

Nutritivna i fizikalna svojstva bezglutenskoga kruha s dodatkom posija prosa

Štrkalj, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:570718>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Lucija Štrkalj

1045/N

**NUTRITIVNA I FIZIKALNA
SVOJSTVA BEZGLUTENSKOGA
KRUHA S DODATKOM POSIJA
PROSA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Novotni Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad izrađen je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost: Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (IP-2016-06-3).

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Novotni na odabiru zanimljive teme za diplomski rad te za pruženu pomoć, pristupačnost i srdačnost tijekom njegovog izvođenja i pisanja.

Zatim se želim zahvaliti asistentici Matei Habuš i tehničarki Lidiji Drobac na pomoći prilikom provođenja eksperimentalnog dijela rada.

Na kraju, najviše se zahvaljujem svojoj čitavoj obitelji, a pogotovo mami, na podršci tijekom cijeloga mogega obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehniološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju žitarica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

NUTRITIVNA I FIZIKALNA SVOJSTVA BEZGLUTENSKOGA KRUHA S DODATKOM POSIIJA PROSA

Lucija Štrkalj, 1045/N

Sažetak: *Bezglutenski kruh često ima neadekvatan nutritivni sastav i nepoželjne senzorske karakteristike pa se traže načini za njegovo obogaćivanje. Proso je nedovoljno iskorištena bezglutenska žitarica čije su posije bogate vlaknima, fenolnim spojevima i mikronutrijentima. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogućnost primjene posija prosa u bezglutenski rižin kruh. Ispitan je utjecaj veličine čestica posija prosa (krupne, srednje i sitne) i utjecaj dodatka enzima ksilanaze na nutritivna i fizikalna svojstva kruha. Analizama je ustanovljeno da je dodatkom posija prosa (10% na brašno) značajno povećan udio vlakana (za 63 – 87 %) i fenolnih spojeva (za 40 – 100 %). Obogaćene vrste kruha mogu se deklarirati kao „izvor vlakana“. Pritom, volumen, tekstura i izgled kruha nisu bili narušeni. Primjenom posija smanjena je viskoznost, što može ukazati na niži glikemijski indeks te produljenu svježinu kruha. Najizraženije djelovanje ksilanaze je primjećeno na kruhu s posijama srednje veličine ($d(0,5)=157,03 \mu\text{m}$). Navedeni kruh imao je najviši udio vlakana (4,75 g na 100 g kruha) s udjelom topljivih vlakana od 25 %, a udio fenolnih spojeva bio je 27,06 mg na 100 g kruha. Zaključno, primjena posija prosa nutritivno je obogatila bezglutenski rižin kruh, a za optimiranje primjene ksilanaze potrebno je još istraživanja.*

Ključne riječi: bezglutenski kruh, fenolni spojevi, ksilanaza, posije prosa, prehrambena vlakna

Rad sadrži: 71 stranica, 16 slika, 13 tablica, 123 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni*

Pomoć pri izradi: *mag. ing. Matea Habuš, tehničarka Lidija Drobac, bacc. ing. agr*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Duška Ćurić
2. Izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni
3. Doc. dr. sc. Martina Bituh
4. Prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Cereal Chemistry and Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition Science

NUTRITIVE AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF GLUTEN-FREE BREAD WITH MILLET BRAN

Lucija Štrkalj, 1045/N

Abstract: *Gluten-free bread often has poor nutritional composition and sensory characteristics, therefore different methods for its improvement are being developed. Millet is underutilized cereal whose bran is rich in fibre, phenolic compounds and micronutrients. The aim of this work was to examine the addition of millet bran in gluten-free rice bread. The impact of applied 3 different fractions of bran (large, medium and small) as well as the impact of xylanase on nutritive and physical characteristics was observed. Analysis showed that added brans (10 %) significantly increased the amount of fibre (by 63 – 87 %) and phenolic content (by 40 – 100 %). Enriched breads can be declared as „source of fibre“. Volume, colour, texture and appearance were adequate. Said breads also had lower viscosity values, which can be mean lower glycaemic index and longer shelf-life. Xylanase had the biggest impact on bread with medium-size brans ($d(0,5)=157,03 \mu\text{m}$). It had the highest content of fibre (4,75 g in 100 g bread) with 25 % soluble fibre, and the amount of phenolic compounds was 27,06 mg in 100 g bread. In conclusion, the application of millet bran improved nutritional composition of gluten-free rice bread, and the use of xylanase should be further optimised.*

Keywords: dietary fibre, gluten-free bread, millet bran, phenolic compounds, xylanase

Thesis contains: 71 pages, 16 figures, 13 tables, 123 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD., Dubravka Novotni, Associate professor*

Technical support and assistance: *Lidija Drobac, univ. bacc. ing., Matea Habuš, univ. mag. ing., Scientific assistant*

Reviewers:

1. PhD., Duška Ćurić, Full professor
2. PhD., Dubravka Novotni, Associate professor
3. PhD., Martina Bituh, Assistant professor
4. PhD., Ines Panjkota Krbavčić, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 23, 2019

Sadržaj:

