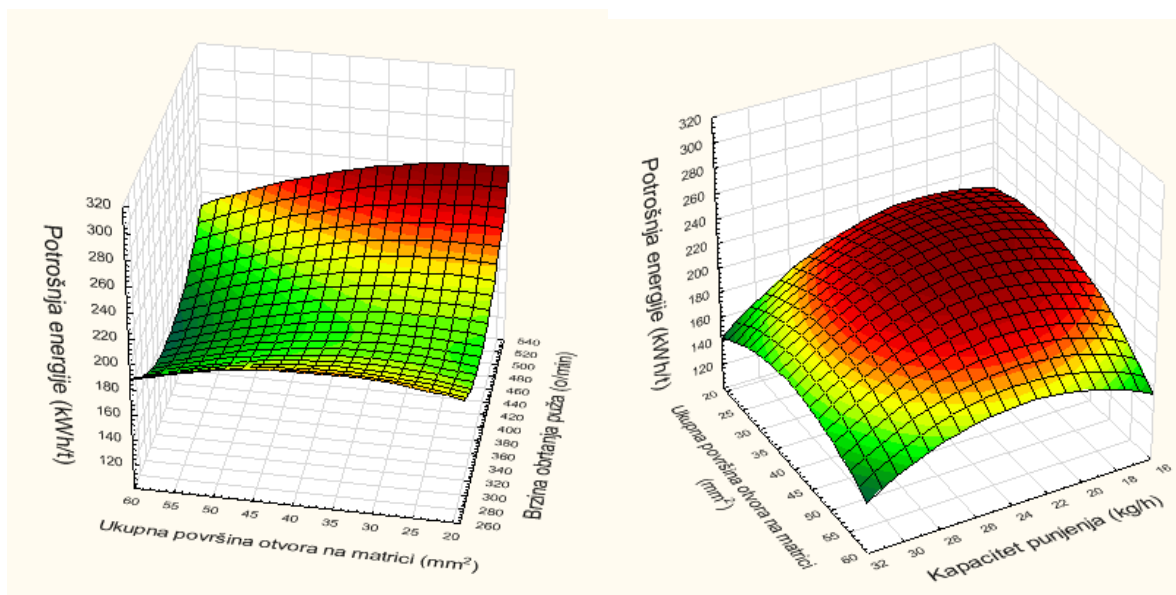


(a)

(b)

Slika 4.17 Uticaj brzine obrtanja puža i kapaciteta punjenja ekstrudera (a), odnosno vlage materijala na potrošnju energije u procesu ekstrudiranja (b)

Na slici 4.17b jasno se vidi da potrošnja energije raste sa povećanjem brzine obrtanja puža. Maksimalna potrošnja energije izmerena je pri najvećoj brzini obrtanja puža i najnižoj vlagi materijala. Sa porastom vlage materijala, potrošnja energije je opadala zbog olakšanog protoka materijala kroz cev ekstrudera. Ista zapažanja izneli su u svom radu *Guerrero* i saradnici, koji su ispitivali ekstrudiranje proteina soje sa želatinom i šećerima pri niskom sadržaju vlage. Voda u materijalu igra značajnu ulogu u prenosu toplote tokom ekstrudiranja. Povišen sadržaj vlage olakšava prenos toplote kroz čitavu masu tretiranog materijala, usled čega dolazi do smanjenja njegovog viskoziteta, pa je potrebno upotrebiti manju silu za prolazak materijala kroz otvore na matrici. Istovremeno dolazi do pada intenziteta sile trenja i frikcije između obrađivane smeše, puža i cevi ekstrudera (*Guerrero et al.*, 2012).



(a)

(b)

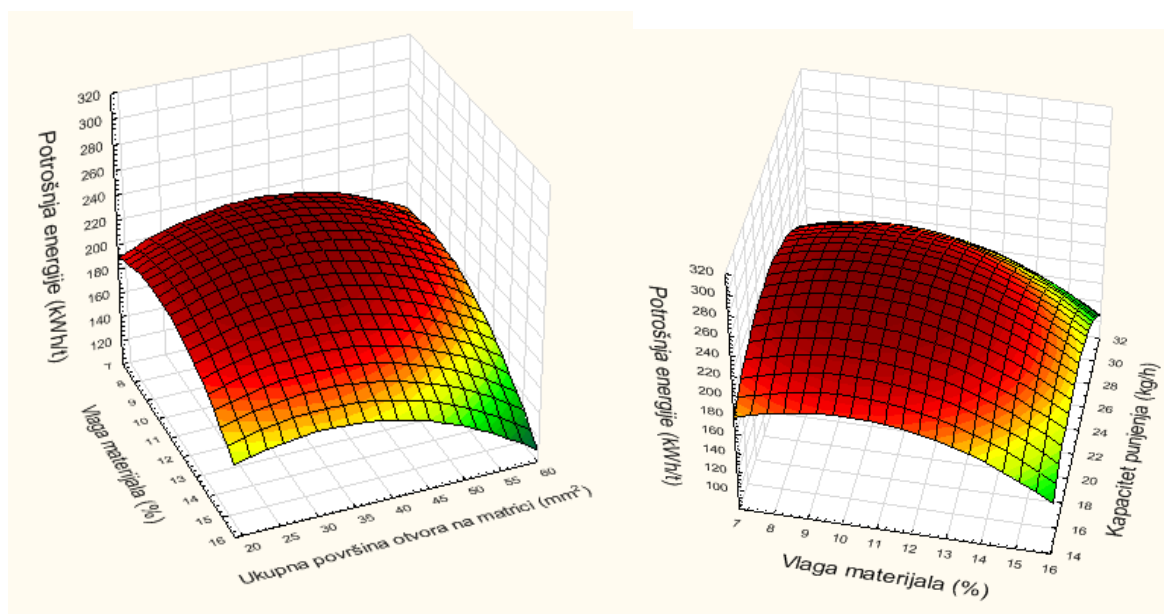
Slika 4.18 Uticaj ukupne površine otvora na matrici i brzine obrtanja puža (a), odnosno kapaciteta punjenja ekstrudera na potrošnju energije u procesu ekstrudiranja (b)

Slika 4.18a prikazuje uticaje ukupne površine otvora na matrici i brzine obrtanja puža na potrošnju energije tokom ekstrudiranja. Minimalna potrošnja energije postignita je pri najvećoj ukupnoj površini otvora na matrici i vrednostima brzine obrtanja puža od oko 300 o/min, uz konstantne centralne vrednosti preostala dva parametra. Sa povećanjem ukupne površine otvora na matrici olakšava se prolazak

materijala kroz matricu, pa je samim tim i potrošnja energije manja. Uticaj brzine obrtanja puža, prethodno je već objašnjen.

Na slici 4.18b vidi se da je najmanja potrošnja energije postignuta pri najvećoj površini otvora na matrici i najvećem kapacitetu punjenja, uz konstantne srednje vrednosti polazne vlage materijala i brzine obrtanja puža. Pri ovakvim uslovima, otpor prolasku materijala kroz matricu bio je najmanji, jer se material nije nagomilavao neposredno pred matricu. Zbog velikog kapaciteta punjenja materijala i površine otvora na matrici, material je brzo prolazio kroz ekstruder. Stoga je izmerena potrošnja energije po masi materijala pri pomenutim uslovima iznosila svega 150,23 kWh/t.

Na slici 4.19a, evidentno je da je najmanja potrošnja energije postignuta pri najvećoj ukupnoj površini otvora matrice i maksimalnoj vlazi materijala (16 %). Potrošnja energije pri ovim uslovima uz fiksirane srednje vrednosti brzine obrtanja puža i kapaciteta punjenja ekstrudera iznosila je 117 kWh/t što je najniža izmerena vrednost u eksperimentu. Sa manjim vrednostima ukupne površine otvora na matrici i vlage materijala, utrošena energija je rasla do vrednosti od oko 220 kWh/t. Ukupna površina otvora na matrici ima slabiji uticaj na potrošnju energije od vlage materijala (tabela 4.10, slika 4.16), pa je i nagib površine (slika 4.19a) veći sa promenom vlage materijala, pri konstantnoj površini otvora na matrici, nego u obrnutom slučaju.



(a)

(b)

Slika 4.19 Uticaj vlage materijala i ukupne površine otvora na matrici (a), odnosno kapaciteta punjenja ekstrudera na potrošnju energije u procesu ekstrudiranja (b)

Slika 4.19b prikazuje smanjenje potrošnje energije sa povećanjem vlage materijala. Takođe se vidi da povećanje kapaciteta do vrednosti od 24 kg/h povećava potrošnju energije. Kako je već opisano, usled sabijanja čestica materijala u prostoru između navoja na pužu ekstrudera i nagomilavanja materijala neposredno ispred matrice, povećava se i potrošnja energije. Kasniji pad potrošnje energije sa daljim povećavanjem kapaciteta punjenja objašnjava se lakšim polaskom materijala kroz matricu i odsustvom nagomilavanja materijala u prostoru ispred matrice, zbog čega materijal brže izlazi iz ekstrudera, pa se i potrošnja energije smanjuje.

4.6 Uticaj variranih parametara procesa na promenu radne temperature u cevi ekstrudera i indeks rastvorljivosti azota ko-ekstrudata

4.6.1 Promena temperature

Tokom 27 tretmana pri kojima su parametri ekstrudiranja menjani prema predviđenom eksperimentalnom dizajnu, registrovane su sledeće temperature u četiri tačke u kojima su merenja izvršena, pri čemu je temperatura t_1 merena na neposredno ispred matrice, a t_4 u tački najudaljenijoj od matrice (Slika 3.4):

- t_1 – temperatura se kretala u opsegu od 52,82 do 116,02 °C
- t_2 – temperatura se kretala u opsegu od 41,06 do 74,05 °C
- t_3 – temperatura se kretala u opsegu od 31,04 do 56,41 °C
- t_4 – temperatura se kretala u opsegu od 28,94 do 49,06 °C.

Promena temperatura u cevi ekstrudera tokom različitih tretmana prikazana je u tabeli 4.13.

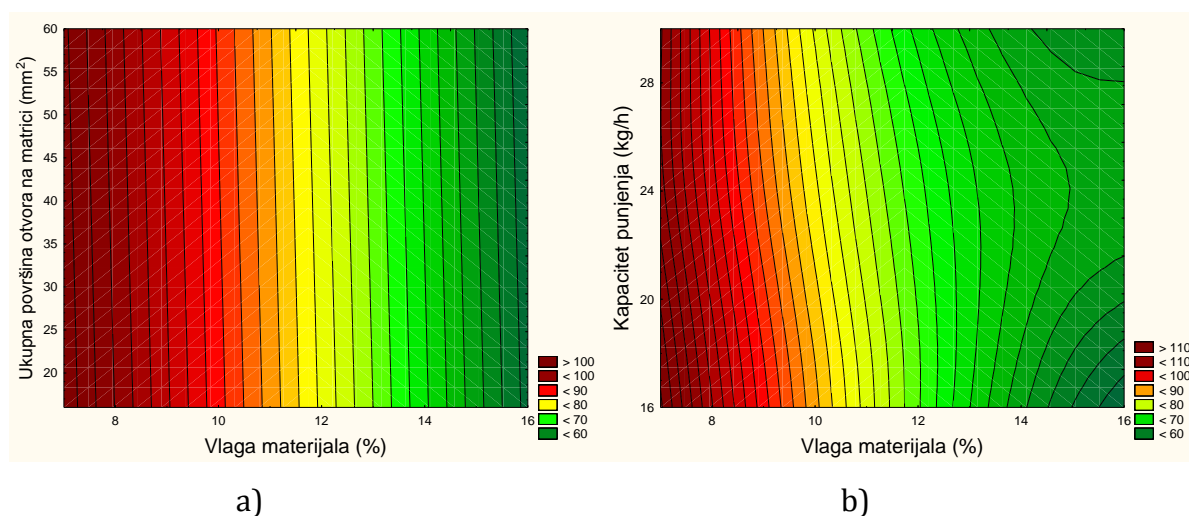
Tabela 4.13 Promena temperatura u cevi ekstrudera u zavisnosti od primenjenih uslova ekstrudiranja

Uslovi ekstrudiranja				t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
Vlaga materijala (%)	Brzina obrtanja puža (o/min)	Kapacitet punjenja (kg/h)	Ukupna površina otvora matrice (mm ²)				
11,5	240	32	39,6	57,52	41,76	34,63	31,32
11,5	540	32	39,6	73,33	48,08	38,02	32,1
11,5	240	16	39,6	71,38	48,03	36,80	31,52
11,5	540	16	39,6	73,94	48,12	37,13	31,96
11,5	390	24	39,6	75,18	49,98	39,06	28,94
11,5	390	24	39,6	74,03	48,23	38,64	30,58
11,5	390	24	39,6	74,60	48,46	38,95	30,75
16	390	24	19,8	53,16	41,06	34,20	29,85
16	240	24	39,6	63,80	46,08	35,82	26,46
16	540	24	39,6	68,54	47,03	36,52	31,19
16	390	32	39,6	58,99	44,10	35,02	34,47
16	390	16	39,6	52,82	38,24	31,04	33,47
16	390	24	59,4	70,23	47,08	36,69	34,12
11,5	390	16	19,8	82,50	55,55	43,26	32,77
11,5	390	32	19,8	79,18	54,30	39,98	39,16
11,5	540	24	19,8	79,16	54,14	41,35	31,18
11,5	240	24	19,8	78,00	52,59	39,87	30,46
11,5	390	16	59,4	84,93	58,14	49,66	32,47
11,5	390	32	59,4	70,38	46,72	35,87	48,05
11,5	240	24	59,4	67,75	46,49	35,80	47,31
11,5	540	24	59,4	76,53	50,78	39,86	49,06
7	390	24	19,8	113,14	72,21	55,29	48,01
7	240	24	39,6	104,51	65,32	52,51	54,5
7	540	24	39,6	114,39	72,75	56,42	47,49
7	390	32	39,6	111,18	71,37	54,91	31,32
7	390	16	39,6	116,02	74,05	62,03	32,1
7	390	24	59,4	109,81	69,28	54,90	31,52

Kao što se može videti, temperature u tački 4, najudaljenijoj od matrice na izlazu iz ekstrudera, bile su najniže, dok su temperature merene neposredno iza matrice, u tački 1, bile najviše. Temperature u tački 4 postepeno su rasle. Od tačke 4 do tačke 1, promene temperature bile su sve naglije i nepravilnije, što se objašnjava nakupljanjem materijala neposredno pred matricu. Usled nakupljanja, povećava se pritisak u cevi ekstrudera, što

utiče na skok temperature. Nakon naglog prolaska materijala kroz matricu ekstrudera, pritisak opada i temperatura se nepravilno snižava. Može se reći da su iz spomenutog razloga, uslovi ekstrudiranja neposredno pred izlazak materijala iz cevi ekstrudera (t_1) bili nestabilniji nego u tački 4.

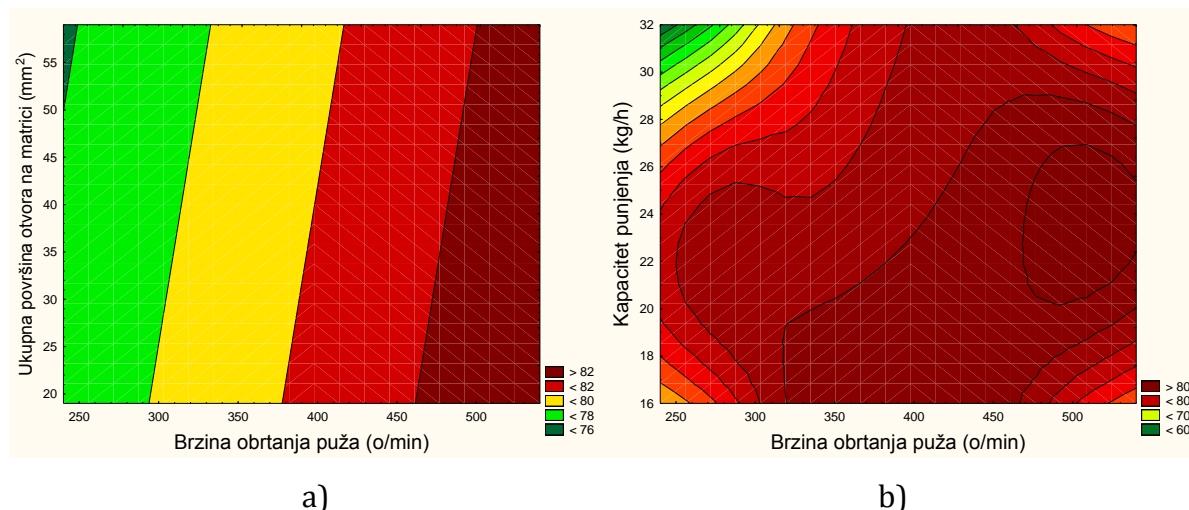
Na slikama 4.20 i 4.21 prikazani su uticaji četiri nezavisna parametra koji su tokom ekstrudiranja varirani, na temperaturu u cevi ekstrudera, merenu u tački 1.



Slika 4.20 Uticaj vlage materijala i ukupne površine otvora na matrici (a), odnosno kapaciteta punjenja (b) na promenu temperature u cevi ekstrudera

Prema dobijenim rezultatima, očigledno je da je sa porastom sadržaja vlage u materijalu, temperatura ekstrudiranja opadala (Slika 4.20a i b), zbog snižavanja viskoziteta materijala i njegovog bržeg prolaska kroz cev ekstrudera. Isti trend prikazan je i u radu *Abecassisa* i saradnika. Prema njihovim rezultatima, povećana vlaga materijala naročito snižava temperaturu pri izlasku materijala iz cevi ekstrudera, dok je uticaj bio nešto slabiji na početku ekstrudera (*Abecassis et al.*, 1994).

Najniže temperature u cevi ekstrudera postignute su pri najvišim sadržajima vlage od 16 % i najmanjem kapacitetu punjenja ekstrudera. U tom slučaju, materijal se kratko zadržavao u cevi ekstrudera i lako je prolazio kroz matricu, jer nije dolazilo do nakupljanja i sabijanja materijala. Stoga je i izmerena temperatura bila niska.



Slika 4.21 Uticaj brzine obrtanja puža i ukupne površine otvora na matrici (a), odnosno kapaciteta punjenja (b) na promenu temperature u cevi ekstrudera

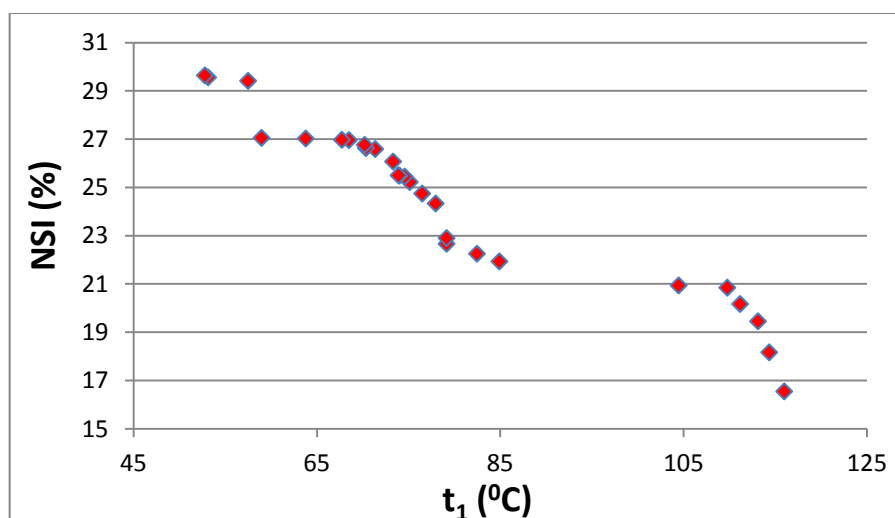
S druge strane, povećanjem brzine obrtanja puža ekstrudera temperatura je rasla, što je bilo i očekivano (Slika 4.21). Naime, sa porastom brzine obrtanja puža, intenziviraju se sile smicanja, torzije, frikcije i pritiska, što sve dovodi do skoka radne temperature u ekstruderu. Iste rezultate su u svojim ispitivanjima procesa ekstrudiranja paste prikazali su *Abecassis* i saradnici. Njihovi rezultati potvrđuju da povećana brzina obrtanja puža intenzivira mehaničke sile u cevi ekstrudera, što povećava temperaturu ekstrudiranja (*Abecassis et al.*, 1994). Autori takođe naglašavaju izrazit uticaj veličine otvora matrice na temperaturu u ekstruderu i zaključuju da redukcija veličine otvora na matrici utiče na porast temperature, što se poklapa sa rezultatima u našem eksperimentu. Ako se posmatra grafik 4.21a, vidi se da temperatura u cevi ekstrudera opada sa povećanjem ukupne površine otvora na matrici. Razlog za to je lakši prolazak materijala kroz matricu, usled čega pritisak u cevi ekstrudera opada, a sa njim i temperatura. Veličina otvora na matrici direktno utiče na pritisak u cevi ekstrudera i na temperaturu ekstrudiranja (*Abecassis et al.*, 1994; *Ivanov et al.*, 2012b).

Sa slike 4.21b vidi se da je najviša temperatura u cevi ekstrudera postignuta pri maksimalnoj brzini obrtanja puža i srednjim vrednostima kapaciteta punjenja ekstrudera od 24 – 26 kg/h. Do ovih vrednosti, povećanje kapaciteta punjenja ekstrudera intenzivira pritisak u cevi, sile smicanja, trenja i frikcije, zbog čega i temperatura raste. Međutim, istovremeno se i ubrzava prolazak materijala kroz cev

ekstrudera, što znači da će tretirana smeša biti izlagana dejstvu pomenutih sila kraći vremenski period. Nakon nivoa od 24 - 26 kg/h, uticaj brzine prolaska materijala kroz cev na temperaturu je izraženija, nego uticaj pomenutih sila čije se dejstvo pojačalo, pa je temperatura ponovo počela da opada. Najniža temperatura u cevi ekstrudera, uz fiksirane srednje vrednosti vlage materijala i površine otvora na matrici, izmerena je pri nanižoj brzini obrtanja puža ekstrudera i najvišim vrednostima kapaciteta punjenja i u tački t_1 iznosila je 57,52 °C.

4.6.2 Promena indeksa rastvorljivosti azota

Indeks rastvorljivosti azota (NSI – Nitrogen Solubility Index), koji se koristi kao merilo kvaliteta biljnih proteina u hrani za životinje (Riaz, 2000), u ovom eksperimentu se kretao između 16,54 % i 29,64 %. NSI vrednost netretirane smeše suncokretove sačme i lanenog semena iznosila je 29,64 %. Sa porastom temperature ekstrudiranja, NSI vrednost je opadala, što se može primetiti na slici 4.22. Prikazane NSI vrednosti predstavljaju srednje vrednosti tri merenja za svaki od 27 tretmana u eksperimentu. Ovakva promena NSI je u saglasnosti sa podacima iz literature. Povišena temperatura izaziva denaturaciju proteina, čime se smanjuje njihova rastvorljivost, što se detektuje kao snižavanje NSI vrednosti (Van Eys et al., 2004; Zayas, 1997).



Slika 4.22 Zavisnost NSI vrednosti od porasta teprature

Pri brzini obrtanja puža od 540 o/min i vlažnosti polaznog materijala od 7 %, izmeren NSI iznosio je 16,54 %. Ovo je bila i najniža vrednost NSI u eksperimentu. Vлага materijala nije direktno uticala na NSI, jer sama vлага bez dodatnih faktora nema značajan uticaj na rastvorljivost proteina (*Lam-Sánchez et al*, 1985), pa time ni na NSI tretiranog ko-ekstrudata. Međutim, pri najnižem sadržaju vlage u materijalu, postizane su najviše temperature ekstrudiranja, što je uticalo i na opadanje NSI proizvedenog hraniva.

Sa porastom temperature u tački 1 koja je se nalazi na samom izlasku iz cevi ekstrudera (Slika 4.22) od 52,85 °C do 57,52 °C, NSI je opao sa 29,64 na 29,41 %, ali ne statistički značajno ($p > 0,05$), što vodi do zaključka da pri ovim temperaturama nije došlo do intenzivne degradacije proteina. U opsegu temperatura između 68,54 °C i 84,93 °C, NSI je statistički značajno ($p \leq 0,05$) i kontinualno opadao od 26,95 do 21,93 %. U opsegu temperatura između 84,93 °C i 104,10 °C, degradacija proteina se stabilizovala (NSI se kretao između 21,93 i 20,93 %), da bi nakon ove temperature ponovo drastično opao sa 20,93 % na 16,54 %, pri temperaturi od 116,02 °C.

U literaturi nisu pronađeni podaci o optimalnim NSI vrednostima za laneno seme, suncokretovu sačmu, ili njihove proizvode. Međutim, prema rezultatima za termički tretiranu sojinu sačmu koje su prikazali *Chang et al* 1987 godine, optimalna vrednost NSI iznosila bi 25,1 % (*Chang et al.*, 1987). Autori u svom radu upozoravaju da bi pregrevanje sojine sačme uticalo na razaranje esencijalnih amino kiselina, naročito lizina i arginine, što bi se moglo primeniti i na laneno seme.

4.7 Optimizacija procesa ekstrudiranja

Postupak odzivnih površina je u ovom eksperimentu upotrebljen kako bi se, kao konačan rezultat, optimizovao proces ekstrudiranja smeše lanenog semena i suncokretove sačme. Cilj optimizacije bio je proizvodnja funkcionalnog hraniva sa zadovoljavajućim kvalitativnim karakteristikama, uz što manju potrošnju energije.

Za optimizaciju procesa ekstrudiranja, odabrani u sledeći odzivi:

- Sadržaj cijanovodonične kiseline u ko-ekstrudatu (HCN)
- Sadržaj α -linolenske kiseline u ko-ekstrudatu (ALA)
- Sadržaj slobodnih masnih kiselina kao pokazatelj kiselosti masne faze ko-ekstrudata (SMK)
- Potrošnja energije (E)

Iako to vrlo često predstavlja problem, u ovom radu su, na osnovu prikupljenih podataka, uspešno razvijeni modeli koji su se dobro uklopili sa eksperimentalnim rezultatima. U tabeli 4.14 prikazani su rezultati analize varijanse modelovanih odziva. Da bi se za model moglo reći da dobro predviđa eksperimentalne podatke, *F-vrednost* za svaki od odziva ne sme biti niža od granične, koja za primenjeni eksperimentalni dizajn iznosi 2,6169. U slučaju svih razvijenih modela za ovaj eksperiment, pomenuti uslov je ispunjen, što znači da svaki od modela dobro predviđa eksperimentalne podatke.

Tabela 4.14 Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	DF	SS	MS	DF	SS	MS	<i>F-vrednost</i>	<i>p-vrednost</i>	R^2
HCN	12	3032,20	252,69	15	167504,9	11166,99	44,18303	< 0,000001	0,82
ALA	12	3,32	0,277	15	61810,2	4120,681	14874,09	< 0,000001	0,82
SMK	12	43,44	3,62	15	9014,888	600,9925	166,0185	< 0,000001	0,95
E	12	5150	429,20	15	1051505	70100,34	123,3264	< 0,000001	0,90

Vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) su takođe relativno visoke, što ukazuje na dobro uklapanje eksperimentalnih rezultata u polinom drugog reda. Niske *p-vrednosti* dobijene za sve odzive ukazuju da je model polinoma drugog reda značajan pri nivou značajnosti od 95 % ($p \leq 0.05$).

Na osnovu poželjnih vrednosti odabranih odziva, bilo je potrebno odrediti odgovarajuću vlagu materijala, brzinu obrtanja puža ekstrudera, kapacitet punjenja ekstrudera i ukupnu površinu otvora na matrici, pri kojima bi odzivi dostigli svoje maksimalne, odnosno minimalne vrednosti, u zavisnosti potrebe. Pri optimizaciji je

odabrana ona kombinacija promjenljivih parametara, uz koje je ukupna poželjna funkcija bila što veća. Ukupna poželjna funkcija može da ima vrednosti od 0 do 1.

Svakom od pojedinačnih odziva dodeljen je faktor značajnosti ili prioritet, rangiran od 1 do 5. U tabeli 4.15 prikazani su rezultati optimizacije ekstrudiranja uz različite dodeljene značajnosti odziva, kako bi se bolje objasnio sam postupak optimizacije.

Kada bi se svakom od odziva dodelila jednaka značajnost (prioritet) 3, vidi se da bi uslovi ekstrudiranja bili vrlo bliski svojim najvišim nivoima postavljenim u eksperimentalnom dizajnu, osim vlage polaznog materijala. U slučaju da najveću značajnost dodelimo sadržaju ALA u ko-ekstrudatu (5), pri čemu zanemarimo potrošnju energije (1), vidimo da bi ukupna površina otvora na matrici bila maksimalna (59,40 mm²), kapacitet punjenja ekstrudera bi trebao da bude najmanji (16 kg/h), dok bi vlaga materijala trebalo da iznosi 11,77 %. Sa druge strane, ukoliko bismo kao najznačajniju posmatrali potrošnju energije i dodelili joj značajnost 5, uz najmanju značajnost sadržaja HCN (1), vidimo da bi kapacitet punjenja i ukupna površina otvora matrice trebali da budu podešeni na svoje najviše nivoe, uz brzinu obrtanja puža od 469,45 o/min i vlagu materijala od 12,25 %.

Tabela 4.15 Rezultati optimizacije procesa ekstrudiranja uz različite značajnosti odziva

Faktori značajnosti				Vlaga	Brzina	Kapacitet	Ukupna	Ukupna
HCN	ALA	SMK	E	materijala (%)	obrtanja puža (o/min)	punjenja (kg/h)	površina otvora matrice (mm ²)	poželjna funkcija
3	3	3	3	12,23	458,75	31,76	59,16	0,89
5	3	3	1	11,69	400,23	16	59,40	0,90
3	5	3	1	11,77	396,77	16	59,40	0,90
1	3	3	5	12,25	469,45	32	58,60	0,96

U postavljenom eksperimentu, faktori značajnosti su dodeljeni pojedinačnim odzivima na način koji je prikazan u tabeli 4.16. Pri dodeli prioriteta odzivima vodilo se

računa o cilju proizvodnje funkcionalnog hraniva, njegovom nutritivnom kvalitetu, bezbednosti upotrebe u ishrani životinja i utrošenoj energiji u procesu proizvodnje.

Jedan od osnovnih razloga primene ekstrudiranja za proizvodnju predstavljenog funkcionalnog hraniva bio je redukcija cijanogenih glikozida, koja je praćena preko sadržaja HCN u ko-ekstrudatu. Stoga je pri optimizaciji bilo poželjno da sadržaj HCN ima minimalnu vrednost. Funkcionalno hranivo proizvedeno je u svrhu povećanja sadržaja omega-3 masnih kiselina, pa je poželjan bio maksimalan sadržaj α -linolenske kiseline.

Dobro je poznato da su slobodne masne kiseline reaktivnije od onih koje su vezane u trigliceridima i da lakše podležu okidacionim procesima. S obzirom da je proces lipidne oksidacije nepoželjan i da negativno utiče na kvalitet i organoleptičke osobine proizvedenog ko-ekstrudata, prilikom optimizacije procesa težilo se da sadržaj slobodnih masnih kiselina bude minimalan. Utrošak energije tokom ekstrudiranja je pri optimizaciji takođe postavljen na minimalan nivo.

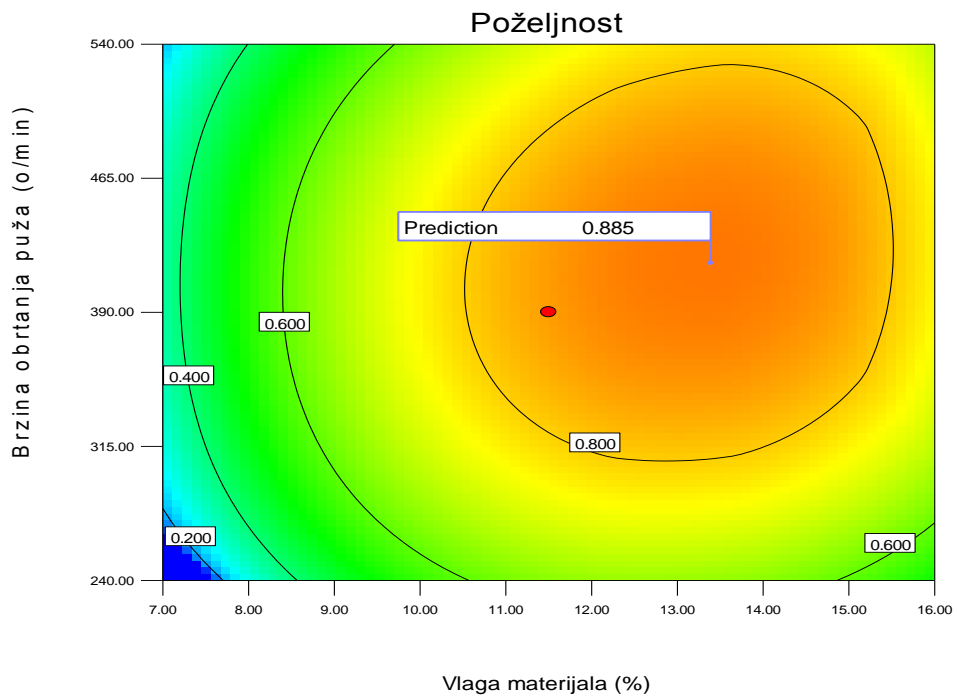
U tabeli 4.16 date su i optimalne vrednosti promenljivih parametara procesa ekstrudiranja.

Tabela 4.16 Rezultati optimizacije procesa ekstrudiranja na osnovu odabrane značajnosti odziva

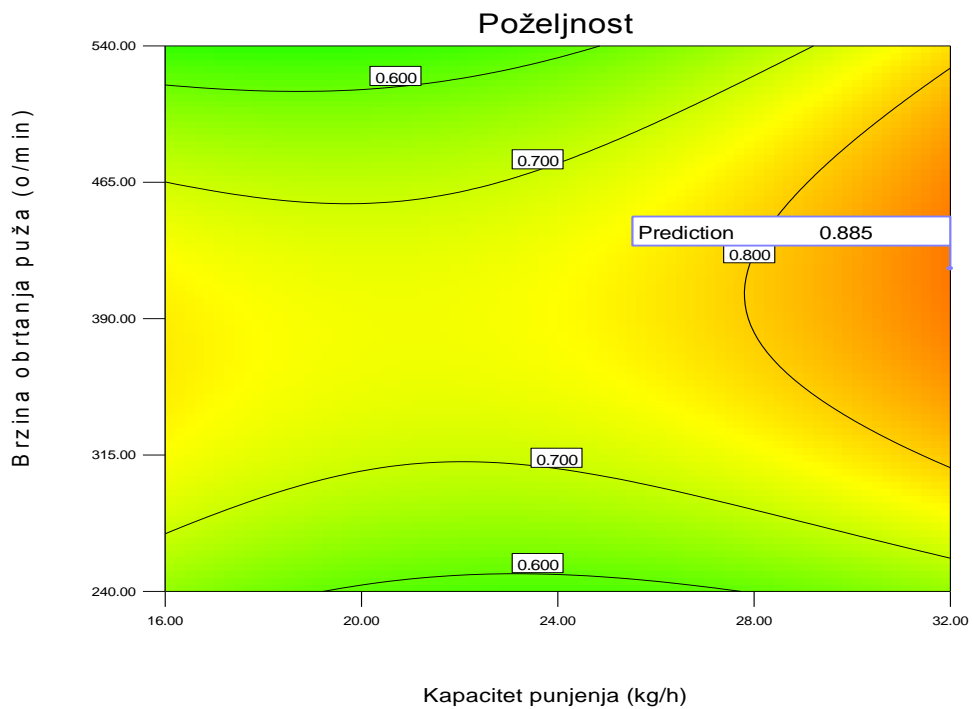
	Odzivi				Vlaga materijala (%)	Brzina obrtanja puža (o/min)	Kapacitet punjenja (kg/h)	Ukupna površina otvora matrice (mm ²)	Ukupna poželjna funkcija
	E	ALA	SMK	HCN					
Faktor značajnosti	4	3	4	5	13,39	417,41	32	19,80	0,89
Ciljana vrednost	min.	max.	min.	min.					

Sadržaju α -linolenske kiseline dodeljen je faktor značajnosti 3, jer je gubitak ove omega-3 masne kiseline tokom eksperimenata maksimalno iznosio svega 3,71 % (razlika između najvišeg i najnižeg sadržaja ALA u proizvedenim ko-ekstrudatima). Na osnovu toga, zaključeno je da će i pri srednjem nivou faktora značajnosti, sadržaj ALA biti dovoljno visok.