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. GLUTEN I POREMEĆAJI VEZANI UZ GLUTEN | 2 |
| 2.2. KVALITETA BEZGLUTENSKE HRANE I PREHRANE..... | 3 |
| 2.2.1. Upotreba rižinog brašna u bezglutenskim proizvodima | 7 |
| 2.3. PROSO..... | 8 |
| 2.3.1. Obično proso (<i>Panicum miliaceum</i> L.)..... | 8 |
| 2.3.2. Prehrambena vlakna prosa | 10 |
| 2.3.3. Fenolne kiseline u prosu | 12 |
| 2.4. POSIJE..... | 13 |
| 2.5. KSILANAZA..... | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 3.1. MATERIJALI | 17 |
| 3.1.1. Sirovine..... | 17 |
| 3.1.2. Uzorci..... | 17 |
| 3.2. METODE RADA..... | 18 |
| 3.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica..... | 18 |
| 3.2.2. Postupak izrade kruha | 19 |
| 3.2.3. Određivanje kemijskih i fizikalnih svojstava kruha..... | 20 |
| 3.2.3.1. Određivanje udjela vode | 21 |
| 3.2.3.2. Određivanje sastava prehrambenih vlakana..... | 21 |
| 3.2.3.2.1. Priprema uzoraka | 23 |
| 3.2.3.2.2. Određivanje netopljivih vlakana..... | 23 |
| 3.2.3.2.3. Određivanje vlakana topljivih u vodi i netopljivih u 78%-tnom etanolu..... | 24 |
| 3.2.3.2.4. Određivanje vlakana topljivih u vodi i u 78%-tnom etanolu..... | 24 |
| 3.2.3.3. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva | 27 |
| 3.2.3.4. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva | 28 |
| 3.2.3.5. Određivanje sastava fenolnih kiselina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) | 29 |
| 3.2.3.6. Određivanje volumena i specifičnog volumena..... | 33 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3.7. Određivanje boje sredine kruha | 33 |
| 3.2.3.7. Određivanje teksture sredine kruha | 34 |
| 3.2.3.8. Određivanje viskoznosti suspenzije kruha u vodi..... | 34 |
| 3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA..... | 34 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 36 |
| 4.1. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA RIŽINOG BRAŠNA I POSIJA PROSA | 36 |
| 4.2. NUTRITIVNA SVOJSTVA KVALITETE KRUHA | 38 |
| 4.2.1. Udio vode..... | 38 |
| 4.2.2. Udio i sastav prehrambenih vlakana | 40 |
| 4.2.3. Ukupni fenolni spojevi..... | 42 |
| 4.2.4. Sastav fenolnih kiselina | 44 |
| 4.3. FIZIKALNA SVOJSTVA KVALITETE KRUHA..... | 46 |
| 4.3.1. Specifični volumen kruha | 46 |
| 4.3.2. Izgled i boja kruha | 48 |
| 4.3.3. Tekstura sredine kruha..... | 50 |
| 4.3.4. Viskoznost suspenzije kruha u vodi..... | 52 |
| 4.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA | 54 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 58 |
| 6. LITERATURA | 60 |

1. UVOD

Procijenjeno je da oko 5 % svjetske populacije ima određeni poremećaj vezan uz gluten, što znači da moraju prilagoditi svoju prehranu i izbjegavati gluten. Osim toga, sve je više ljudi koji se samostalno odlučuju za provođenje bezglutenske prehrane. Tržište bezglutenskih pekarskih proizvoda sve je veće te se predviđa njegov daljni rast. Međutim, bezglutenski kruh često je nutritivno siromašan – ima visok glikemijski indeks, mali udio vlakana, visoke udjele masti i šećera te nedovoljnu količinu mikronutrijenata i bioaktivnih spojeva. Istraživanja su pokazala da ljudi koji imaju neku vrstu poremećaja vezanog uz gluten najčešće imaju neadekvatan nutritivni status. Također, proizvodnja bezglutenskog kruha nailazi na određene izazove – tijesto je ljepljivo i tekuće, a kruh ima manji volumen te brže stari. Bezglutenski kruh obično ima nezadovoljavajuće senzorske karakteristike. Zbog navedenih nutritivnih svojstava i svojstava kvalitete, traže se različiti načini za obogaćivanje bezglutenskog kruha.

Proso je nedovoljno iskorištena žitarica koja može rasti u nepovoljnim uvjetima, njezin uzgoj zahtjeva relativno malu količinu vode, a ima poželjan nutritivni i bioaktivni profil. U Europi i u Hrvatskoj se najčešće konzumira obično proso (*Panicum miliaceum* L.).

Posije su vanjski dio zrna žitarice koji je bogat vlaknima, vitaminima, mineralnim tvarima te antioksidacijskim spojevima. Njihovom primjenom može se nutritivno obogatiti bezglutenski kruh. No, posije mogu negativno djelovati na fizikalna svojstva kruha te je potrebno istražiti koja vrsta, količina i frakcija posija optimalno djeluje na svojstva bezglutenskog kruha. Za poboljšanje djelovanja posija na kruh, mogu se primjenjivati različiti enzimi.

Uzevši u obzir navedene izazove pekarske industrije da se proizvede bezglutenski kruh koji ima poželjna svojstva kvalitete i koji je nutritivno obogaćen, u ovom radu je ispitana primjena posija prosa u bezglutenski rižin kruh jednostavne recepture. Upotrijebljene su tri različite veličine posija prosa. Kako bi se poboljšala svojstva konačnoga kruha, primijenjen je enzim ksilanaza, koji djeluje na vlakna posija.

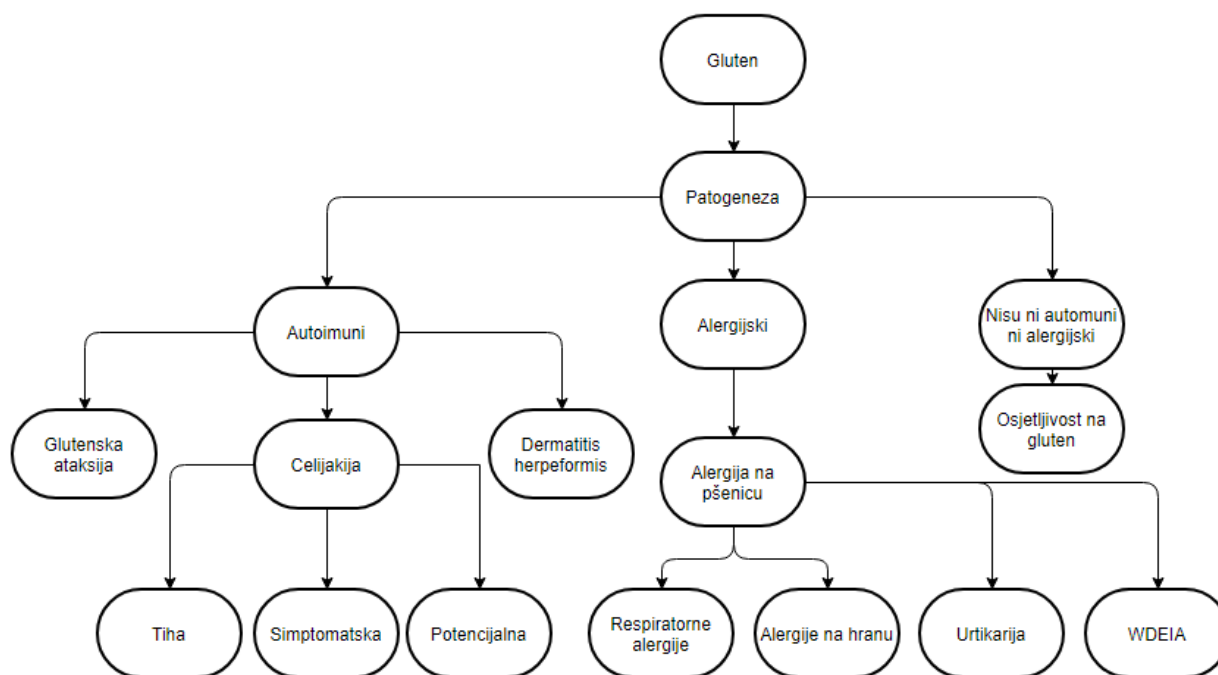
Stoga je cilj ovoga rada bio poboljšati bioaktivni potencijal i nutritivni sastav rižinog kruha bez narušavanja fizikalnih svojstava kvalitete primjenom posija prosa ovisno o veličini čestica i dodatku ksilanaze.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GLUTEN I POREMEĆAJI VEZANI UZ GLUTEN

Gluten, prema Codex Alimentarius-u, je proteinska frakcija koja se nalazi u pšenici, raži, ječmu te zobi (ili u njihovim križanim sortama i derivatima) na koju su određene osobe intolerantne i koja nije topljiva u vodi ni u 0,5 M otopini natrijevog klorida (1). Gluten se sastoji od dvije frakcije: prolaminske i glutelinske. Prolaminska frakcija, koja se u pšenici naziva glijadin, bogata je prolinom i glutaminom. Glijadin čini tijesto viskoznom i pozitivno djeluje na volumen pekarskog proizvoda. Glutelinska frakcija, koja se u pšenici naziva glutenin, daje tijestu elastičnost i otpornost na rastezanje i time mu omogućuje da zadrži određeni oblik (2).

Poremećaje vezane uz gluten možemo podijeliti u 3 skupine, ovisno o reakciji ljudskog organizma na gluten (3). Detaljna podjela poremećaja vezanih uz gluten prikazana je na slici 1.



Slika 1. Podjela poremećaja vezanih uz gluten (3)

Procijenjeno je da 5 % svjetske populacije ima određeni poremećaj vezan uz gluten (4). Od poremećaja prikazanih na slici, celijakija je vjerojatno najpoznatiji. Pojedinci koji imaju celijakiju imaju HLA tip II DQ2 i/ili DQ8 alele. To znači da se kod njih događa imunski odgovor organizma pri unosu glutena (točnije, glijadina) i to je genetski uvjetovano. Imunosna reakcija potaknuta je

T-stanicama koje zatim izazivaju imunosnu reakciju protiv enzima transglutaminaze, a to će s vremenom dovesti do atrofije crijevnih resica i oštećenja sluznice u unutrašnjosti crijeva (4).

Alergija na pšenicu pripada skupini alergija koje su posredovane Ig-E protutijelima. Pšenica može izazvati alergijsku reakciju jer sadrži, osim glutena, i druge proteine koji mogu potaknuti imunosnu reakciju, a najpoznatiji su ATI (amilaza-tripsin inhibitori). Alergija na pšenicu može se iskazati kao prehrambena alergija (pšenica se nalazi na popisu „8 glavnih prehrambenih alergena“ (5)), ali može izazvati alergijske reakcije koje uzrokuju zdravstvene probleme dišnog sustava i kože (4).