Na slikama 4.23 i 4.24 je prikazana zavisnost ukupne poželjne funkcije od vrednosti parametara ekstrudiranja. Na slici 4.23 se može videti da je vrednost ukupne poželjne funkcije maksimalna (0,89) pri optimalnoj brzini obrtanja puža od 417,41 o/min i vlazi materijala od 13,39 % (slika 4.23a), odnosno optimalnom kapacitetu punjenja od 32 kg/h (4.23b). Na slici 4.24a može se videti da je vrednost ukupne poželjne funkcije najveća pri najmanjoj ukupnoj površini otvora na matrici (19,80 mm²), što je ujedno i optimalna ukupna površina otvora na matrici.

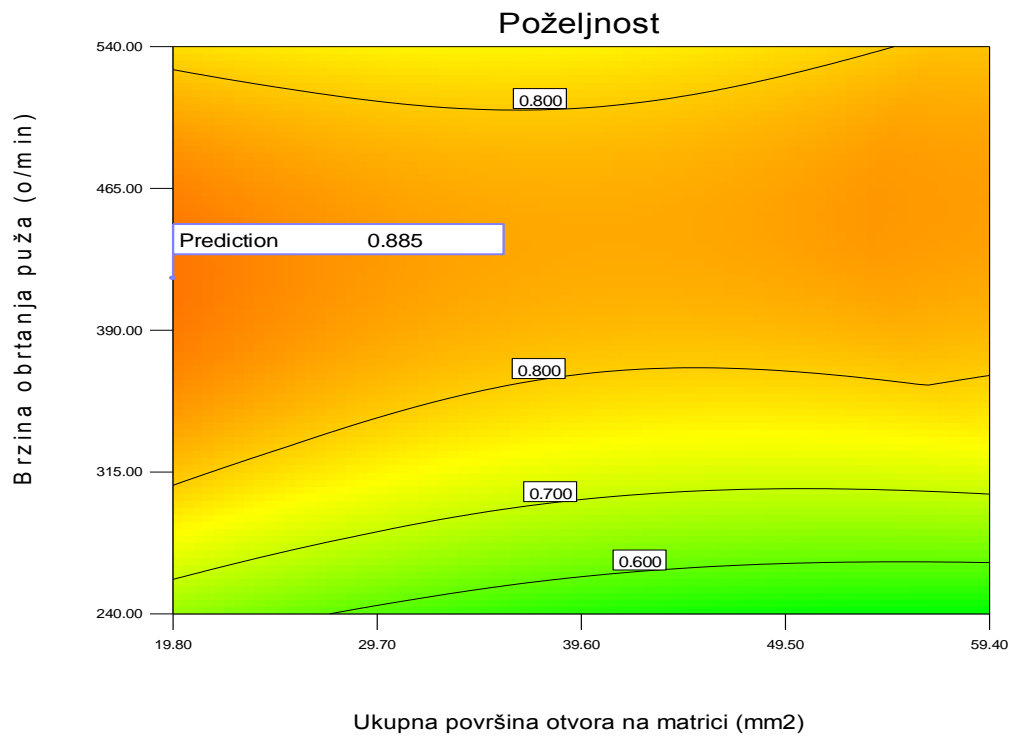


(a)

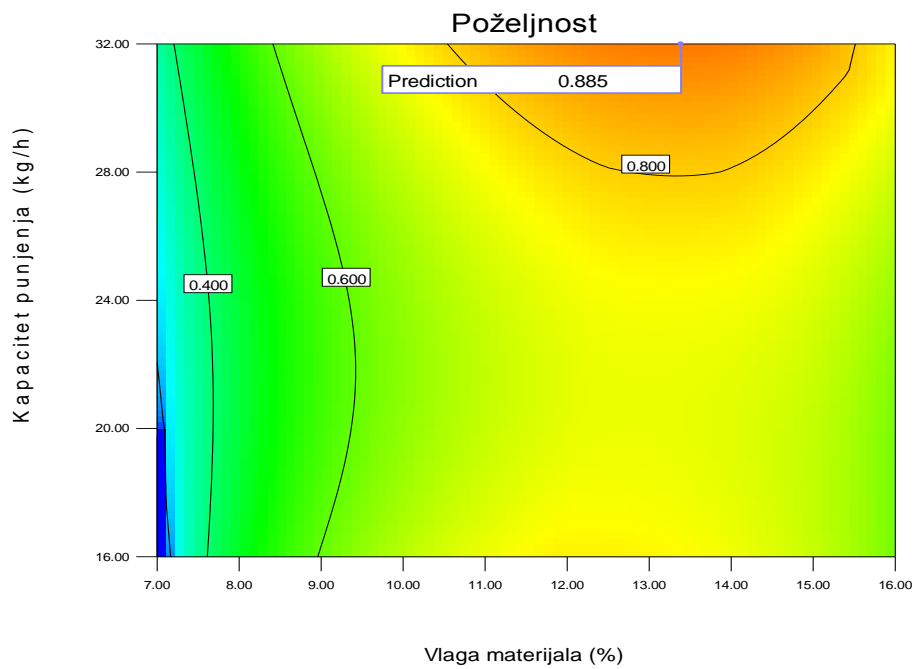


(b)

Slika 4.23 Zavisnost ukupne poželjne funkcije od vrednosti parametara ekstrudiranja: vlage materijala i brzine obrtanja puža (a), odnosno vlage materijala i kapaciteta punjenja (b)



(a)



(b)

Slika 4.24 Zavisnost ukupne poželjne funkcije od vrednosti parametara ekstrudiranja: brzine obrtanja puža i ukupne površine otvora matrice (a), odnosno vlage materijala i kapaciteta punjenja (b)

U tabeli 4.17 prikazane su predviđene vrednosti odziva na osnovu odabranih optimalnih parametara procesa ekstrudiranja. Potom su optimalni parametri praktično primenjeni u proizvodnji funkcionalnog hraniva i izmerene su realne vrednosti odziva upotrebljenih u optimizaciji (tabela 4.17).

Tabela 4.17 Predviđene i izmerene vrednosti odziva pri odabranim optimalnim uslovima ekstrudiranja

	HCN (mg/kg)	ALA (%)	SMK (%)	Potrošnja energije (kWh/t)
Predviđene vrednosti	43,48	48,51	3,04	135,63
Izmerene vrednosti	45,01	48,43	3,28	137,03

Stepen uklanjanja HCN u funkcionalnom hranivu ekstrudiranom pod optimalnim uslovima iznosio je 76,20 %. Ukoliko se u izrazu za izračunavanje stepena uklanjanja HCN umesto izmerene, upotrebi predviđena vrednost HCN, stepen uklanjanja iznosiće 76,97 %, što znači da relativna greška modela u ovom slučaju iznosi 1,01 %. Za potrošnju energije, relativna greška modela iznosi 1,39 %, za sadržaj ALA 0,16 %, a za SMK vrednost 7,31 %.

Ko-ekstrudat dobijen pod optimalnim uslovima imao je osnovni hemijski sastav dat u tabeli 4.18, a njegov izgled prikazan je na slici 4.25.

Tabela 4.18 Osnovni hemijski sastav proizvedenog ko-ekstrudata

	Sadržaj (% s.m.)	Standardna devijacija (SD)
Proteini	30,31	± 0,01
Mast	20,57	± 0,01
Pepeo	5,09	± 0,02
Sirova vlakna	10,12	± 0,09

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja

Prema hemijskom sastavu proizvedenog ko-ekstrudata, vidi se da ovo hranivo po svom sadržaju proteina (30,31 % s.m., odnosno 28,53 % na ukupnu masu uzorka) može parirati sačmi od delimično oljuštenog semena suncokreta II kvaliteta (Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje 2010). Hranivo poseduje visok sadržaj masti (20,57 % s.m.),

pa se može posmatrati istovremeno i kao izvor proteina i kao izvor energije u ishrani životinja.



Slika 4.25 Izgled proizvedenog ko-ekstrudata

U tabeli 4.19 upoređeni su masnokiselinski sastavi netretirane smeše lanenog semena i suncokretove sačme i ko-ekstrudata proizvedenog pri optimalnim uslovima.

Tabela 4.19 Masnokiselinski sastav netretirane smeše i ko-ekstrudata dobijenog pri optimalnim uslovima

Masna kiselina	Udeo masne kiseline (%) u ukupnim masnim kiselinama	
	Netretirana smeša	Ko-ekstrudat
C 14:0	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,02
C16:0	5,70 ± 0,04	5,93 ± 0,01
C16:1	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01
C18:0	4,30 ± 0,02	4,89 ± 0,04
C18:1 <i>n</i> 9	24,11 ± 0,11	25,49 ± 0,11
C18:2 <i>n</i> 6	16,66 ± 0,08	15,13 ± 0,09
C18:3 <i>n</i> 3	49,12 ± 0,12	48,43 ± 0,10
SFA	10,04	10,86
MUFA	24,18	25,57
PUFA	65,78	63,56
PUFA/SFA	6,65	5,85

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja ± SD

Kako se vidi iz dobijenih rezultata, sadržaj ALA nakon ekstrudiranja se smanjio za 0,69 % u odnosu na netretiranu smešu sirovina, a ova razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,11$). Isto se može primetiti i za omega-6 linolnu kiselinu (C18:2 n6). Dok se sadržaj pomenute dve masne kiseline nakon ekstrudiranja smanjio, sadržaj oleinske kiseline se povećao za 1,38 %.

Uticao ekstrudiranja na masnokiselinski sastav tretiranog materijala nije mnogo obrađivan u literaturi. Nekoliko literaturnih navoda pokazuje da je promena sastava masnih kiselina u sirovinama nakon ekstrudiranja neznatna. *Wicklud* i *Mangus* su ekstrudirali ovseno brašno upotrebljavajući dvopužni ekstruder pri različitim temperaturama i sadržajima vlage u materijalu. Zaključili su da je proces ekstrudiranja značajno uticao na raspodelu palmitinske, oleinske i linolne kiseline u ekstraktima dobijenim primenom različitih postupaka (ekstrakcija u dietil etru ili u smeši hloroforma, metanola i vodom zasićenog butanola), ali se kompletan sastav masnih kiselina u samom uzorku nije značajno promenio (*Wicklud et Mangus*, 1997).

Optimizacijom procesa ekstrudiranja dobijeno je hranivo sa funkcionalnim karakteristikama, koje se može upotrebljavati u ishrani životinja u cilju povećanja sadržaja n-3 masnih kiselina u hrani za životinje, a posredno i u animalnim proizvodima. Pri optimizovanim uslovima, sadržaj HCN u ko-ekstrudatu snižen je na nivo bezbedan po zdravlje životinja, pa njegova upotreba ne bi predstavljala potencijalnu opasnost. Količina hraniva koja bi se u ishrani životinja mogla upotrebljavati, zavisi od vrste životinje, kao i od njene starosti. Prema još neobjavljenim rezultatima Istraživačkog centra za tehnologiju hrane za životinje i proizvode animalnog porekla, Naučnog insituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, u ishrani brojlera bezbedno se može upotrebljavati do 10 % ko-ekstrudata. Preporučuje se da se sa dodatkom ko-ekstrudata počne najranije u smešu za tov pilića II. U ishrani tovnih svinja, ne preporučuje se dodatak ko-ekstrudata u količinama većim od 10%, kao ni u ishrani najmlađih kategorija. Sa dodatkom ko-ekstrudata dovoljno je početi u završnoj fazi tova, odnosno kod jedinki mase od 60 do 100 kg.

4.8 Ispitivanje skladišne stabilnosti proizvedenog ko-ekstrudata

4.8.1 Promene peroksidnog broja i kiselosti ko-ekstrudata u periodu skladištenja

S obzirom da je sadržaj masti u dobijenom ko-ekstrudatu iznosio 20,57 % (s.m.), najznačajniji parametri održivosti ovog proizvoda bili su oni koji ukazuju na stabilnost masne faze. Zbog toga se prilikom skladištenja ko-ekstrudata u klima komori pratila promena peroksidnog broja, kao merilo prisustva primarnih produkata lipidne oksidacije (peroksida i hidroperoksida), uz istovremeno svakodnevno beleženje promene kiselosti proizvoda, to jest SMK. Drugi parametar meren je kako bi se utvrdilo da li dolazi do oslobađanja masnih kiselina iz triglicerida u proizvodu. Slobodne masne kiseline pokazuju izuzetnu reaktivnost, pa je cilj je bio da se ispita da li neka od dodatih komponenti ima uticaj i na promenu sadržaja SMK tokom skladištenja, pored antioksidativnog dejstva.

U tabeli 4.20 prikazana je promena peroksidnog broja u uzorcima ko-ekstrudata sa i bez dodatih antioksidanasa u toku skladištenja. Najviša vrednost peroksidnog broja u toku skladištenja izmerena je kod kontrolnog uzorka i iznosila je 46,32 mmol/kg masne faze (m.f.). Kontrolni uzorak, uzorak sa dodatkom karvakrola i dodatkom smeše karvakrola i vitamina E, pokazuju nagli skok peroksidnog broja četvrtog dana skladištenja. Kod uzorka sa dodatkom vitamina E, nagli skok počinje četvrtog dana skladištenja, ali se maksimalna vrednost peroksidnog broja (36,55 mmol/kg m.f.) beleži petog dana.

Antioksidansi vitamin E, karvakrol, kao i njihova smeša dodati su uzorcima ne bi li se ispitalo njihovo antioksidativno dejstvo na ovaj specifičan proizvod. Poznato je da antioksidativno dejstvo istog jedinjenja može biti različito u zavisnosti od supstrata na koji je primenjeno. Kao što se sa slike može videti, najniža vrednost peroksidnog broja u maksimumu izmerena je kod uzorka sa dodatkom vitamina E (36,55 H₂O₂/kg m.f.), što vodi do zaključka da je vitamin E pokazao bolje antioksidativno dejstvo od karvakrola (maksimalna vrednost peroksidnog broja je 38,18 mmol/kg m.f.). Isto tako, uzorak sa

dotatkom vitamina E dostiže najvišu vednost peroksidnog broja petog dana, što pokazuje da je proces oksidacije masti u ovom uzorku usporen u odnosu na ostale.

Tabela 4.20 Promena peroksidnog broja u uzorcima tokom skladištenja u klima komori

Dan skladištenja	Uzorak			
	Kontrola	Kontrola + karvakrol	Kontrola + vitamin E	Kontrola + vitamin E + karvakrol
0	0,92	0,92	0,92	0,92
1	1,3	0,93	0,92	0,94
2	4,57	4,81	2,53	4,41
3	5,58	5,88	4,2	6,59
4	46,32	38,18	17,02	40,84
5	16,95	13,18	36,55	24,69
6	1,54	3,57	14,66	3,05
7	1,76	3,89	1,92	3,06
8	2,05	4,12	2,14	3,31
9	2,69	4,48	2,27	3,46
10	2,23	2,67	2,41	3,62
11	1,89	2,08	2,65	3,99
12	1,64	1,87	2,91	4,12
13	1,66	1,91	2,5	4,01

Nakon postignutih maksimalnih vrednosti, peroksidni broj u svim ispitivanim uzorcima opada. Ova pojava se objašnjava na sledeći način. Primarni produkti oksidacije su nestabilna jedinjenja, vrlo podložna daljoj oksidaciji, tj. razgradnji do sekundarnih produkata, kao što su aldehidi, ketoni, niži alkoholi, itd, jedinjenja koja daju neprijatan, užegao miris, karakterističan za oksidovanu mast (*Shaidi, 2002, Nawar, 1998*). Stoga će, nakon određenog vremena, doći do pada peroksidnog broja, što

označava momenat kada razlaganje primarnih produkata (formiranje sekundarnih proizvoda oksidacije) postane višestruko brže od njihovog nastajanja.

U tabeli 4.21 prikazane su statističke značajnosti razlika vrednosti peroksidnog broja između uzoraka u okviru istog dana skladištenja. Iz tabele se može videti da je peroksidni broj svih uzoraka sa dodatim antioksidansima statistički značajno niži ($p \leq 0,05$) od kontrolnog uzorka već nakon prvog dana skladištenja (0,92, 0,93 i 0,94 mmol/kg m.f. u odnosu na 1,3 mmol/kg m.f., tj. 0,18 mmol/kg uzorka u odnosu na 0,27 mmol/kg uzorka). Takođe se uočava da je do momenta postizanja maksimalnih vrednosti peroksidnog broja, statistički najznačajnija razlika između kontrolnog uzorka i uzorka sa dodatim vitaminom E (najniže p -vrednosti) u poređenju sa ostalim uzorcima, što je još jedna potvrda da je vitamin E pokazao najizraženije antioksidativno dejstvo na primenjeni supstrat ko-ekstrudata. Isto tako, vidi se da su razlike u vrednostima peroksidnog broja između uzoraka sa dodatim antioksidansima do postizanja maksimalnih vrednosti statistički značajne ($p \leq 0,05$).

Zanimljivo je još i da dodatak smeše vitamina E i karvakrola nije pokazao povećanu antioksidativnu aktivnost, već je ona, naprotiv, bila manja od aktivnosti svake pojedinačne komponente odvojeno. Ovde se, dakle, ne može govoriti o sinergističkom dejstvu dva antioksidansa, što je bio cilj prilikom dodavanja smeše ova dva jedinjenja u uzorak. Stiče se utisak da je jedno jedinjenje inhibiralo antioksidativno dejstvo drugog, tj. da se ponašalo kao prooksidans. U literaturi je poznato da antioksidansi mogu pokazati pro-oksidativno dejstvo. Tako su, na primer, *Kontush* i saradnici dokazali pro-oksidativno dejstvo α -tokoferola kod lipoproteina male gustine izolovanih iz organizma zdravih pacijenata (*Kontush et al*, 1996). Pro-oksidativno dejstvo fenolnih jedinjenja objašnjava se nastajanjem semihinonskih ili superoksidnih radikala ($O_2^{\cdot-}$) u procesu autooksidacije. Ovi radikali su veoma reaktivni i dalje ubrzavaju autooksidaciju fenola do nastajanja H_2O_2 (*Mochiuzuki et al*, 2002). Prisustvo prelaznih metala u substratu umanjuje antioksidativno dejstvo fenolnih jedinjenja.