Osjetljivost na gluten je poremećaj u kojem nema imunosni posredovane reakcije pri unosu glutena u organizam, ali njegov unos može izazvati različite zdravstvene probleme. Za ovaj poremećaj ne postoje dijagnostički testovi koji bi mogli utvrditi boluje li osoba od navedenog poremećaja i teško je procijeniti koliko ljudi pokazuje određenu osjetljivost na gluten. Znanstvenici smatraju da, osim što osoba može biti osjetljiva na gluten, zdravstveni problemi mogu biti posljedica unosa fermentabilnih oligosaharida, disaharida, monosaharida i poliola (FODMAPs) ili mogu biti posljedica malapsorpcije fruktoze (2).

Iako navedeni poremećaji imaju različite mehanizme u pozadini svog djelovanja, ono što im je zajedničko su simptomi (najčešće se iskazuju kao probavne tegobe – nadutost, konstipacija, opstipacija, dijareja, bolovi u abdomenu) i činjenica da lijek za navedene poremećaje ne postoji. Jedini način na koji se mogu ublažiti tegobe izazvane ovim poremećajima je bezglutenska prehrana (6).

2.2. KVALITETA BEZGLUTENSKE HRANE I PREHRANE

Za ljude koji pate od određenog poremećaja vezanog uz gluten jedini lijek je bezglutenska prehrana. No, u zadnjih 10-ak godina sve veći broj ljudi samostalno se odlučuje na bezglutensku prehranu bez dijagnosticiranog poremećaja. Ljudi sve više promatraju bezglutensku prehranu kao „životni stil“ koji je zdraviji i popularniji, a ne kao dijetu koja se preporuča osobama s provjerenom dijagnozom. Od 2014. godine do 2019. godine tržište bezglutenskih proizvoda u Europi godišnje je raslo stopom od 10,4 % i previđa se da će nastaviti rasti još i više (4).

Hranu koja ne sadrže gluten možemo podijeliti u tri skupine:

- a) koje prirodno ne sadrže gluten (odnosno prolamine pšenice, raži, ječma i zobi i njihovih derivata)
- b) kojima je industrijskim postupcima uklonjen gluten i u kojima količina glutena ne prelazi 20 mg kg^{-1}
- c) koje sadrže pšenicu, ječam, raž i/ili zob i njihove derivate te u kojima je gluten prisutan u količini od 20 do 100 mg kg^{-1} (1).

Navedena hrana se može prepoznati po oznaci prekriženog klasa (slika 2).



Slika 2. Oznaka prekriženog klasa za bezglutenske proizvode (7)

Ljudi kojima je dijagnosticirana celijakija, intolerancija ili osjetljivost na gluten obično pokazuju malapsorpciju, odnosno nepotpunu apsorpciju hranjivih tvari. To je posljedica oštećenja crijevne sluznice. Stoga je njihov nutritivni status najčešće neadekvatan. Kako bi im oporavak bio čim brži i lakši te kako bi im se poboljšao nutritivni status, bezglutenski proizvodi i bezglutenska prehrana (BG) mora biti što kvalitetnija (8).

No, ono što su brojna istraživanja pokazala je da bezglutenska dijeta rezultira neadekvatnim nutritivnom statusom. Ljudi koji se trebaju pridržavati bezglutenske¹ prehrane prvenstveno paze da ne unesu gluten, pa im kvaliteta same prehrane postaje manje važna (9).

Žitarice su uvelike zaslužne za unos vlakana u ljudskoj prehrani. No, primjena BG prehrane podrazumijeva izbjegavanje pšenice, raži, ječma i zobi. Dokazano je da osobe koje se pridržavaju BG dijeta unose manje vlakana nego što je preporučeno (28 g/dan za žene, 36 g/dan za muškarce (10, 11)). BG proizvodi koji su zamjena uobičajenim pekarskim proizvodima obično sadržavaju

¹ U daljnjem tekstu koristi se skraćenica za BG za riječ “bezglutenski/a”.

rafinirana brašna i škrobove, a takvi proizvodi imaju smanjen udio vlakana te povećan glikemijski indeks (9). Miješanjem škroba i vode pri povišenoj temperaturi (od 60 do 80°C) dolazi do želatinizacije škroba. Enzim α -amilaza lako i brzo hidrolizira želatinizirani škrob. To znači da što je više želatiniziranog škroba, to je i viši glikemijski indeks. Osim toga, povišenom glikemijskom indeksu BG proizvoda pridonosi i činjenica da BG proizvodi često sadržavaju više šećera u usporedbi sa sličnim proizvodima koji sadržavaju gluten (10). Osim modificiranih škrobova, u BG proizvode često se dodavaju emulgatori, ulja i masti kako bi se dobilo tijesto koje ima što sličnija svojstva tijestu koje sadrži gluten. Zbog toga BG proizvodi mogu sadržavati i dvostruko više zasićenih masnih kiselina te imati veću energetska vrijednost (12). Visoki unos šećera i masti, konzumiranje hrane visokog glikemijskog indeksa te neadekvatan unos mikronutrijenata može dovesti do metaboličkog sindroma, što znači da ljudi koji se pridržavaju BG prehrane i konzumiraju BG proizvode imaju veći rizik od razvijanja metaboličkog sindroma (13).

Kod osoba na BG prehrani, primijećen je manjak mikronutrijenata, posebno vitamina D, vitamina B skupine te Ca, Mg, Fe i Zn (14). Jedan od razloga navedenih nedostataka je upotreba sirovina koje su siromašne navedenim mikronutrijentima. Pri analiziranju BG proizvoda ustanovljeno je da su ili siromašan ili umjereno adekvatan izvor mikronutrijenata (14). U istraživanju Hallerta i suradnika, koji su proučavali nutritivni status ljudi koji su se pridržavali BG prehrane 8-12 godina, ustanovljen je nizak status folata i vitamina B12 te povišen homocistein, što označava neadekvatan vitaminski status (15). U određenim zemljama (na primjer, Velika Britanija) zakonski je obvezno obogaćivanje brašna vitaminima B skupine i određenim mineralima. No, to ne vrijedi za bezglutenska brašna pa je i to jedan od razloga zašto su BG proizvodi siromašniji mikronutrijentima (12). Zbog oštećenja crijevne sluznice, može doći do sekundarne intolerancije na laktozu jer se stvara manje enzima laktaze. Mliječni proizvodi se ne mogu probavljati pa ih oboljeli prestaju konzumirati. Budući da su mliječni proizvodi bogati kalcijem te mogu biti obogaćeni vitaminom D, to se negativno odražava na status kalcija i vitamina D (16). Još jedna posljedica oštećenja crijevne sluznice je i neadekvatna razina željeza. Željezo se najvećim dijelom apsorbira u duodenumu i u prvom dijelu jejunuma pa je zbog oštećene sluznice njegova apsorpcija nikakva ili vrlo niska, a to može rezultirati anemijom (17). Osim željeza, i cink se apsorbira u duodenumu i prvom dijelu jejunuma, pa je i njegov nedostatak posljedica oštećenja sluznice (18).

U radu iz 2019. godine navedeni su nedostaci određenih nutrijenata kod pacijenata kojima je tek dijagnosticirana celijakija i nedostaci kod ljudi koji se pridržavaju BG prehrane (10). Ono što se može uočiti je to da su pojedini nedostaci isti, što znači da je neadekvatan unos navedenih nutrijenata posljedica bolesti, ali i konzumacije nekvalitetnih BG proizvoda. Podatci o neadekvatnom statusu prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Nutritivni status pri dijagnozi celijakije i tijekom provođenja BG prehrane (10)

| Nutritivni status pri dijagnozi | Nutritivni status tijekom provođenja BG prehrane |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Manjak željeza - Manjak cinka - Manjak kalcija - Manjak folata i vitamina B12 - Manjak vitamina A, D, E i K - Prekomjerni unos masti - Sekundarna laktoza intolerancija | <ul style="list-style-type: none"> - Manjak željeza - Manjak kalcija - Manjak selena, cinka i magnezija - Manjak vitamina B12, folata i vitamina C - Manjak vitamina D - Prekomjerni unos masti - Prekomjerni unos šećera - Neadekvatan unos proteina - Nizak unos prehrambenih vlakana |

U namjeri da BG proizvodi budu nutritivno bogatiji, postoje različiti načini za njihovo poboljšanje. Dodatkom cjelovitih brašna prirodno bezglutenskih žitarica i pseudožitarica kao što su proso, sirak, heljda, amarant i kvinoja, poboljšavaju se senzorska svojstva i pridonosi se količini vlakana i proteina. Koriste se i različita brašna mahunarki: sojino, rogačevo te slanutkovo. Za povećanje udjela omega-3 masnih kiselina dodaju se chia sjemenke, u obliku sjemenki i brašna. One vežu veliku količinu vode i utječu na strukturu tijesta. Voće i povrće su također našli mjesto u proizvodnji BG proizvoda. Grašak, banane, groždice, kivi, naranče i jagode samo su neki od njih (19).

Osim što su BG pekarski proizvodi nutritivno siromašniji od standardnog kruha, s tehnološke strane također nisu zadovoljavajući. BG tijesta nisu elastična i kohezivna te njihova konzistencija sličnija je tijestu za torte. Zbog toga je njima teško rukovati i lijepe se za strojeve. Kruh ima lošiju

teksturu te se mrvi u ustima. Korica i sredina su tvrđi jer molekule vode nisu raspoređene kao što je to u standardnom pšeničnom kruhu. Volumen, svojstvo koje kupac prvo primijeti, je puno manji naspram kruha koji sadrži gluten te je rok trajanja kraći (20).

2.2.1. Upotreba rižinog brašna u bezglutenskim proizvodima

Za pripremu bezglutenskog kruha i drugih bezglutenskih proizvoda, često se upotrebljava riža (*Oryza sativa*). Ona je treća po redu žitarica koja se najviše uzgaja na svijetu, nakon kukuruza i pšenice (21). To je žitarica koja se koristi kao alat protiv malnutricije u nerazvijenim zemljama. Najčešće se konzumira bijela riža, čije zrno čini endosperm. Zbog toga, neadekvatna je razina mikronutrijenata pa su razvijeni različiti načini obogaćivanja (primjerice, folatom i β -karotenom) (22).

Riža ne sadrži gluten i upotrebljava se u izradi brojnih BG pekarskih proizvoda, uključujući i kruh. Rižino brašno posebno je pogodno jer ima nizak udio prolamina, hipoalergeno je, bijele boje i ima neutralan okus (23). No, da bi se proizveo zadovoljavajući BG kruh, traže se zamjene za gluten, a najčešće su to gume i hidrokoloidi (agar, karagenan, pektin, HPMC), prirodni (npr. od kasave) i modificirani (npr. esterski, ekstrudirani) škrobovi te drugi sastojci koji oponašaju ulogu glutena (20).