Prema istraživanjima *Baucharta*, ekstrudirano čisto laneno seme se u ishrani životinja može bezbedno upotrebljavati, sa zdravstvenog aspekta, najduže 15 dana nakon proizvodnje, ukoliko je proizvod skladišten u normalnim uslovima ($t = 25\text{ }^\circ\text{C}$ i $p = 1\text{ bar}$). Zbog ovako kratkog roka trajnosti, *Bauchart* smatra da je upotreba antioksidanasa neophodna u proizvodnji hraniva na bazi lanenog semena, a njihovo

prisustvo pozitivno utiče i na kvalitet mesa životinja koje ih konzumiraju (*Bauchart*, 2012). Literaturni podaci pokazuju da je skladišna stabilnost netretiranog lanenog semena duža, što je i očekivano, s obzirom na uslove kojima je sirovina u procesu ekstrudiranja bila izložena. Takođe se zna da je celo laneno seme otpornije na oksidativne promene od samlevenog (*Chen*, 1994).

Pri uslovima skladištenja koji su u eksperimentu primenjeni ($t = 63 \pm 2$ °C i rel. vlažnost vazduha = 40 %), svi uzorci su za veoma kratko vreme od 4-5 dana dostigli visoke vrednosti peroksidnog broja masne faze (kontrolni uzorak – 46,32 mmol/kg, uzorak sa karvakrolom – 38,18 mmol/kg, uzorak sa vitaminom E – 36,55 mmol/kg i uzorak sa vitaminom E i karvakrolom – 40,84 mmol/kg). Ovakvi rezultati u skladu su sa literaturinim podacima. *Michotte* i saradnici su u svojim ispitivanjima stabilnosti rafinisanog lanenog ulja, pri temperaturi od 60 °C izmerili izuzetno visoku vrednost peroksidnog broja od preko 60 meq/kg (30 mmol/kg) u kontrolnom uzorku, odnosno između 30 i 60 meq/kg (15 i 30 mmol/kg) u uzorcima sa dodatim antioksidanskima nakon svega 6 dana skladištenja (*Michotte et al.*, 2011). Pomenuti ispitivani uzorci su nakon dvanaest dana skladištenja pokazali raznolike rezultate peroksidnog broja, od kojih su neki opali, dok su drugi skočili. Razlog za ovo je razlaganje primarnih produkata peroksidacije, ali kako merenja peroksidnog broja u ovom radu nisu izvođena svakodnevno, ne zna se kada je do intenzivne razgranje primarnih produkata peroksidacije došlo. U ispitivanjima oksidativne stabilnosti kukuruznog brašna primenom *Schaal*-ovog testa, peroksidni broj masne faze uzorka porastao je na 20 meq/kg (10 mmol/kg) nakon deset dana skladištenja. Uzorci su sadržali 4,6 % masti, a poznato je da je kukuruz sadrži tek oko 1 % ALA što ga čini manje podložnim oksidaciji od lanenog semena (*López-Duarte et Vidal-Quintanar*, 2009).

Odnos vremenskog perioda skladištenja pod *Schaal*-ovim uslovima i na sobnoj temperaturi zavisi od proizvoda koji se ispituje, kao i od načina njegovog pakovanja. *Warner* i saradnici su u svojim ispitivanjima rafinisanih jestivih ulja (sojinog, suncokretovog i repičinog ulja sa niskim sadržajem eruka kiseline) došli do podatka da jedan dan skladištenja ovih ulja u *Schaal*-ovom testu po senzornim karakteristikama odgovara jednom mesecu skladištenja na sobnoj temperaturi (*Warner et al.*, 1989). Rezultati ispitivanja oksidativne stabilnosti sirovog sojinog ulja pokazuju da 5 dana

skladištenja na temperaturi od 60 °C odgovara vremenskom periodu od četiri nedelje skladištenja na sobnoj temperaturi (*Yang et al., 2005*).

Tabela 4.21 Statističke značajnosti razlika vrednosti peroksidnog broja između uzoraka u okviru istog dana skladištenja

	K	K+kar.	K+ vit. E	K+vit. E+kar.		K	K+kar.	K+vit. E	K+vit. E+kar.		
Dan 1	K		0,0003	0,0003	Dan 8	K		0,318	0,068		
	K+ kar.	0,0003		0,935		K+ kar.	0,004		0,002	0,027	
	K+vit. E	0,0003	0,934			0,597	K+ vit. E	0,318	0,002		0,016
	K+vit. E+kar.	0,0003	0,874	0,597		K+vit. E+kar.	0,068	0,027	0,016		
Dan 2	K		0,218	0,0003	0,439	Dan 9	K		0,036	0,675	0,954
	K+ kar.	0,218		0,0003	0,049		K+ kar.	0,036		0,016	0,053
	K+ vit. E	0,0003	0,0003		0,0004		K+ vit. E	0,675	0,016		0,441
	K+vit. E+kar.	0,439	0,049	0,0004			K+vit. E+kar.	0,954	0,053	0,441	
Dan 3	K		0,075	0,0005	0,001	Dan 10	K		0,011	0,186	0,0004
	K+ kar.	0,075		0,0004	0,004		K+ kar.	0,011		0,067	0,001
	K+ vit. E	0,0005	0,0004		0,0003		K+ vit. E	0,186	0,067		0,0004
	K+vit. E+kar.	0,001	0,004	0,0003			K+vit. E+kar.	0,0004	0,001	0,0004	
Dan 4	K		0,0003	0,0002	0,0004	Dan 11	K		0,454	0,009	0,0004
	K+ kar.	0,0003		0,0002	0,004		K+ kar.	0,45		0,027	0,0005
	K+ vit. E	0,0002	0,0002		0,0002		K+ vit. E	0,009	0,027		0,001
	K+vit. E+kar.	0,0004	0,004	0,0002			K+vit. E+kar.	0,0004	0,0005	0,001	
Dan 5	K		0,0003	0,0003	0,0003	Dan 12	K		0,996	0,649	0,790
	K+ kar.	0,0003		0,0003	0,0003		K+ kar.	0,996		0,760	0,886
	K+ vit. E	0,0003	0,0003		0,0003		K+ vit. E	0,649	0,760		0,991
	K+vit. E+kar.	0,0003	0,0003	0,0003			K+vit. E+kar.	0,790	0,886	0,991	
Dan 6	K		0,002	0,0003	0,004	Dan 13	K		0,892	0,228	0,009
	K+ kar.	0,002		0,0003	0,151		K+ kar.	0,892		0,446	0,014
	K+ vit. E	0,0003	0,0003		0,0003		K+ vit. E	0,228	0,446		0,044
	K+vit. E+kar.	0,004	0,151	0,0003			K+vit. E+kar.	0,009550	0,014	0,044	
Dan 7	K		0,002	0,0003	0,004						
	K+ kar.	0,002		0,0003	0,151						
	K+ vit. E	0,0003	0,0003		0,0003						
	K+vit. E+kar.	0,004	0,151	0,0003							

K – kontrolna, K + kar. – kontrola + karvakrol, K+vit.E – kontrola +vitamin E, K+vit. E + kar. – kontrola + vitamin E + karvakrol

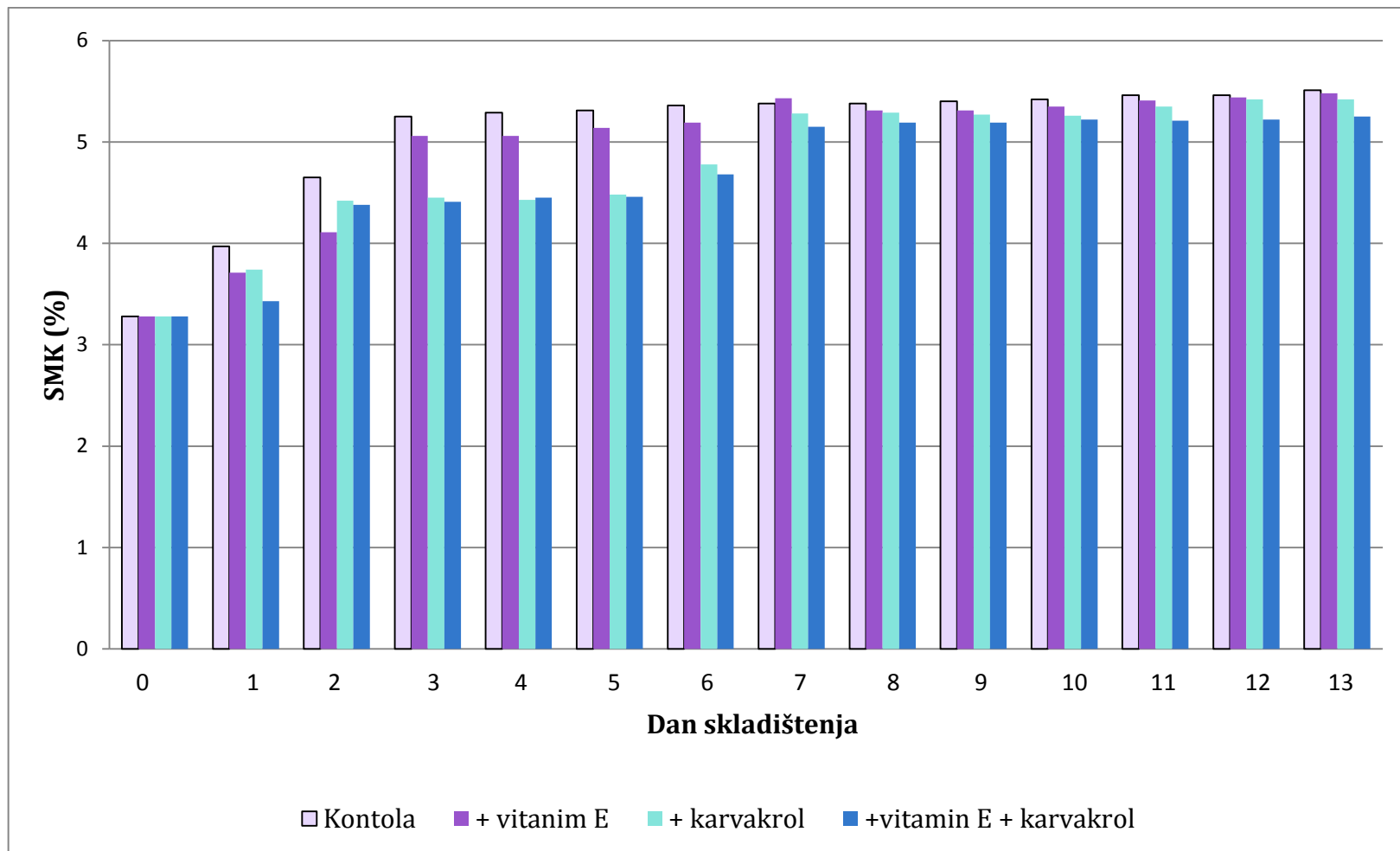
Promena SMK u masnoj fazi ispitivanih uzoraka u toku skladištenja prikazana je na slici 4.26. Kao što se može videti, SMK je u masnoj fazi proizvoda statistički značajno ($p \leq 0,05$) rasla u toku skladištenja, ali je najmanji porast (od 3,28 % do 5,25 %) zabeležen u uzorku sa dodatkom smeše karvakrola i vitamina E. U kontrolnom uzorku, SMK se povećala sa 3,28 % na 5,51 %. Do šestog dana skladištenja, SMK je u uzorcima sa dodatkom karvakrolom i smešom karvakrola i vitamina E (4,68 % i 4,78 %, redom) bio niži od SMK u uzorku kojem je dodat samo vitamin E (5,19 %). Poslednjeg dana skladištenja, vrednosti SMK u uzorcima sa dodatim vitaminom E i karvakrolom su se gotovo izjednačile (5,48 % i 5,42 %) i nisu se statistički značajno razlikovale ($p = 0,08$). U kontrolnom uzorku, SMK je do trećeg dana dostigla vrednost od 5,25 %, a potom se do kraja skladištenja ova vrednost povećala za svega 0,26 %. Slična pojava stabilizacije SMK uočena je i kod ostalih uzoraka.

Vrednost SMK u proizvodu je na početku skladištenja iznosila 0,67 %, a na kraju 1,15%. Do povećanja SMK u uzorcima tokom skladištenja najverovatnije je došlo zbog oštećenja semena tokom mlevenja, a potom i tokom procesa ekstrudiranja. Oštećena semena podložnija su lipolitičkim aktivnostima endogenih enzima, kao što je biljna lipaza, pa lakše dolazi do razgranje triglicerida. (*Dierick et Decuypere, 2002; Malcolmson et al., 2000*). Primarni produkti lipolize su slobodne masne kiseline koje dalje učestvuju u oksidaciji masnih kiselina (*O'Connor et al., 1992*). Slične rezultate u svojim ispitivanjima dobili su *Malcolmson* i saradnici, koji su takođe utvrdili da je prilikom skladištenja neekstrudiranog mlevenog lanenog semena upakovanog u natron vreće sa unutrašnjim plastičnim slojem, nepropustljivim na vazduh i svetlost pri temperaturi od 23 ± 2 °C došlo do porasta SMK, tako da se SMK vrednost nakon 128 dana skladištenja utrostručila (*Malcolmson et al., 2000*). Od sedmog dana skladištenja gotovo da nema nikakvih promena u sadržaju SMK. Razlog za to je inaktivacija enzima lipaze usled dugog izlaganja materijala temperaturi od 63 ± 2 °C.

Ispitivanjem uticaja antioksidanasa na SMK bavilo se nekoliko grupa naučnika, a u svojim radovima su prezentovali različite rezultate. *Hettiarachy* i *Barr* su pokazali da dodatak limunske kiseline i L-askorbil-6-palmitata, pojedinačno, ili u kombinaciji usporava povećanje SMK u skladištenim uzorcima samlevenog lanenog semena na temperaturi od 26 °C. *Rahman* i saradnici su ispitivali uticaj BHA, BHT i PG na SMK i peroksidni broj sezamovog ulja tokom skladištenja. Prema njihovim rezultatima, pri

dotatku BHA, izmerene su najniže vrednosti SMK i peroksidnog broja. BHT se pokazao kao pogodniji za sprečavanje porasta SMK, dok je PG pokazao intenzivnije dejstvo u sprečavanju nastanka primarnih produkata peroksidacije (*Rahman et al.*, 2008).

Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje Republike Srbije (2010) ne propisuje maksimalne vrednosti kiselosti za kompletne smeše, kao ni za većinu hraniva biljnog porekla. Pomenutim pravilnikom propisane su maksimalno dozvoljene vrednosti kiselinskog broja za mesno koštano brašno i riblje brašno (40 mg KOH/g, tj. 20 % oleinske kiseline), mast, loj i pogače (40 mg KOH/g, tj. 20 % oleinske kiseline), brašno od otpadaka pri klanju (50 mg KOH/g, tj. 25 % oleinske kiseline) i mast od otpadaka pri klanju (40 mg KOH/g, tj. 20 % oleinske kiseline).



Slika 4.26 Promena SMK u masnoj fazi uzoraka tokom skladištenja u klima komori

4.8.2 Masnokiselinski sastav ko-ekstrudata u periodu skladištenja

S obzirom na visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina u ko-ekstrudatu, naročito ALA, u periodu skladištenja pristupilo se ispitivanju promene masnokiselinskog sastava. Takođe je bilo neophodno utvrditi, da li dodati vitamin E i karvakrol imaju uticaja na promenu sadržaja pojedinih masnih kiselina. U tabelama 4.22, 4.23, 4.24 i 4.25 prikazani su kompletni sastavi masnih kiselina svih uzoraka u toku čuvanja u klima komori.

Tabela 4.22 Promena masnokiselinskog sastava kontrolnog uzorka tokom skladištenja

Uzorak	Dan skladištenja	Sastav masnih kiselina (% u ukupnim masnim kiselinama)						
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 n6	C18:3n3
Kontrola	0	0,04	5,93	0,08	4,89	25,49	15,13	48,43
	1	0,05	6,05	0,10	4,69	25,25	15,79	48,07
	2	0,06	6,39	0,13	4,55	25,16	15,69	48,02
	3	0,06	6,38	0,09	4,65	25,14	15,73	47,96
	4	0,11	6,20	0,08	4,66	25,46	15,64	47,85
	5	0,05	6,20	0,07	4,67	25,62	15,60	47,79
	6	0,04	6,19	0,08	4,65	25,64	15,69	47,71
	7	0,07	6,23	0,07	4,69	25,69	15,60	47,65
	8	0,06	6,20	0,09	4,70	25,68	15,64	47,63
	9	0,05	6,24	0,06	4,65	25,75	15,59	47,63
	10	0,06	6,20	0,07	4,64	25,76	15,67	47,60
	11	0,05	6,25	0,08	4,50	25,80	15,71	47,61
	12	0,05	6,21	0,04	4,51	25,87	15,63	47,60
13	0,06	6,24	0,06	4,62	25,88	15,62	47,52	

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja za svaki uzorak

Kao što se iz tabele 4.18 može videti, sastav masnih kiselina se u kontrolnom uzorku nije značajno promenio. Ipak, primećeno je da sa vremenom skladištenja sadržaj ALA opada, tako da je nultog dana skladištenja iznosio 48,43 %, a nakon trinaest dana udeo se smanjio na 47,52 %. U ovom slučaju ne može se govoriti o statistički značajnoj promeni

($p = 0,13$), ali je ona zabeležena. Do smanjenja sadržaja ALA došlo je najverovatnije zbog oksidacije masnih kiselina.

Tabela 4.23 Promena masnokiselinskog sastava uzorka dodatkom vitamina E tokom skladištenja

Uzorak	Dan skladištenja	Sastav masnih kiselina (% u ukupnim masnim kiselinama)						
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 n6	C18:3n3
Ko-ekstrudat + vitamin E	0	0,04	5,93	0,08	4,89	25,49	15,13	48,43
	1	0,05	6,05	0,09	4,90	25,44	15,20	48,27
	2	0,08	6,12	0,14	4,91	25,41	15,22	48,12
	3	0,10	6,14	0,18	4,90	25,46	15,23	47,99
	4	0,12	6,16	0,17	4,89	25,37	15,30	47,85
	5	0,13	6,14	0,19	4,91	25,48	15,36	47,79
	6	0,10	6,20	0,07	4,87	25,57	15,42	47,77
	7	0,10	6,21	0,09	4,87	25,59	15,39	47,75
	8	0,07	6,18	0,10	4,88	25,62	15,40	47,75
	9	0,08	6,16	0,09	4,84	25,70	15,41	47,72
	10	0,08	6,20	0,04	4,80	25,71	15,49	47,68
	11	0,05	6,21	0,07	4,75	25,74	15,48	47,70
	12	0,05	6,20	0,06	4,75	25,76	15,50	47,68
13	0,05	6,20	0,07	4,75	25,78	15,50	47,66	

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja za svaki uzorak

Isti trend promene sadržaja pojedinih masnih kiselina primećen je i kod uzoraka sa dodatim antioksidansima (Tabele 4.20, 4.21, i 4.22). Sadržaj ALA najmanje se promenio u uzorku kojem je dodat vitamin E, kod kojeg je minimalna količina ove masne kiseline zabeležena trinaestog dana skladištenja i iznosila je 47,66 % (Tabela 4.20, Slika 4.31). U ovom uzorku zabeleženi su i najmanji porasti oleinske i palmitinske kiselina. Ni jedna od pomenutih promena u sastavu masnih kiselina nije bila statistički značajna ($p > 0,05$).