U radu iz 2012. godine analiziran je dodatak rižinog brašna u pšenični kruh (24). Dodatak od 25 % rižinog brašna nije utjecao na parametre kvalitete niti izgled kruha, no dodatak rižinog brašna veći od 25 % negativno je utjecao na masu, volumen i visinu kruha te viskoznost. Također, vrste kruha koje su sadržavale više od 25 % rižinog brašna (50 %, 75 % ili 100 %) dobile su niže ocjene prilikom senzorske analize.

Budući da BG rižin kruh ne smije sadržavati pšenično brašno, njegova tehnološka kvaliteta postaje upitna, pa je dodatak navedenih aditiva neophodan. S druge strane, ljudi postaju sve više osviješteni o prehrani i žele proizvod bez aditiva koji je nutritivno bogat (25). Stoga je cilj razviti BG kruh od rižinog brašna koji ne sadrži aditive, ima zadovoljavajuća tehnološka i nutritivna svojstva, a privlačan je kupcu.

2.3. PROSO

Proso je specifična skupina kultiviranih žitarica koje nisu iste vrste i ne pripadaju istom rodu. Dobile su zajedničko ime po istoj karakteristici, a to je iznimno mala veličina zrna (26). Najpoznatije vrste prosa su obično proso (*Panicum miliaceum* L.), biserno proso (*Pennisetum glaucum* L.), prstasto proso (*Eleusine coracana* L.), talijansko proso (*Setaria italica* L.), krvavo proso (*Digitaria exilis*) te etiopsko proso ili tef (*Eragrostis tef*) (27). Proso je jedna od najstarijih kultiviranih žitarica. Pronađeni su ostatci prosa na području Grčke koji potječu iz brončanog doba, a u Kini su pronađeni ostatci prosa stari oko 4000 godina (28, 29). U današnjoj svjetskoj proizvodnji žitarica, proso se nalazi na petom mjestu (30). Proso se najviše upotrebljava za prehranu u Aziji i Africi, dok se u Europi i Sjevernoj Americi koristio kao hrana za životinje. No, uzgajanje i konzumacija prosa dobivaju sve veću pozornost u Europi i u SAD-u. Proso može podnijeti i niske i visoke temperature, može rasti na visokim nadmorskim visinama te ne zahtjeva velike količine vode (31). Osim toga, može se koristiti za proizvodnju etanola (32). Uz navedene prednosti u proizvodnji, proso ima i visoku nutritivnu vrijednost. Ne sadržava gluten, stoga ga mogu konzumirati ljudi na bezglutenskoj prehrani. Proso je bogat izvor vitamina, minerala i fitokemikalija, koji imaju pozitivan zdravstveni učinak (33).

2.3.1. Obično proso (*Panicum miliaceum* L.)

Obično proso je godišnja žitarica koja može narasti do 100 cm, ima jarko zelene listove i zrno je jako malo. Postoji 5 podvrsta običnog prosa, a razlikuju se po boji sjemenke, vrsti ljuske te vrsti antocijana. Iznimno je dobro prilagođen na različite klimatske uvjete i na različite vrste tla te je otporan na različite bolesti biljaka i na sušu. Zahtjeva male količine dušika te, u usporedbi s ostalim žitaricama, zahtjeva najmanje količine vode za rast, zbog čega je u današnje doba klimatskih promjena jako poželjna žitarica za uzgoj (34). Obično proso čini 8 % svjetske proizvodnje prosa (27).

Energetska vrijednost prosa iznosi 1552 kJ 100 g⁻¹, a kemijski sastav prikazan je u tablici 2 (27).

Tablica 2. Kemijski sastav običnog prosa (%) (35)

| Proteini | Ugljikohidrati | Vlakna | Lipidi | Mineralne tvari |
|-----------|----------------|------------|-----------|-----------------|
| 11,3 – 13 | 64,5 – 81,4 | 8,9 – 12,5 | 3,5 – 6,7 | 1,5 – 4,2 |

Obično proso sadržava više proteina od ostalih vrsta prosa (od 11,5 do 13 %). Prema Osborne-u, proteini se mogu podijeliti na albumine, globuline, prolamine i gluteline (36). Prolamini imaju najveći udio među proteinima u prosu – neki autori tvrde da je udio prolamina između 25,1 i 36,9 %, dok je prema nekima udio do 50 % (34, 35). Proso ne sadrži gluten. Udio i kvaliteta proteina ovisi o okolišnim uvjetima te o nutrijentima u tlu. Uspoređujući EAAI (eng. *Essential Amino Acid Index*) prosa s kukuruzom, pšenicom, ječmom i zobi, EAAI prosa je viši, što označava da ima veći sadržaj esencijalnih aminokiselina (37). Žitarice su općenito siromašne esencijalnom aminokiselinom lizinom. Udio lizina u prosu može varirati od 1,4 do 4,3 %, što je više nego u pšenici. Druga aminokiselina koja može biti limitirajuća je treonin, a proso ima adekvatne količine ostalih esencijalnih aminokiselina (35).

Obično proso sadrži u prosjeku 69,8 % ugljikohidrata, koji se sastoje od škroba, topljivih šećera, pentozana, celuloze i hemiceluloze. Najveći udio ugljikohidrata predstavlja škrob (52,1 - 68,2 %) sa sadržajem amiloze od 17,21 % do 32,6 %. Sam po sebi, škrob u prosu pokazuje dobru probavljivost (50 %), no prisutnost fenolnih kiselina, inhibitora α -amilaze te nezasićenih masnih kiselina smanjuje njegovu probavljivost (35, 38). Stoga cjelovito proso pokazuje hipoglikemijska svojstva i može se preporučiti osobama s dijabetesom tipa 2 i inzulinskom rezistencijom (38). Škrobna zrnca prosa pokazuju dobro svojstvo želatinizacije i mogu se primjenjivati u svrhu dobivanja gela u prehrambenoj industriji (39). Prehrambena vlakna čine 8,9 - 12,5 % sastava prosa (37). Detaljan sastav vlakana prosa opisan je u poglavlju 2.3.2.

Udio lipida u običnom prosu iznosi od 3,5 do 6,7 %. Od ostalih žitarica, jedino zob ima viši udio lipida (35). Napolarni lipidi čine 80 - 83 % ukupnih lipida u prosu, dok glikolipidi i fosfolipidi mogu varirati od 6 - 14 %, odnosno 5 - 14 % (40). U usporedbi s prstastim i talijanskim prosom, obično proso sadržava više glikolipida (40). Čak 86 - 89 % lipida čine nezasićene mono- i polinezasićene masne kiseline, koje imaju pozitivan učinak na kardiovaskularni sustav (41). Prevladavajuće masne kiseline prosa su linolna, linoleinska, oleinska te palmitinska. Nezasićene masne kiseline podložne su oksidaciji, koja rezultira nejestivim prehrambenim proizvodom te zbog toga se oljušteno proso ne bi smjelo skladištiti dulje od 3 mjeseca pri sobnoj temperaturi (35).

Obično proso sadržava 1,5 - 4,2 % mineralnih tvari. Ima visok sadržaj kalija, željeza te mangana. Prisutan je i visok sadržaj fosfora, no on je manje raspoloživ zbog prisutnih fitata. Proso je dobar izvor cinka i bakra. Obično proso bogato je određenim vitaminima B skupine (tiamin, riboflavin,

niacin te piridoksin) te vitaminom E. Vitamini i mineralne tvari se uglavnom nalaze u vanjskom dijelu zrna, odnosno u posijama, stoga ljuštenje i procesiranje zrna znači smanjenje količine mikronutrijenata (35). Udio određenih vitamina i mineralnih tvari u običnom prosu prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Sadržaj određenih vitamina i mineralnih tvari u običnom prosu (mg na 100 g prosa) (27)

| Željezo | Cink | Kalcij | Magnezij | Kalij | Natrij | Fosfor | Tiamin | Riboflavin | Niacin |
|----------------|-------------|---------------|-----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|
| 9,4 | 2,1 | 19 | 130 | 345 | 35 | 245 | 0,52 | 0,25 | 3,2 |

U prosu se nalaze i antinutrijenti, kao što su fitati i oksalati. Prisutni su i fenolni spojevi te vlakna, koji imaju određene pozitivne učinke, no smanjuju dostupnost nutritivnih tvari, pa ih se može svrstati i u antinutrijente. Navedene tvari nalaze se u vanjskim dijelovima zrna. Fitinska kiselina veže mineralne tvari i time smanjuje njihovu bioraspoloživost. Udio fitata u prosu iznosi 1140 mg na 100 g prosa (27). Oksalna kiselina ometa metabolizam kalcija i smanjuje njegovu apsorpciju. Oksalati u prosu nalaze se u topljivom obliku, pa se njihov udio može smanjiti kuhanjem. Sadržaj oksalata u prosu iznosi 23 mg na 100 g prosa, što je značajno manje nego u pšenici ili raži (27, 37). Fenolni spojevi tvore komplekse s proteinima, čime se smanjuje topljivost i probavljivost proteina (39). Određeni flavonoidi (katehin, epikatehin, naringenin, kampferol, luteolin, daizdein) i fenolne kiseline (galna, protokatehinska, kafeinska) pokazuju svojstvo inhibicije enzima (42). Obično proso bogato je fenolnim kiselinama, no sadržava nisku razinu flavonoida i njegova sposobnost inhibicije enzima dosta se razlikuje ovisno o podvrstama prosa (27, 35). Uspoređujući proso i sirak, proso iskazuje manju inhibiciju α -glukozidaze i α -amilaze (42). U usporedbi s prstastim i talijanskim prosom, obično proso ima veću inhibicijsku aktivnost tripsina (35).

2.3.2. Prehrambena vlakna prosa

Prema AACC-u (2001), prehrambena vlakna su jestivi dio biljke ili analogni ugljikohidrati koji se ne probavljaju u tankom crijevu, a mogu biti potpuno ili djelomično fermentirani u debelom crijevu. U skupinu prehrambenih vlakana ubrajaju se polisaharidi, oligosaharidi, lignin i slične biljne komponente. Vlakna iskazuju pozitivne fiziološke učinke, kao što su olakšavanje pražnjenja crijeva, i/ili smanjenje razine kolesterola u krvi, i/ili smanjenje razine glukoze u krvi (43). Vlakna

se mogu podijeliti u dvije skupine: topljiva (SDF) i netopljiva (IDF). Topljiva vlakna su oligosaharidi, pektini, β -glukan te galaktomanani, dok su netopljiva celuloza, hemiceluloza i lignin. Topljiva vlakna smanjuju razinu kolesterola i glukoze u krvi, a netopljiva vlakna povećavaju volumen stolice i potiču peristaltiku crijeva (44).