Tabela 4.24 Promena masnokiselinskog sastava uzorka sa dodatkom karvakrola tokom skladištenja

Uzorak	Dan skladištenja	Sastav masnih kiselina (% u ukupnim masnim kiselinama)						
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 n6	C18:3n3
Ko-ekstrudat + karvakrol	0	0,03	5,91	0,10	4,93	25,37	15,21	48,43
	1	0,05	6,05	0,09	4,90	25,44	15,20	48,27
	2	0,08	6,12	0,14	4,93	25,41	15,22	48,10
	3	0,13	6,14	0,18	4,90	25,46	15,23	47,96
	4	0,14	6,16	0,17	4,89	25,47	15,32	47,85
	5	0,13	6,14	0,19	4,91	25,48	15,36	47,79
	6	0,08	6,24	0,07	4,87	25,57	15,42	47,75
	7	0,09	6,22	0,09	4,87	25,61	15,39	47,73
	8	0,07	6,19	0,10	4,88	25,64	15,41	47,71
	9	0,10	6,16	0,09	4,86	25,68	15,45	47,66
	10	0,08	6,20	0,08	4,80	25,71	15,49	47,64
	11	0,08	6,21	0,11	4,75	25,76	15,48	47,61
	12	0,07	6,23	0,08	4,75	25,76	15,50	47,61
13	0,06	6,21	0,08	4,77	25,79	15,50	47,59	

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja za svaki uzorak

Minimalne promene u sastavu masnih kiselina lanenog semena i drugih hraniva tokom skladištenja nisu neuobičajene, iako istovremeno dolazi do značajne promene u vrednostima peroksidnog broja i SMK. Tako su *Malcolmson* i saradnici u svojim ispitivanjima skladišne stabilnosti netretiranog lanenog semena skladištenog na temperaturi od 23 ± 2 °C u natron vrećama, došli do rezultata da gotovo nije bilo promene u masnokiselinskom sastavu skladištenih uzoraka. Istovremeno, zabeležen je statistički značajan porast ($p \leq 0,05$) SMK, čija je vrednost nakon 128 dana bila tri puta veća nego u početnom uzorku. Kako je ranije već pomenuto, povećanje vrednosti SMK ovi autori pripisuju delovanju endogenih enzima lanenog semena. U istim uzorcima došlo je i do porasta peroksidnog broja, pa je 66 dana skladištenja zabeležena najveća vrednost, nakon čega je ona počela da opada (*Malcolmson et al*, 2000).

Tabela 4.25 Promena masnokiselinskog sastava uzorka sa dodatkom dodatkom vitamina E i karvakrola tokom skladištenja

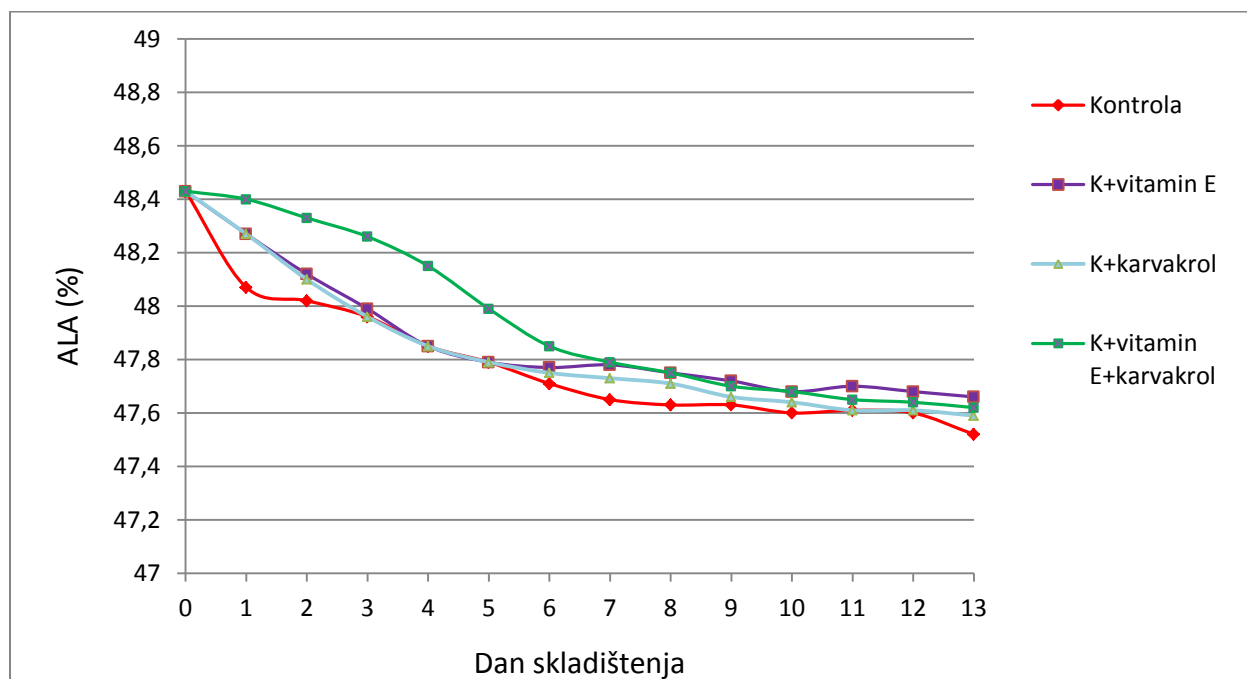
Uzorak	Dan skladištenja	Sastav masnih kiselina (% u ukupnim masnim kiselinama)						
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 n6	C18:3n3
Ko-ekstrudat + vitamin E + karvakrol	0	0,04	5,93	0,08	4,89	25,49	15,13	48,43
	1	0,04	5,97	0,09	4,90	25,44	15,16	48,40
	2	0,05	6,00	0,11	4,91	25,41	15,19	48,33
	3	0,04	6,01	0,12	4,90	25,46	15,21	48,26
	4	0,07	6,00	0,12	4,89	25,47	15,30	48,15
	5	0,06	6,08	0,12	4,91	25,48	15,36	47,99
	6	0,08	6,10	0,09	4,88	25,58	15,42	47,85
	7	0,09	6,12	0,09	4,87	25,61	15,43	47,79
	8	0,07	6,11	0,10	4,88	25,66	15,43	47,75
	9	0,09	6,11	0,09	4,82	25,70	15,49	47,70
	10	0,08	6,12	0,09	4,80	25,71	15,52	47,68
	11	0,09	6,12	0,09	4,75	25,77	15,53	47,65
	12	0,07	6,13	0,09	4,77	25,76	15,54	47,64
13	0,06	6,14	0,08	4,78	25,76	15,56	47,62	

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja za svaki uzorak

Gopalakrishnan i saradnici su takođe ispitivali skladišnu stabilnost netretiranog lanenog semena koje je bilo upakovano u plastične vreće i hermetički zatvoreno. Uzorci su skladišteni na dve temperature: sobnoj i temperaturi od 5 °C. Utvrđeno je da pri nižoj temperaturi ne dolazi do bilo kakvih promena u sastavu masnih kiselina, dok je pri višoj temperaturi, sadržaj ALA u toku 60 dana skladištenja opao sa 59,2 % na 57,6 %. U istim uzorcima peroksidni broj se sa 1,1 meq/kg m. f. popeo na 3,5 meq/kg pri sobnoj, odnosno na 3 meq/kg m.f. pri temperaturi od 5 °C. Isti autori su ispitivali promene koje nastaju u komercijalnim smešama za piliće pod identičnim uslovima. Kod ovih uzoraka takođe nije doslo do značajnih promena u masnokiselinskom sastavu smeše, naročito pri temperaturi skladištenja od 5 °C. Međutim, vrednost peroksidnog broja se nakon trideset dana skladištenja povećala sa početnih 31 meq/kg m. f. na 89 meq/kg m.f., pri sobnoj temperaturi, odnosno 79,1 meq/kg m.f. tokom skladištenja na 5 °C. Kiselinski broj uzoraka se povećao sa 21,9 % na 30,1 %. Kako autori zaključuju, pojedinačne sirovine tokom

skladištenja pokazuju daleko bolju otpornost na autooksidaciju nego smeše, što je verovatno posledica međusobne interakcije sirovina (Gopalakrishnan *et al.*, 1996).

Na slici 4.27 upoređene su promene u sadržaju ALA tokom skladištenja.



Slika 4.27 Promena sadržaja ALA u toku skladištenja

4.8.3 Mikrobiološke promene tokom skladištenja ko-ekstrudata u klima komori

Pre nego što se pristupilo proizvodnji ko-ekstrudata, ispitana je mikrobiološka ispravnost neekstrudirane smeše lanenog semena i suncoretove sačme (Tabela 4.26). Dobijeni podaci ukazuju da je smeša zadovoljavala sve kriterijume mikrobiološke ispravnosti propisane Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (2010). Ispitivanjem mikrobiološkog statusa koje je izvedeno na hranivu nakon ekstrudiranja, utvrđeno je da je došlo do redukcije broja mikroorganizama (Tabela 4.27). Zabeležena redukcija

mikroorganizama od 4000 cfu/g je bila statistički značajna ($p = 0,032$), što je još jedan pozitivan efekat procesa ekstrudiranja na proizvedeno hranivo.

Tabela 4.26 Mikrobiološki status neekstrudirane smeše

Ispitivanje	Rezultat
Ukupan broj mikroorganizama	15000 cfu/g
Koagulaza pozitivne stafilokoke	< 100 cfu/g
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10 cfu/g
<i>Salmonella</i> spp	nije nađeno u 50 g
Ukupan broj kvasaca i plesni	< 100 cfu/g

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja za svaki uzorak

Ekstrudiranjem materijala pri uslovima koji se uobičajeno koriste u proizvodnji hrane uništava se većina plesni i kvasaca, dok redukcija bakterija zavisi od primenjenih uslova ekstrudiranja. *Streptococcus thermophilus* se uspešno uništava pri temperaturi ekstrudiranja od 130 °C i slabim silama trenja u cevi ekstrudera, pa se smatra da je redukcija ove bakteije zasnovana na termičkom tretmanu (Quéguiner et al., 1989). Isto važi i za *Bacillus cereus*, dok se *Microbacterium lacticum* uništava pri temperaturi od 75 °C, intenzivnijim silama smicanja i vlažnosti materijala od 19 %, (Culhane et al., 2000).

Tabela 4.27 Mikrobiološki status uzorka ko-ekstrudata pre skladištenja

Ispitivanje	Rezultat
Ukupan broj mikroorganizama	11000 cfu/g
Koagulaza pozitivne stafilokoke	< 100 cfu/g
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10 cfu/g
<i>Salmonella</i> spp	nije nađeno u 50 g
Ukupan broj kvasaca i plesni	< 100 cfu/g

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja za svaki uzorak

U tabeli 4.28 prikazane u promene ukupnog broja mikroorganizama u uzorcima tokom skladištenja. Kako su u svim uzorcima ostali mikrobiološki parametri bili ispod granice detekcije, ovi rezultati nisu prikazani.

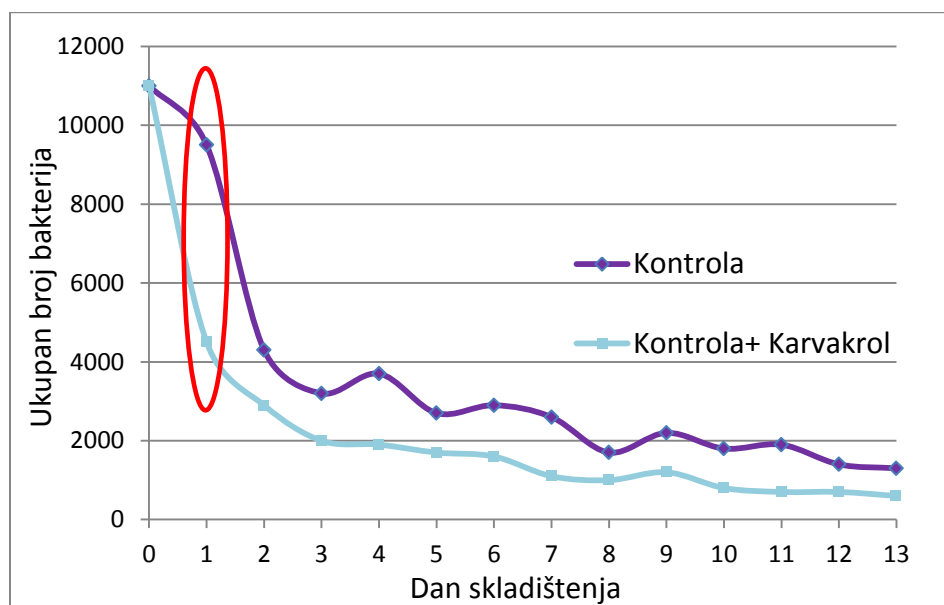
Tabela 4.28 Promena ukupnog broja mikroorganizama u uzorcima ko-ekstrudata tokom skladištenja u klima komori (cfu/g)

Dan skladištenja	Kontrola	Ko-ekstrudat + vitamin E	Ko-ekstrudat + karvakrol	Ko-ekstrudat + vitamin E + karvakrol
0	11000	11000	11000	11000
1	9500	7000	4500	4000
2	4300	4200	2900	2700
3	3200	2400	2000	2100
4	3700	2700	1900	2300
5	2700	2300	1700	2200
6	2900	2400	1600	2000
7	2600	2200	1100	1400
8	1700	1400	1000	1100
9	2200	1500	1200	1300
10	1800	1300	800	900
11	1900	1300	700	1000
12	1400	1300	700	900
13	1300	1300	600	800

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja za svaki uzorak

Najniža vrednost ukupnog broja mikroorganizama izmerena je nakon trinaest dana u uzorku sa dodatim karvakrolom i iznosila je 600 cfu/g. Najveći broj mikroorganizama se nakon trinaest dana zadržao u kontrolnom uzorku i iznosio je 1300 cfu/g. Isti broj mikroorganizama je izmeren i u uzorku sa dodatim vitaminom E, iako je ukupan broj mikroorganizama u uzorku sa dodatim vitaminom E tokom skladištenja bio manji nego u kontrolnom uzorku. Za razliku od vitamina E, karvakrol je pokazao veoma izraženo antimikrobno dejstvo. Ukupan broj mikroorganizama je u ovom uzorku tokom celog perioda skladištenja bio statistički niži ($p \leq 0,05$) od ukupnog broja mikroorganizama u kontrolnom uzorku. Poređenje ova dva uzorka prikazano je na slici 4.28. Najveća razlika u ukupnom broju mikroorganizama kod kontrolnog i uzorka sa dodatim karvakrolom

pokazala se već prvog dana skladištenja i iznosila je 2500 cfu/g. Sa produžetkom vremena skladištenja, stepen redukcije ukupnog broja mikroorganizama je postajao sve manji. S obzirom da je do ove pojave došlo svim uzorcima, redukcija je najverovatnije posledica uticaja povišene temperature koja je kao posledičan efekat uzrokovala i redukciju a_w vrednosti. Imajući u vidu da je temperatura skladištenja iznosila 63 ± 2 °C, postignuta redukcija broja mikroorganizama tokom perioda skladištenja je bila i za očekivati, jer je pri ovoj temperaturi, izuzev mezofilnih ekstrema i termofila, rast mikroorganizama onemogućen.



Slika 4.28 Promena ukupnog broja mikroorganizama u kontrolnom uzorku i uzorku sa dodatim karvakrolom tokom perioda skladištenja

Antimikrobno dejstvo karvakrola temeljno je ispitano u mnogim radovima. Njegova upotreba prisutna je u tehnologiji hrane za životinje i zasniva se upravo na ovoj karakteristici. Poznato je antibakterijsko dejstvo karvakrola na salmonelu, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Botrytis cinerea*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* (Lević et al., 2011), itd. Dejstvo karvakrola nastavlja se i nakon unosa

u organizam životinje. Zbog toga se ovo jedinjenje često dodaje u hranu za svinje, brojlere, ili krave upravo sa ciljem da deluje na mikrofloru crevnog trakta životinja. Redukcijom koliformnih i drugih nepoželjnih bakterija u crevima gajenih životinja, pospešuje se njihov rast i napredovanje (*Michiels et al.*, 2007).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da je karvakrol dao odlične rezultate u suzbijanju razvoja mikroorganizama, dok je kao antioksidans pokazao slabije dejstvo u konkretnom slučaju proizvedenog ko-ekstrudata. Vitamin E je, sa druge strane, pokazao odlično antioksidativno dejstvo, ali nije pokazao značajan uticaj na rast i razvoj mikroorganizama.

Pri proizvodnji hraniva bogatih uljem, a naročito nezasićenim masnim kiselinama, preporučuje se upotreba preparata sa dokazanim antioksidativnim dejstvom, kako bi se usporile oksidativne promene i sprečio neželjeni uticaj na zdravlje i pravilan razvoj životinja. Ova jedinjenja, kao što je već rečeno, vrlo često pokazuju i antimikrobno dejstvo, pa njihov efekat može biti dvojak. U zavisnosti od početnih vrednosti parametara oksidativne i mikrobiološke ispravnosti proizvedenog hraniva na samom početku skladištenja, bilo bi poželjno odabrati koji će se od dva ispitana preparata upotrebiti kako bi se produžila trajnost hraniva i poboljšala njegova skladišna stabilnost, kao i da li će se pristupiti mešanju ova dva preparata.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u eksperimentima izvedeni su sledeći zaključci:

5.1 Uticaj variranih parametara procesa na karakteristike ko-ekstrudata i potrošnju energije

1) Laneno seme upotrebljeno za proizvodnju funkcionalnog hraniva imalo je, sa nutritivnog aspekta, povoljan hemijski i masnokiselinski sastav. Pored visokog sadržaja ulja (37,62 % s.m.) i znatne količine proteina (22,52 % s.m.), ova sirovina sadržala je i značajne količine kalijuma (7006 mg/kg) i magnezijuma (1832,98 mg/kg). Udeo esencijalne ALA u ukupnim masnim kiselinama iznosio je 50,31 %. Sadržaj ulja u suncokretovoj sačmi iznosio je 1,98 % (s.m.). Najzastupljenija masna kiselina u suncokretovoj sačmi bila je linolna, omega-6 masna kiselina sa udelom od 63,15 %.

2) Najznačajniji uticaj na smanjenje sadržaja HCN u procesu ekstrudiranja imala je vlaga u polaznom materijalu. Najviši sadržaj HCN u ekstrudiranom hranivu (126 mg/kg) izmeren je pri najnižoj vrednosti polazne vlage materijala (7 %). Sa porastom sadržaja vlage, redukcija HCN je bila efikasnija. Za detoksifikaciju lanenog semena i oslobađanje od cijanogenih glikozida pored termičkog tretmana neophodno je obezbediti i odgovarajuću količinu vlage. U tom slučaju HCN će biti nepovratno uklonjena iz tretiranog materijala, budući da će pored razaranja cijanogenih glikozida doći i do isparavanja HCN.

3) Minimalan sadržaj HCN u dobijenom ko-ekstrudatu iznosio je 25,42 mg/kg, a izmeren je pri sadržaju polazne vlage smeše od 11,5 %. Sa daljim povećanjem vlage, sadržaj HCN je blago rastao zbog smanjenja viskoziteta materijala. Ovo je uzrokovalo brži izlazak materijala iz cevi ekstrudera pri jednakoj brzini obrtanja puža i kraće izlaganje dejstvu enzima, temperature i drugih faktora.

4) Veliku značajnost za redukciju sadržaja HCN u ko-ekstrudatu pokazala je i brzina obrtanja puža ekstrudera. Najefikasnija detoksifikacija zabeležena je pri najnižim vrednostima kapaciteta punjenja ekstrudera i središnjim vrednostima brzine obrtanja

puža. Povećanje brzine obrtanja puža do vrednosti od 415 o/min intenzivirala je redukciju HCN usled pojačanog mešanja materijala, uz istovremeno postizanje visokih temperatura, pritiska i sila smicanja. Daljim povećanjem brzine obrtanja puža redukcija HCN blago opada, jer se tretirani materijal kratko zadržava u cevi ekstrudera.

5) Tokom ekstrudiranja došlo je do izvesnog povećavanja kiselosti hraniva, odnosno sadržaja SMK. Najznačajniji uticaj na SMK imala je vlaga i temperatura, jer se destrukcija enzima intenzivira sa porastom temperature i vlage materijala u procesu. Ostali parametri ekstrudiranja nisu pokazali statistički značajan uticaj.

6) Potrošnja energije u eksperimentu kretala se između 117 kWh/t i 295,45 kWh/t u zavisnosti od parametara ekstrudiranja koji su bili primenjeni. Svi nezavisno promenljivi parametri ekstrudiranja su imali statistički značajan uticaj na potrošnju energije. Maksimalna potrošnja energije izmerena je pri najvećim brzinama obrtanja puža i najnižem sadržaju vlage polaznog materijala. Sa porastom vlage materijala potrošnja energije je opadala zbog smanjenja viskoziteta i olakšanog protoka smeše kroz cev ekstrudera.

8) Najniža izmerena potrošnja energije po masi materijala u svim eksperimentima zabeležena je pri maksimalnim vrednostima polazne vlage materijala (16 %) i ukupne površine otvora na matrici (59,40 mm²). Najmanja potrošnja energije pri konstantim srednjim vrednostima vlage materijala i brzine obrtanja puža postignuta je pri najvećoj površini otvora na matrici i najmanjem kapacitetu punjenja. U ovom slučaju, otpor prolasku materijala kroz matricu bio je najmanji, a izmerena potrošnja energije iznosila je 150,23 kWh/t.

9) Najviša temperatura ekstrudiranja izmerena je neposredno pred izlazak materijala iz cevi ekstrudera i iznosila je 116,02 °C. Najniža temperatura tokom ekstrudiranja od 26,46 °C izmerena je u tački koja je najudaljenija od matrice na izlazu iz cevi ekstrudera. Temperaturni uslovi u tački najudaljenijoj od matrice bili su nestabilniji nego u tački neposredno do matrice, usled nakupljanja materijala neposredno pred matricu i naglog prolaska kroz nju nakon postizanja dovoljnog pritiska.

10) NSI vrednost proteina ko-ekstrudata se u zavisnosti od primenjenih parametara kretala između 16,54 % i 29,64 %. Sa porastom temperature ekstrudiranja NSI vrednost je opadala. Povišena temperatura je izazvala denaturaciju proteina, što je registrovano snižavanjem NSI vrednosti.

5.2 Optimizacija procesa ekstrudiranja

1) Postupkom RSM mogu se na adekvatan način opisati uticaji procesnih parametara na kvalitet proizvedenog ko-ekstrudata i potrošnju energije tokom ekstrudiranja, što potvrđuju visoke vrednosti koeficijenta determinacije za sve posmatrane odzive. Koeficijenti determinacije su se kretali u opsegu između 0,95 i 0,82. Analiza varijanse za posmatrane odzive ukazuje da su svi modeli bili statistički značajni pri nivou značajnosti od 95% (p -vrednost $\leq 0,05$).

2) Optimalni uslovi ekstrudiranja određeni su na osnovu odabrane značajnosti svih odziva koji su u optimizaciju bili uključeni (sadržaj HCN u ko-ekstrudatu, sadržaj ALA, SMK i potrošnja energije). Rezultati optimizacije ukazuju na to da je ekstrudiranje funkcionalnog hraniva potrebno izvoditi pri polaznom sadržaju vlage od 13,39%, brzini obrtanja puža od 417,41 o/min, kapacitetu punjenja od 32 kg/h i ukupnoj površini otvora matrice od 19,80 mm². Vrednost ukupne poželjne funkcije pri ovakvim uslovima bila je izuzetno visoka i iznosila je 0,89.

3) Proizvedeno funkcionalno hranivo poseduje i visok sadržaj proteina (30,31 % s.m.) i visok sadržaj ulja (20,57 % s.m.), pa se istovremeno može posmatrati i kao izvor proteina i kao izvor energije u ishrani životinja.

4) Sadržaj ALA u masnoj fazi ko-ekstrudata je iznosio 48,43% u ukupnim masnim kiselinama, odnosno 9,96% u samom proizvodu. Ovako visok udeo esencijalne omega-3 masne kiseline kvalifikuje proizvod kao hranivo sa funkcionalnim karakteristikama, pogodno za povećavanje sadržaja omega masnih kiselina u hrani za životinje.

5.3. Skladišna stabilnost proizvedenog ko-ekstrudata

- 1) Početna vrednost peroksidnog broja u ko-ekstrudatu koji je skladišten iznosila je 0,92 mmol/kg m.f.. Najviša vrednost peroksidnog broja iznosila je 46,32 mmol/kg m.f. i zabeležena je u kontrolnom uzorku nakon četiri dana skladištenja. Najviša vrednost peroksidnog broja kod uzorka sa dodatim vitaminom E iznosila je 36,55 mmol/kg m.f., što je niže nego u ostalim uzorcima. Uzorak sa dodatim vitaminom E dostigao je ovu vrednost jedan dan nakon ostalih uzoraka, tj. petog dana, što sve ukazuje da je vitamin E u ovom eksperimentu imao najizraženije antioksidativno dejstvo.
- 2) Dodatak smeše vitamina E i karvakrola nije pokazao pojačanu antioksidativnu aktivnost u odnosu na pojedinačne komponente odvojeno.
- 3) Sadržaj SMK je u svim uzorcima u toku čuvanja pri ubrzanim uslovima skladištenja u klima komori porastao. Najviša vrednost SMK izmerena je u kontrolnom uzorku i iznosila je 5,51 %. Najmanji porast zabeležen je u uzorku sa dodatkom smeše vitamina E i karvakrola (od 3,28 % do 5,25 %). Do povećanja SMK u uzorcima tokom skladištenja najverovatnije je došlo zbog oštećenja semena tokom mlevenja, a potom i tokom ekstrudiranja. Oštećena semena podložnija su lipolitičkim aktivnostima endogene biljne lipaze, usled čega lakše dolazi do razgradnje triglicerida.
- 4) Ekstrudiranje hraniva je statistički značajno ($p = 0,032$) uticalo je na smanjenje broja mikroorganizama u odnosu na polaznu netretiranu smešu, što je još jedan pozitivan efekat procesa ekstrudiranja.
- 5) Redukcija mikroorganizama tokom skladištenja zabeležena je u svim uzorcima, što je posledica povišene temperature na kojoj su uzorci skladišteni (63 ± 2 °C). Pri ovim temperaturama onemogućen je rast većine mikroorganizama, pa preživeli organizmi najverovatnije pripadaju grupi termofilnih bakterija. Najniža vrednost ukupnog broja mikroorganizama izmerena je nakon trinaest dana u uzorku sa dodatim karvakrolom i iznosila je 600 cfu/g. Najveći broj mikroorganizama se nakon trinaest dana zadržao u

kontrolnom uzorku i iznosio je 1300 cfu/g. Zaključuje se da je karvakrol pokazao veoma izraženo antimikrobno dejstvo.

6. LITERATURA

- 1) Abecassis, J., Abbou, R., Chaurand, M., Morel, M.-H., Vernoux, P. (1994): *Influence of extrusion conditions on extrusion speed, temperature and pressure in the extruder and on pasta quality*. Cereal chemistry 71 (3), 247-253.
- 2) Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O. I. (1994): *Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol*. Food Chem Toxicol 32, 31–36.
- 3) Akkol, E.K., Avci, G., Küçük Kurt, I., Keleş, H., Tamer, U., Ince, S., Yesilada, E. (2009) : *Cholesterol-reducer, antioxidant and liver protective effects of Thymbra spicata L. var. spicata*. Journal of Ethnopharmacology 126 (2), 314-319.
- 4) Allen, P., Danforth, H., Levander, O. (1997): *Interaction of Dietary Flaxseed with Coccidia Infections in Chickens*. Poultry Science 76, 822–827.
- 5) Altan, A., Kathryn L. McCarthy, K.L., Maskan, M. (2008): *Twin-screw extrusion of barley-grape pomace blends: Extrudate characteristics and determination of optimum processing conditions*. Journal of Food Engineering 89 (1), 24-32.
- 6) Alvarez, V.B., Smith, D.M., Morgan, R.G., Booren, A.M. (1990): *Restructuring of mechanically deboned chicken and nonmeat binders in a twin-screw extruder*. Journal of food science 55, 942-946.
- 7) Alzueta C., Rodriguez M., Cutuli M., Rebole A., Ortiz L., Centeno C., Trevino J. (2003): *Effect of whole and demucilaged linseed in broiler chicken diets on digesta viscosity, nutrient utilisation and intestinal microflora*. British Poultry Science 44, 67 - 74.
- 8) Amarowicz, R., Wanasundara, D. and Shahidi, F. (1994): *Chromatographic separation of flaxseed phenolics*. Nahrung 38, 520 - 526.
- 9) Arfa, B., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalier, P. (2006): *Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure*. Letters in Applied Microbiology 43 (2), 149–154.
- 10) AOAC (2000) *Official methods of analysis*, 15th edn. AOAC Int, Arlington, VA

- 11) AOCS (2001) *Soxhlet extraction according to the official method Ba 3-38*. In: Firestone D (ed) *Official Methods and Recommended Practices*, 5th edn. AOCS, Champaign, IL
- 12) Ayad, A. (2010): *Characterization and Properties of Flaxseed Protein Fractions*. PhD thesis, Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal.
- 13) Bacala, R., Bareth, V. (2007): *Development of extraction and gas chromatography analytical methodology for cyanogenic glycosides in flaxseed (Linum usitatissimum)*. JAOAC Int 90, 153-161.
- 14) Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): *Biological effects of essential oils – A review*. Food and Chemical Toxicology 46 (2), 446-475.
- 15) Bampidis, V.A., Christodoulou, V., Christaki, E., Florou-Paneri, P. A., Spais, B. (2005): *Effect of dietary garlic bulb and garlic husk supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs*. Animal Feed Science and Technology 121, 285-285.
- 16) Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., Ruberto, G. (1998): *Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils*. Journal of Essential Oil Research 10(6), 618-627.
- 17) Bauchart, D. (2012). *Oxidizing stress and lipoperoxidation*. Private communication.
- 18) Bean, L.D., Leeson, S. (2002): *Fatty acid profiles of 23 Samples of flaxseed collected from commercial feed mills in Ontario, 2001*. J. Appl. Poul. Res. 11, 209-211.
- 19) Bean L.D., Leeson S. (2003): *Long-term effects of feeding flaxseed on performance and egg fatty acid composition of brown and white hens*. Poultry Science 82 (3), 388-394.
- 20) Bekrić, V. (1999): *Industrijska proizvodnja stočne hrane (savremena proizvodnja krmnih smeša)*. Portal – Beograd.
- 21) Bhatta R.S. (1993): *Further compositional analyses of flax-mucilage, trypsin-inhibitors and hydrocyanic acid*. J. Am. Oil Chem. Soc. 70, 899 - 904.

- 22) Bhatti, R., Cherdkiatgumchai, P. (1990): *Compositional analysisi of laboratory-prepared and commercial samples of linseed meal and hulls isolated from flax*. J. Am. Oil Chem. Soc. 67, 79-84.
- 23) Brigelius-Flohe, R. (1999): *Vitamin E: function and metabolism*, FASEB 13(10), 1145-1155.
- 24) Brimer, L., Molgaard, P. (1986): *Simple densitometric method for estimation of cyanogenic glycosides and cyanohydrins under field conditions*. Biochem. Syst. Ecol. 14, 97-103.
- 25) Bryhni, E.A., Byrne, D.V., Rødbotten, M., Claudi-Magnussen, C., Agerhem, H., Johansson, M., Lea, P., Martens, M. (2002): *Consumer perceptions of pork in Denmark, Norway and Sweden*. Food Quality and Preference 13, 257-266.
- 26) Bueno, A.S., Pereira, C.M., Menegassi, B., Arêas, J.A.G., Castro I.A. (2009): *Effect of extrusion on the emulsifying properties of soybean proteins and pectin mixtures modelled by response surface methodology*. Journal of Food Engineering 90 (4), 504-510.
- 27) Bulut, S., Waites, W.M., Mitchell, J.R. (1999): *Effect of combined shear and thermal forces on destruction of Microbacterium lacticum*. App Env Micro, 65 (10), 4464-4469.
- 28) Burt S. (2004): *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review*. Int. J. Food. Microbiol. 1, 94(3), 223-53.
- 29) Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., KamelC. (2005): *Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system*, Animal Feed Science and Technology 123-124, 597-613.
- 30) Byers, F. M. and G. T. Schelling. (1988): *Lipids in ruminant nutrition*. Pp. 298-312 In: The Ruminant Animal, D. C. Church, Waveland Press, Prospect Heights, IL.
- 31) Cannata, S., Ratti, S., Meteau, K., Mourot, J., Baldini, P., Corino, C., (2010): *Evaluation of different types of dry-cured ham by Italian and French consumers*. Meat Sci. 84, 601-606.

- 32) Carelli, A., Franco, I., Crapiste, G. (2005): *Effectiveness of added natural antioxidants in sunflower oil*. *Grasas y Aceites* 56 (4), 303-310.
- 33) Chami, N., Bennis, S., Chami, F., Aboussekhra, A., Remmal, A. (2005): *A study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo*. *Oral Microbiol. Immunol.* 20, 106-111.
- 34) Chaves, A.V., Stanford, K., Gibson, L.L., McAllister, T.A., Benchaar, C. (2008): *Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs*. *Animal Feed Science and Technology* 145, 396-408.
- 35) Chen, Z.-Y., Ratnayake, W.M.N., and S.C. Cunnane (1994): *Oxidative Stability of Flaxseed Lipids During Baking*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 629-632.
- 36) Choe, E., Min, D.B. (2006): *Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5(4), 169-186.
- 37) Clifford, H. III, Tulbek, M. C., Yingying, X. (2006): *Flaxseed*. *Advances in Food and Nutrition Research* 51, 1- 97.
- 38) Costa, N., Lourenço, J., Pereira, Z. (2011): *Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 107 (2), 234-244.
- 39) Culhane, J., Scurrah, K., Sellahewa, J., Szabo, L., Raynor, D. (2000): *Destruction of microorganisms by extrusion – a feasibility study*. Internal Report, Food Science Australia.
- 40) Čolović, R., Vukmirović, Đ., Ivanov, D., Lević, J., Jovanović, R., Kokić, B., Sredanović, S., Đuragić, O., Spasevski, N.: *How does oil addition in main mixer influence physical properties of trout feed?*, 2nd Feed-to-Food Workshop „Extrusion technology in feed and food processing“, Thematic proceedings, Novi Sad, November, 19th, 2010, 79-96.
- 41) Dabrowski, K.J., Sosulski, F.W. (1984): *Comparison of free and hydrolysable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds*. *J. Agric. Food Chem.* 32, 128 - 130.

- 42) Daun, J.K., Barthet V.J., Chornick T.L., Duguid, S. (2003): *Structure, composition, and variety development of flaxseed* In: Flaxseed in human nutrition, Eds. L.U. Thompson and Cunnane, AOAC Press, Champaign, IL, 1 – 40.
- 43) Del Castillo, E. (2007): *Experimental design: A Statistical Approach*. Springer Science + Business Media LCC, New York, NY, USA.
- 44) Derringer, G., (1994): *A balancing act: Optimizing a product's properties*. Quality Progress 27, 51–57.
- 45) Dierick, N.A., Decuypere, J.A. (2002): *Endogenous lipolysis in feedstuffs and compound feeds for pigs: effects of storage time and conditions and lipase and/or emulsifier addition*. Animal Feed Science and Technology 102 (1-4), 53-70.
- 46) Di Mascio, P., Mench, C.F.M., Nigro, R.G., Sarasin, A. and Sies, H. (1990): *Singlet molecular oxygen induced mutagenicity in a mammalian SV40-based shuttle vector*. Photochem. Photobiol. 3, 293-298.
- 47) Dimić, E. (2005): *Hladno ceđena ulja*. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- 48) Dimić, E., Turkulov, J. (2000): *Kontrola kvaliteta u tehnologiji jestivih ulja*. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- 49) Drouillard, J. S., M. A. Seyfert, E. J. Good, E. R. Loe, B. Depenbusch, and R. Daubert: *Flaxseed for finishing beef cattle: Effects on animal performance, carcass quality and meat composition*. Proc. 60th Flax Institute, March, 17-19, 2004, Fargo, N.D. 108-117.
- 50) Đorđević, N., Dinić, B. (2011): *Proizvodnja smeša koncentrata za životinje*. Institut za krmno bilje, Kruševac.
- 51) Đorđević, N., Grubić, G., Makević, M., Jokić, Ž. (2009): *Ishrana domaćih i gajenih životinja*. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun – Beograd.
- 52) Eastwood, L. (2008): *The Nutritional Value Of Flaxseed Meal For Swine*. PhD Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan.
- 53) EFSA (2006): *Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to cyanogenic compounds as undesirable substances in animal feed question N° EFSA-Q-2003-064*.

- 54) El-Dash, A.A., Gonzales, R., Ciol, M. (1983): *Response surface methodology in the control of thermoplastic extrusion of starch*. Journal of Food Engineering 2 (2), 129-152.
- 55) FAO (2008): *Fats and fatty acids in human nutrition*. Report of an expert consultation, Geneva, November 10-14, 2008.
- 56) Farren, T. B., J. S. Drouillard, D. A. Blasi, H. J. LaBrune, S. P., Montgomery, J. J. Sindt, C. M. Coetzer, R. D. Hunter, J. J. Higgins. 2002. *Evaluation of performance in receiving heifers fed different sources of dietary lipid*. Pages 1-4 in Proc. 2002 Cattlemen's Day, Kansas State University, Manhattan.
- 57) Feng, D., Shen, Y., Chavez, E. (2003): *Effectiveness of different processing methods in reducing hydrogen cyanide content of flaxseed*. J. Sci. Food Agric. 83, 836 - 841.
- 58) Fito, P., Chairalt, A., Betoret, N., Gras, M., Cháfer, M., Martínez-Monzó, J., Andrés, A., Vidal, D. (2001): *Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering; Application in functional fresh food development*. Journal of Food Engineering 49, 175-183.
- 59) Ferreira, S.L.C. , Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos W.N.L. (2007): *Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods*. Analytica Chimica Acta 597, 179–186
- 60) Flax Council of Canada (2008). www.flaxcouncil.ca.
- 61) Franks, T.K., Hayasaka, Y., Choimes, S., van Heeswijck, R. (2005): *Cyanogenic glycosides in grapevine: polymorphism, identification and developmental pattern*. Phytochemistry 66: 615-173.
- 62) Gabiana, C.P. (2005): *Response of linseed (Linum usitatissimum L.) to irrigation, nitrogen and plant population*. MSc Thesis, Lincoln University, Canterbury, New Zealand.
- 63) Ganjewala, D., Kumar, S., Devi, A., Ambika, K. (2010): *Advances in cyanogenic glycosides biosynthesis and analyses in plants: A review*. Acta Biologica Szegediensis 54(1), 1-14.

- 64) Gatlin, D. M., III, Bai, S. C. (1992) *Effects of dietary lipid and reduced glutathione on composition and storage quality of channel catfish (Ictalurus punctatus)*. *Aquaculture and Fisheries Management* 24, 457-463.
- 65) Giannenas, I., Triantafyllou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., Karagouni, S. (2012): *Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Aquaculture* 350–353, 26–32.
- 66) Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Gruffat, D., Bauchart, D., Durand, D. (2007): *The antioxidative effect of plant extracts rich in polyphenols differs between liver and muscle tissues in rats fed n-3 PUFA rich diets*. *Animal Feed Science and Technology* 139 (3–4), 257-272.
- 67) Green, G., Lyman, R. (1972): *Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats*. *Experimental Biology and Medicine* 140 (1), 6-12.
- 68) Grobas, S., J Médez, R. Lázaro, C. de Blas, and G. G. Mateos. (2001): *Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolks of two strains of laying hens*. *Poultry Science* 80, 1171-1179.
- 69) Gobert, M., Martin, B., Ferlay, A., Chilliard, Y., Graulet, B., Pradel, P., Bauchart, D., Durand, D. (2009): *Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Journal of Dairy Science*, 92 (12), 6095-6104.
- 70) Gopalakrishnan', N., Cherian, G., Sim, J.S. (1996): *Chemical Changes in the Lipids of Canola and Flax Seeds During Storage*. *Fett/Lipid* 98 (5), 168-171.
- 71) Guha, M., Ali, S.Z., Bhattacharya, S. (2003): *Screening of variables for extrusion of rice flour employing a Plackett–Burman design*. *Journal of Food Engineering* 57 (2), 135-144.

- 72) Guillevic, M., Kouba, M., Mourot, J. (2009): *Effect of a linseed diet on lipid composition, lipid peroxidation and consumer evaluation of French fresh and cooked pork meats*. Meat Sci. 81, 612-618.
- 73) Gunstone, F. (2001): *Oilseed crops with modified fatty acid composition*. Journal of Oleo Science 50 (5), 269 - 279.
- 74) Guy, R.C.E. (1994): *Raw materials for extrusion cooking processes*. In: The Technology of Extrusion Cooking. Ed. Frame, N.D. Blackie Academic & Professional, London, 52-72.
- 75) Hall, C. III., Tulbek, M.C., and Xu, Y. (2006): *Flaxseed*. Advances in Food and Nutrition Research 51, 1-97.
- 76) Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007): *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- 77) Hardy, G. (2000): *Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning*. Nutrition 16, 688-697.
- 78) Harper, J.M. (1989): *Food extruders and their applications* In: Extrusion Cooking, Eds. Mercier, C., Linko, P., Harper, M.J. American Association of Cereal Chemist, Minesota, 1-35.
- 79) Hart, K.J., Yáñez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J. (2008): *Plant extracts to manipulate rumen fermentation*. Animal Feed Science and Technology 147 (1), 8-35.
- 80) Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., Von Wright A. (1998): *Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 3590-3595.
- 81) Henry, M. H., Pesti, G. M., Bakalli, R., Lee, J., Toledo, R. T., Eitenmiller, R. R., Phillips, R. D. (2001): *The Performance of Broiler Chicks Fed Diets Containing Extruded Cottonseed Meal Supplemented with Lysine*. Poultry Science 80 (6).
- 82) Hidayat, A., Zuaraida, N., Hnarida, I., Damardjati, D.S. (2000): *Cyanogenic content of cassava root of 179 cultivars grown in Indonesia*. J. Food Compost. Anal. 13, 272-275.

- 83) Hossain, M.A., Jauncey, K. (1990): *Detoxification of Linseed and sesame meal and evaluation of their nutritive value in the diet of common carp (Cyprinus caprio L.)*. Asia Fisheries Science 3, 169-183.
- 84) Htoo, J. K., Meng, X., Patience, J. F., Dugan, M. E. R., & Zijlstra, R. T. (2008): *Effects of co-extrusion of flaxseed and field pea on the digestibility of energy, ether extract, fatty acids, protein, and amino acids in grower-finisher pigs*. Journal of Animal Science, 86(11), 2942-2951.
- 85) Hu, Z. Z., Zhu, H., Li, M. N. (2005): *Effects of complex additives of chinese herbal medicine on meat quality of broilers*. Cereal & Feed Industry 9, 37-39.
- 86) Ilo, S., Liu, Y., Berghofer, E. (1999): *Extrusion Cooking of Rice Flour and Amaranth Blends*. LWT - Food Science and Technology, 32 (2), 79-88.
- 87) Ilo, S., Schoenlechner, R., Berghofer, E. (2000): *Role of lipids in extrusion cooking processes*. Gracas y Aceites 51 (1-2), 97-110.
- 88) Ivanov, D., Čolović, R., Lević, J., Sredanović, S. (2012): *Optimization of supercritical fluid extraction of linseed oil using RSM*. European Journal of Lipid Science and Technology 114 (7), 807-815. a
- 89) Ivanov, D., Čolović, R., Vukmirović, Đ., Lević, J., Kokić, B., Lević, Lj., Đuragić, O.: *Influence of process parameters on temperature profile and nitrogen solubility index of linseed co-extrudate*. 1st International Symposium on Animal Science, Belgrade: 8-10. October, 2012, 511-515. b
- 90) Ivanov, D., Kokić, B., Brlek, T., Čolović, R., Vukmirović, Đ., Lević, J., Sredanović, S. (2012): *Effect of microwave heating on content of cyanogenic glycosides in linseed*. Ratarstvo i povrtarstvo 49, 63-68. c
- 91) Iwe, M.O., van Zuilichem, D.J, Stolp, W., Ngoddy, P.O. (2004): *Effect of extrusion cooking of soy-sweet potato mixtures on available lysine content and browning index of extrudates*. Journal of Food Engineering 62 (2), 143-150.
- 92) Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Vidgen, E., Agarwal, S., Rao, A.V., Rosenberg, R.S., Diamandis, E.P., Novokmet, R., Mehling, C.C., Perera, T., Griffin, L.C. and Cunnane, S.C. (1999): *Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum*

- lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial.* Am. J. Clin. Nutr. 69, 395 – 402.
- 93) Jeong, I.-J., Kim, K.-J. (2009): *An interactive desirability function method to multiresponse optimization.* European Journal of Operational Research 195, 412–426.
- 94) Jian J, Wu Z. (2003): *Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, Pseudosciaena crocea (Richardson).* Aquaculture 218(1-4), 1-9.
- 95) Jianing Pu, Subramaniam Sathivel (2011): *Kinetics of Lipid Oxidation and Degradation of Flaxseed Oil Containing Crawfish (Procambarus clarkii) Astaxanthin.* J Am Oil Chem Soc 88, 595 – 601.
- 96) Judkins, M.B., Shain, D.H., Radloff, H.D. (1991): *Effects of supplemental corn vs. corn fortified with soya-bean meal or urea fed with low-quality mixed grass hay on forage intake, particulate passage rate and neutral detergent fiber digestion in beef heifers.* Animal Feed Science and Technology, 33(3–4), 323-329.
- 97) Jung, M.Y., Min, D.B. (1990): *Effects Of α -, γ -, And δ -Tocopherols On Oxidative Stability Of Soybean Oil.* Journal of Food Science 55 (5), 1464–1465.
- 98) JUS ISO E.N8.001:2000. *Hrana za životinje – određivanje indeksa rastvorljivosti azota (NSI).* I izdanje, Savezni zavod za standardizaciju. Standard donešen rešenjem br. 5/2-01-1/68 od 15. decembra 2000. godine
- 99) JUS ISO 729:1992. *Seme uljarica - Određivanje kiselosti ulja.* I izdanje, Savezni zavod za standardizaciju, „Službeni listu SRJ“, br.33/92.
- 100) Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H. (1990). *Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols.* Archives of Biochemistry and Biophysics 277, 101–108.
- 101) Karl-Heinz Wagner, Ibrahim Elmadfa (2000): *Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating.* European Journal of Lipid Science and Technology 102 (10), 624–629.
- 102) Karwe, M.V. (2003): *Food Extrusion* chapter 5.10.4.9 under theme *Food and Agricultural Engineering Resources.* In the *Encyclopedia of Life Support Systems*

- (EOLSS) eds. G. V. Barbosa-Conovas and P. Juliano, developed under the auspices of the UNESCO, EOLSS Publishers, Oxford, UK, pp. 545-563.
- 103) Karlović, Đ., Andrić, N. (1996): *Kontrola kvaliteta semena uljarica*. Tehnološki fakultet Novi Sad, Savezni zavod za standardizaciju, Beograd, Serbia.
- 104) Katta, Y., Ohkuma, K., Satouchi, M., Takahashi, R., Yamamoto, T., (1993): *Feed for livestock*. Eur. Pat. Appl. 0549478A1, 14.
- 105) Kelkar, S., Siddiq, M., Harte, J.B., Dolan, K.D., Nyombaire, G., Suniaga, H. (2012): *Use of low-temperature extrusion for reducing phytohemagglutinin activity (PHA) and oligosaccharides in beans (Phaseolus vulgaris L.) cv. Navy and Pinto*. Food Chemistry 133, 1636–1639.
- 106) Keusgen, M., Kloock, J.P., Knobbe, D.T., Junger, M., Krest, I., Goldbach, M., Klein, W., Schoning, M.J. (2004): Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. Sens Actuat B. Chem. 103, 380-385.
- 107) Kolarski, D. Osnovi ishrane domaćih životinja. *Naučna knjiga, Beograd, 1995*.
- 108) Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschutter, A., and Beisiegel, U. (1996): *Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein*. J. Lipid Res. 37, 1436–1448.
- 109) Kuijsten, A., Arts, I., Van't Veer, P., Hollman P. (2005): *The relative bioavailability of enterolignans in humans is enhanced by milling and crushing of flaxseed*. J. Nutr. 135, 2812 – 2816.
- 110) Kulås E, Ackman RG. (2001): *Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil*. J. Agric. Food Chem. 49(4), 1724-1729.
- 111) Kulisić, T., A. Radonić, V. Katalinić, and M. Miloš (2004): *Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil*. Food Chemistry 85, 633-640.
- 112) Labieniec, M.; Gabryelak, T. (2006): *Study of interactions between phenolic compounds and H₂O₂ or Cu (II) ions in B14 Chinese hamster cells*. Cell Boil. Intr. 30, 761-768.

- 113) Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007): *Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges*. Progress in Lipid Research 46, 244–282.
- 114) Lagouri V, Blekas G, Tsimidou M, Kokkini S, Boskou D (1993): *Composition and antioxidant activity of essential oil from oregano plants grown in Greece*. Z Lebensm. Unters.-Forsch. 197, 20-23.
- 115) Lam-Sánchez A, Bressani R, Molina MR, Elías LG, González JM, Durigan JF (1985): *Effects of cone opening, initial moisture content and multiple extrusion on the protein quality of extruded soybean using the Brady Crop Cooker*. Arch Latinoam Nutr. 35(3), 447-57.
- 116) Lardy, G. P. and V. L. Anderson. (1999): *Alternative feeds for ruminants*. North Dakota State University Extension Service Bulletin AS-1182.
- 117) Larsen, M.K., Hymøller, L., Brask-Pedersen, D.B., Weisbjerg, M.R. (2012): *Milk fatty acid composition and production performance of Danish Holstein and Danish Jersey cows fed different amounts of linseed and rapeseed*. J. Dairy Sci. 95(7), 3569-3578.
- 118) Lawrence, B. V., D. J. Overend, and S. A. Hansen (2004): *Sow productivity may respond to flax meal use*. Part 1. Feedstuffs, 11-16.
- 119) Lazić, Ž. (2004): *Design of experiments in Chemical Engineering*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- 120) Lević, J. (1995): *Izučavanje različitih metoda izdvajanja hlorogenske kiseline iz suncokretovog proteinskog jezgra i njihovog uticaja na karakteristike dehlorogenizovanih proteinskih hraniva*. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- 121) Lević J., Čabarkapa I., Todorović G., Pavkov S., Sredanović S. , Coghill-Galonja T., Kostadinović Lj. (2011): *In vitro* antibacterial activity of essential oils from plant family *Lamiaceae*. Romanian Biotechnological Letters 16 (2), 6034-6041.
- 122) Lević, J., Delić, I., Radojčić, D., Ivić, M.: *Novi tehnološki postupci proizvodnje visokoproteinske sačme*. III savetovanje iz tehnologije stočne hrane SR Srbije, Zbornik radova (bez numeracije), Divčibare, 1990.

- 123) Lević, J., Sredanović, S. (2012): *Suncokretova sačma*. Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad.
- 124) Lević, J., Sredanović, S., Đuragić, O. (2005): *Proteini suncokretove sačme kao hrana za brojlere*. Acta periodica technologica 36, 3-10.
- 125) Liang, M., Huff, H.E., Hsieh F.-H. (2002): *Evaluating Energy Consumption and Efficiency of a Twin-Screw Extruder*. Journal of Food Science Volume 67 (5), 1803–1807.
- 126) Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I. (2009): *Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanum dictamnus L. and in vitro antimicrobial activity*. Food Chemistry 112, 77–83.
- 127) López-Duarte, A.L., Vidal-Quintanar, R.L. (2009): *Oxidation of linoleic acid as a marker for shelf life of corn flour*. Food Chemistry 114, 478-483.
- 128) Lussas, E., Rhee, K.C. (1995): *Soy Protein Processing and Utilization*. In Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization, ed. Erickson, D.R., AOSC Press and United Soybean board, USA.
- 129) Maddock, T. D., M. L. Bauer, K. Koch, V. L. Anderson, R. J. Maddock, and G. P. Lardy. The effect of processing flax in beef feedlot rations on performance, carcass characteristics and trained sensory panel ratings. Proc. 60th Flax Institute, March 17-19, 2004, Fargo, N.D. pp 118-123.
- 130) Majak, W., McDiarmid, R.E., Hall, J.W., Cheng, K.J (1990): *Factors that determine rate of cyanogenesis in bovine ruminal fluid in vitro*. J Anim Sci 68, 1648-1655.
- 131) Malcolmson, L., Przybylski, R., Daun, J. (2000): *Storage stability of flaxseed*. JAOCS 77, 235–238.
- 132) Matheson, E.M. (1976): *Linseed*. In: *Vegetable Oil Seed Crops in Australia*. Ed. Matheson, E.M., Holt, Rinehart and Winston, Sydney, Australia, 111 - 121.
- 133) Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. (1992): *Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation*. Journal of the Science of Food and Agriculture 60, 313–318.

- 134) Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. (1996): *Antioxidative action of some flavonoids at ambient and high temperatures*. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse 73, 445–449.
- 135) Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. (1998): *Antioxidative action of quercetin and morin in triacylglycerols of sunflower oil at ambient and high temperatures*. Seifen Öle Fette Wachse 124, 10–16.
- 136) Marinova, E., A. Toneva, N. Yanishlieva (2008): *Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil*. Food Chemistry 106, 2 (15), 628-633.
- 137) Meister, U., Schramm, G., Symankk, H. (1994): *Determination of activities of lipase, lipoxigenase and peroxidase in native and extruded cereal brans*. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 199, 275-280.
- 138) Michiels, J. Missotten, J., Fremaut, D., De Smet, S., Dierick, N. (2007): *In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora*. Livestock Science 109, 157–160.
- 139) Michiels J, Missotten J, Van Hoorick A, Ovyyn A, Fremaut D, De Smet S, Dierick N (2010): *Effects of dose and formulation of carvacrol and thymol on bacteria and some functional traits of the gut in piglets after weaning*. Arch. Anim. Nutr. 64 (2), 136–154.
- 140) Michotte, D., Rogez, H., Chirinos, R., Mignolet, E., Campos, D., Larondelle, Y. (2011): *Linseed oil stabilization with pure natural phenolic compounds*. Food Chemistry 129, 1228 - 1231.
- 141) Milosavljević, Z., Puača, V. (1978): *Stočna hrana*. Privredni pregled, Beograd.
- 142) Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T. (2002): *Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catehins*. Biochim. Biophys. Acta 1569, 35-44.

- 143) Mościcki, L., van Zuilichem, D. (2011): *Extrusion-cooking technology* In *Extrusion cooking techniques: Applications, theory and sustainability*, Ed. Mościcki, L., Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- 144) Mountzouris, K.C., Paraskevas, V., Tsirtsikos, P., Palamidi, I., Steiner, T., Schatzmayr, G., Fegeros, K. (2011): *Assessment of a phytogetic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition*. *Animal Feed Science and Technology* 163 (3-4), 223-231.
- 145) Muntean, M.-V., Drocas, I., Marian, O., Barbieru, V., Ranta, O. (2012): *Aspects of Thermoplastic Extrusion in Food Processing*. *Bulletin UASVM Agriculture*, 69(2), Print ISSN 1843-5246; Electronic ISSN 1843-5386.
- 146) Myers, R. H., Montgomery, D. C., *Response Surface Methodology (1995): Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons, New York (USA).
- 147) Nawar, W.W. (1998): *Biochemical proceses: lipid instability*. In *Food storage stability*, Eds. Taub, I., Singh, P., CRC Press LLC, California.
- 148) Negi, P. S. (2012): *Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application*. *International Journal of Food Microbiology* 156 (1), 7-17.
- 149) Newkirk, R. (2008): *Flax feed industry guide*. Flax Canada 2015, Winnipeg, Manitoba, Canada.
- 150) Nissiotis, M., Tasioula-Margari, M. (2002): *Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation*. *Food Chemistry*, 77 371–376.
- 151) NIST/SEMATECH (2012): *e-Handbook of Statistical Methods*. The National Institute of Standards and Technology (NIST), USA, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>
- 152) O'Connor, J., Perry, H., Harwood, J., (1992): *A comparison of lipase activity in various cereal grains*. *J. Cereal Sci.* 16, 153–163.

- 153) Ogasahara, J., Hariu, H., Takahashi, M. (1991) *Process for producing liquid egg having reduced cholesterol content and food containing liquid egg thus produced*. European-patent-application EP 0 426 425 A1, JP 89-282217 (19891030).
- 154) Oomah D. (2001): *Flaxseed as a functional food source*. Journal of the science of food and agriculture 81, 889 - 894.
- 155) Oomah, D., Mazza, G. (2000): *Bioactive components of flaxseed: Occurrence and health benefits*. In: *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, Eds. Shahidi F., Ho C.-T., AOCS Press USA, 106 – 121.
- 156) Oomah, D., Mazza, G. (1993): *Flaxseed proteins review*. Food Chem. 48, 109 - 114.
- 157) Oral, E., Rowell, S., Muratoglu, O. (2006): *The Effect of A-Tocopherol on The Oxidation and Free Radical Decay in Irradiated UHMWPE*. Biomaterials 27(32), 5580–5587.
- 158) Pahoja, V., Sethar, M. (2002): *A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms*. Pakistan Journal of Applied Science 2(4), 474-484.
- 159) Panella, N.A., M.C. Dolan, J.J. Karchesy, Y. Xiong, J., Peralta-Cruz, M., Khasawneh, J.A. Montenieri, and G.O. Maupin (2005): *Use of novel compounds for pest control: Insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska Yellow Cedar*. J. Med. Entomol. 42, 352-358.
- 160) Pansawat, N., Jangchud, K., Jangchud, A., Wuttijumnong, P., Saalia, F.K., Eitenmiller, R.R., Phillips, R.D. (2008): *Effects of extrusion conditions on secondary extrusion variables and physical properties of fish, rice-based snacks*. LWT - Food Science and Technology, 41(4), 632-641.
- 161) Pelembe, L. A. M., Erasmusw, C. Taylor, J. R. N. (2002): *Development of a Protein-rich Composite Sorghum–Cowpea Instant Porridge by Extrusion Cooking Process*. LWT 35, 120–127.
- 162) Pérez, A.A., Drago, S.R., Carrara, C.R., De Greef, D.M., L. Torres, R.L., González, R.J. (2008): *Extrusion cooking of a maize/soybean mixture: Factors affecting expanded product characteristics and flour dispersion viscosity*. Journal of Food Engineering 87 (3), 333-340.

- 163) Piletić M. V., Milić B.Lj. (1989): *Organska hemija III deo*, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- 164) Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje Republike Srbije, Službeni glasnik Republike Srbije br. 4/2010.
- 165) Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane, Službeni list SFRJ, br. 15/87.
- 166) Quéguiner, C., Dumay, E., Cavalier, C., Cheftel, J., C. (1989): *Reduction of Streptococcus thermophilus in a whey protein isolate by low moisture extrusion cooking without loss of functional properties*. International Journal of Food Science & Technology 24 (6), 601–612.
- 167) Rahman, M.S., Hossain, M.A., Ahmed, G.M. Uddin, M.M., Yeasmin, S. (2008): *Studies on the Effect of Antioxidants on the Stability of Sesame (Sesame indicum linn.) Seed Oil During Storage*. Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 43(2), 235-242.
- 168) Rao, S.K., Arzt, W.E. (1989): *Effect of extrusion on lipid oxidation*. Journal of food science 54, 1580-1583.
- 169) Regulation (EC) No 1334/2008 of The European Parliament and of The Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC. Official Journal of the European Communities, L354, 34 - 50.
- 170) Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., Gutiérrez-Dorado, R., Paredes-López, O., Cuevas-Rodríguez, E.O., Garzón-Tiznado, J.A. (2003): *Instant flour from quality protein maize (Zea mays L). Optimization of extrusion process*. LWT - Food Science and Technology 36 (7), 685-695.
- 171) Riaz, M.N. (2007): *Extruders and Expanders in Pet Food*. Aquatic and Livestock Feeds, Clenze, Germany.
- 172) Riaz, M.N. (2000): *Extruders in Food Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Filadelfia.

- 173) Rižner Hraš, A., Hadolin, M., Knez, Ž., Bauman, D. (2000): *Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil*. Food Chemistry 71 (2), 229-233.
- 174) Rudnik, E., Szczucinska, A., Gwardiak, H., Szulc, A., and Winiarska, A. (2001): *Comparative studies of oxidative stability of linseed oil*. Thermo. Acta 370, 135 – 140.
- 175) Roberfroid, M.B. (1999): *What is beneficial for health? The concept of functional food*. Food and Chemical Toxicology 37, 1039-1041.
- 176) Sauvant, D., Perez, J.M., Tran, G. (2000): *Tables of composition and nutritive value of feed*. INRA Edition Versailles, Clermont-Ferrand, France.
- 177) Schaaft Technologie GmbH: Basic Extrusion, 1995.
- 178) Scollan, N. D., Costa, P., Hallett, K. G., Nute, G. R., Wood, J. D., Richardson, R. I. (2006): *The fatty acid composition of muscle fat and relationships to meat quality in Charolais steers: influence of level of red clover in the diet*. Proceedings of the British Society of Animal Science, 2006, 23.
- 179) Scollan, N., Dhanoa, M.S., Choi, N.J., Maeng, W.J., Enser, M., Wood, J.D. (2001): *Biohydrogenation and digestion of long chain fatty acids in steers fed on different sources of lipid*. J. Agric. Sci. 136, 345–55.
- 180) Shaidi, F. (2002): *Extraction and analysis of lipids*. In Food lipids – chemistry, nutrition and biotechnology, ed. Akoh, C., Marsel Dekker Inc, New York - Basel.
- 181) Sherwin, E.R. (1990). *Antioxidants*. In *Food additives*, eds. A. L. Branen, P. M. Davidson and S. Salminen, (pp. 139-193). New York: Marcel Dekker.
- 182) Schnitzer, E., Pinchuk, I., & Lichtenberg, D. (2007): *Peroxidation of liposomal lipids*. European Biophysics Journal 36, 499–515.
- 183) Sediqi, M.N. (2012): *Adaptability of Oilseed Species at High Altitudes of Colorado and Technology Transfer to Afghanistan*. MSc Thesis, Colorado State University, Fort Collins, Colorado.
- 184) Senkoylu, N., Dale, N. (1999): *Sunflower Meal in poultry Diets: A Review*. World poultry science journal 56 (6), 153-174.

- 185) Sicilia T., Niemeyer H., Honig D., Metzler M. (2003): *Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds*. J. Agric. Food Chem. 51, 1181 - 1188.
- 186) Silva, M., Santana, L., Mentele, R., Ferreira, R., de Miranda, A., Silva-Lucca, R., Sampaio, M., Correia, M., Oliva, M. (2012): *Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from Bauhinia forficata seeds*. Process Biochemistry 47, 1049–1059.
- 187) Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Comalada, M., Olivares, M., Xaus, J. (2008): *Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid equally incorporate as decosahexaenoic acid but differ in inflammatory effects*. Nutrition 24, 245 - 254.
- 188) Smith, S.A., King, R.E., Min,D.B. (2007): *Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil*. Food Chemistry 102, 1208 – 1213.
- 189) Soto-Blanco, B., Górnjak, S. (2004): *Prenatal toxicity of cyanide in goats—a model for teratological studies in ruminants*. Theriogenology 62, 1012 – 1026.
- 190) Spence, J. (2006): *Challenges related to the composition of functional foods*. Journal of Food Composition and Analysis 19, S4-S6.
- 191) SRPS EN ISO 4833/2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama - Tehnika brojanja kolonija na 30°C. I izdanje, Institut za standardizaciju Srbije.
- 192) SRPS EN ISO 6888-1/09. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za određivanje broja koagulaza - pozitivnih stafilokoka (Staphylococcus aureus i druge vrste) – Deo 1 Tehnika upotrebom agara po Bierd-Parker-u. I izdanje, Institut za standardizaciju Srbije
- 193) Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005): *Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites*. Current Opinion in Biotechnology 16, 198–203.
- 194) Steel, C. J., Dobarganes, M. C., Barrera-Arellano, D. (2005): *The influence of natural tocopherols during thermal oxidation of refined and partially hydrogenated soybean oils*. Grasas y Aceites 56 (1), 46-52.

- 195) Suhaj M, Rácová J., Polovka M., Brezová V. (2006): *Effect of gamma-irradiation on antioxidant activity of black pepper (Piper nigrum L.)*. Food Chemistry, 97, 696–704.
- 196) Tacchi, L., Bickerdike, R., Douglas, A., Secombes, C.J., Martina, S.A.M. (2011): *Transcriptomic responses to functional feeds in Atlantic salmon (Salmo salar)*. Fish & Shellfish Immunology 31, 704-715
- 197) Tampieri, M., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M.S., Falcioni, L., Cioni, P.L., Morelli, I. (2005): *The inhibitin of Candida albicans by selected essential oils and their major components*. Mycopathologia 59, 339-345.
- 198) Tepe, B., M. Sokmen, H.A. Akpulat, D. Daferera, M. Polissiou, and A. Sokmen. (2005): *Antioxidative activity of the essential oils of Thymus sipyleus subsp. sipyleus var. sipyleus and Thymus sipyleus subsp. sipyleus var. rosulans*. Journal of Food Engineering 66, 447-454.
- 199) Ting, S. Yeh, H.S., Lien, T.F. (2011): *Effects of supplemental levels of hesperetin and naringenin on egg quality, serum traits and antioxidant activity of laying hens*. Animal Feed Science and Technology 163 (1), 59-66.
- 200) Traber, M., Atkinson, J. (2007): *Vitamin E, antioxidant and nothing more*. Free Radical Biology & Medicine 43, 4–15.
- 201) Trautmann, H., Weihs, C. (2006): *On the distribution of the desirability index using Harrington's desirability function*. Metrika 63, 207-213.
- 202) Tuzcu M, Sahin N, Karatepe M, Cikim G, Kilinc U, Sahin K. (2008): *Epigallocatechin-3-gallate supplementation can improve antioxidant status in stressed quail*. British Poultry Science 49, 643-648.
- 203) Ultee, A., Bennik, M. H. & Moezelaar, R. (2002): *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 68, 1561–1568.
- 204) Ultee, A., Smid, E.J., (2001): *Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology 64, 373 – 378.
- 205) Vetter, J. (2000): *Plant cyanogenic glycosides*. Toxicon 38, 11 - 36.

- 206) Van Den Hout, R., Jonkers, J., Van Vliet, T., Van Zuilichem, D. J., Van 'T Riet, K. (1998): *Influence of Extrusion Shear Forces on The Inactivation of Trypsin Inhibitors in Soy Flour*. Food and Bioproducts Processing 76 (3), 155–161.
- 207) Van Eys, J.E., Offner, A., Bach, A. (2004): *Manual of Quality Analyses for Soybean Products in the Feed Industry*. American soybean association, United soybean board, Luxembourg.
- 208) Van Zuilichem, D.J. (1992): *Extrusion Cooking. Craft or science?* PhD thesis, Wageningen University, Netherlands.
- 209) Vainionpää, J. (1995): *Numerical solution of response surface equations for extrusion cooked cereals*. Journal of Food Engineering 24 (2), 181-196.
- 210) Vainionpää, J. (1991): *Modelling of extrusion cooking of cereals using response surface methodology*. Journal of Food Engineering 13(1), 1-26.
- 211) Vieira, S. L., Oyarzabal, O. A., Freitas, D. M., Berres, J., Peña, J. E. M., Torres, C. A., Coneglian, J. L. B. (2008): *Performance of Broilers Fed Diets Supplemented with Sanguinarine-Like Alkaloids and Organic Acids*. J. Appl. Poult. Res. 17, 128–133.
- 212) Vilamide, M.J., San Juan, L.D. (1998): *Effect of chemical composition of sunflower seed meal on its true metabolisable energy and amino acid digestibility*. Poul. Sci. 77, 1884-1892.
- 213) Wagner, K.-H., Elmadfa, I. (2000): *Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 102 (10), 624-629.
- 214) Wanasundara, N.U., Shahidi, F. (1998): *Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils*. Food chemistry 63(3), 335-342.
- 215) Wang, L., Piao, X.L., Kim, S.W., Piao, X.S., Shen, Y.B., Lee, H.S. (2008): *Effects of Forsythia suspensa extract on growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities in broiler chickens under high ambient temperature*. Poultry Science 87, 1287-1294.
- 216) Wang, L., Chessari, C., Karpie, E. (2001): *Inferential control of product quality attributes—application to food cooking extrusion process*. Journal of Process Control 11 (6), 621–636.

- 217) Waraho, T., Mc Clements, J., Decker, E. (2011): *Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions*. Food Chemistry 129, 854–859.
- 218) Ward, A. T., K. M. Wittenberg, and R. Przybylski. (2002): *Bovine Milk Fatty Acid Profiles Produced by Feeding Diets Containing Solin, Flax and Canola*. J. Dairy Sci. 85, 1191-1196.
- 219) Warner, K. (2005): *Effects on the flavor and oxidative stability of stripped soybean and sunflower oils with added pure tocopherol*. Journal of Agricultural Food Chemistry 53, 9906-9910.
- 220) Warr J., Michaud P., Picton L., and Courtois J. (2003): *Large-scale purification of water-soluble polysaccharides from flaxseed mucilage and isolation of a new anionic polymer*. Chromatographia 58, 331 - 335.
- 221) Wicklund, T. , Magnus E. M. (1997) *Effect of Extrusion Cooking on Extractable Lipids and Fatty Acid Composition in Sifted Oat Flour*. Cereal chemistry 74 (3), 326-329.
- 222) Woodroffe, J.M. (1993): *Dry Extrusion Applications in The Feed Industry*. Technical Bulletin 5, American Soybean Association.
- 223) Wu, M., Li, D., Zhou, Y.-G., Brooks, M. S.-L., Chen, X. D., Mao, Z. H. (2008): *Extrusion detoxification technique on flaxseed by uniform design optimization*. Sep. Purif. Technol. 61, 51 - 59.
- 224) Yağcı, S., Göğüş, F. (2008): *Response surface methodology for evaluation of physical and functional properties of extruded snack foods developed from food-by-products*. Journal of Food Engineering 86 (1), 122-132.
- 225) Yang,T.-Sh., Chu, Y.-H., Liu, T.-T. (2005): *Effects of storage conditions on oxidative stability of soybean oil*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85 (9), 1587-1595.
- 226) Zademowski, R., Nowak-Polanska, H., Wicklund, T., Fomal, L. (1997): *Changes in oat lipids affected by extrusion*. Nahrung 41, 224-227.

- 227) Zademowski, R., Nowak-Polanska, H., Rashed A.A. (1999): *The influence of heat treatment on the activity of lipo- and hidrophyllic components of oat grain*. Journal of food processing and preservation 23, 177-191.
- 228) Zayas, J.F. (1997): *Functionality of proteins in food*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- 229) Zhang, M., Bai, X., Zhang, Z. (2011): *Extrusion process improves the functionality of soluble dietary fiber in oat bran*. Journal of Cereal Science 54 (1), 98-103
- 230) Zheng, Y., Wiesenborn, D.P., Tostenson, K., and Kangas, N.: Bench scale screw pressing of flaxseed and flaxseed embryos. In *“Proceedings of the 59th Flax Institute of the United States”* Fargo, Netherland, 2002, 30 – 37.
- 231) Ziolkovska, A. (2012): *Laws of flaxseed mucilage extrction*. Food Hydrocoloids 26 (1), 197-204.
- 232) Zhu, S., Riaz, M., Lusas, E. (1996): *Effect of different extrusion temperatures and moisture content on lipoxygenase inactivation and protein solubility in soybeans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 3315-3318
- 233) Zuta P.C., Simpson B.K., Zhao X., Leclerc L., (2007): *The effect of α -tocoferol on the oxidation of mackerel oil*. Food Chem. 100, 800-807.
- 234) Žilić, S., Šobajić, S., Mladenović Drinić, S., Kresović, B., Vasić, M. (2010): *Effects of Heat Processing on Soya Bean Fatty Acids Content and The Lipoxygenase Activity*. Journal of Agricultural Sciences 55 (1), 55-64.