U prosu, kao i u ostalim žitaricama, udio vlakana smanjuje se od vanjskih slojeva prema unutrašnjem endospermu. Udio vlakana u običnom prosu varira od 8,9 do 12,5 % (34). Sastavni dijelovi vlakana u prosu su hemiceluloza, lignin i celuloza, što upućuje na to da u prosu prevladavaju netopljiva vlakna (45). Udio topljivih i netopljivih vlakana u brašnu i zrnu običnog prosa prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Prehrambena vlakna u zrnu i brašnu običnoga prosa (g na 100 g prosa) (45)

| Sirovina | Ukupna vlakna | Netopljiva vlakna | Topljiva vlakna |
|-----------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
| Proso – brašno | 9,52 | 7,91 | 1,62 |
| Proso – zrno | 11,71 | 9,73 | 1,99 |

Glavna komponenta hemiceluloze u prosu su arabinoksilani. Mogu biti međusobno kovalentno povezani ili mogu biti povezani s drugim molekulama stanične stijenke. Time se osigurava čvrstoća stanične stijenke koja znači i netopljivost. Strukturu arabinoksilana čini linearni lanac jedinica ksiloze međusobno povezanih β -1,4-glikozidnim vezama na koji su vezane α -L-arabinofuranozil jedinice i, rjeđe, uronska kiselina (46). Hidroksicimetne kiseline, najčešće ferulinska i kumarinska, također su vezane za glavni lanac (47). Proso smanjuje rizik od dijabetesa tipa 2 te raka debelog crijeva, a njegov učinak može se pripisati upravo prehrambenim vlaknima i na njih vezanima fenolnim kiselinama (48).

Sastav vlakana u posijama prosa prikazan je u radu Donga i suradnika (48). Vlakna prosa uglavnom su građena od monosaharidnih jedinica glukoze, ksiloze i arabinoze. Najveći dio ukupnih i netopljivih vlakana čini ksiloza (45 - 79 %), dok u topljivim vlaknima ima više glukoze (35 %) nego ksiloze (31 %) (48).

Od topljivih vlakana, u prosu je zastupljen β -D-glukan. β -D-glukani snižavaju kolesterol u krvi i imaju prebiotičko djelovanje. Njihova količina u prosu (0,5 - 1 %) usporediva je s njihovom količinom u riži (0,1 - 0,9 %) ili u pšenici (0,5 - 1 %) (35).

Udio vlakana u prosu može se usporediti s ječmom i sirkom, koje su poznate kao žitarice bogate vlaknima (49). Proso ima potencijal kao žitarica čije se cjelovito zrno i/ili posije mogu iskoristiti kao prehrambeni izvor vlakana. Uz to, proso je bezglutenska žitarica, pa se može koristiti za obogaćivanje bezglutenskih proizvoda, koji su često siromašni vlaknima. Vlakna prosa imaju povoljan utjecaj na zdravlje te je dokazano da snižavaju razinu triglicerida i kolesterola u krvi (45).

2.3.3. Fenolne kiseline u prosu

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka. Pripadaju skupini neflavonoidnih polifenola, a dijele se na stilbene, lignane i fenolne kiseline. Fenolne kiseline mogu biti hidroksicimetne ili hidroksibenzojeve kiseline, a zajedničko obilježje im je struktura benzenskog prstena. Hidroksibenzojeve kiseline derivati su benzojeve kiseline i u njihovu skupinu ubrajamo galnu, *p*-hidroksibenzojevu, vanilinsku, siriginsku, protokatehinsku i druge. Hidroksicimetne kiseline imaju C6-C3 strukturu i to su: kumarinska, kafeinska, ferulinska, klorogenska, cinaminska i sinapinska kiselina (50). Osim po strukturi, fenolni spojevi mogu se podijeliti po topljivosti, odnosno vezanosti uz druge spojeve. Tako mogu biti slobodni, topljivi konjugirani spojevi i netopljivi vezani spojevi. Netopljivi spojevi vezani su esterskom vezom uz staničnu stijenk (odnosno uz arabinoksilane) i za njihovo oslobađanje potrebno je primijeniti kiselinsku ili bazičnu hidrolizu (51). Fenolni spojevi u biljkama imaju zaštitnu i fiziološku ulogu. Štite biljku od UV zračenja, insekata i drugih životinja te od tretmana kemikalijama. Sudjeluju u brojnim fiziološkim procesima rasta i zrenja biljaka te uvelike pridonose boji, okusu i mirisu biljke (50). Osim toga, fenolne kiseline imaju antioksidativno djelovanje. Mogu donirati atome vodika, a da pritom ne postanu nestabilne zato što benzenski prsten prelazi u fenoksil-radikal, koji ima stabilnu rezonanciju. Fenolne kiseline mogu djelovati kao reducirajuće tvari, hvatači elementarnog kisika te kelatori metala. Svim navedenim djelovanjima štite stanicu od štetnog djelovanja slobodnih radikala (50, 52).

Najveći udio fenolnih spojeva nalazi se u aleuronskom sloju, perikarpu i omotaču (51, 53). Sadržaj fenolnih spojeva najviši je u omotaču, zatim u posijama, a najmanji u poliranom zrnu, kojeg čini endosperm (54).

Proso, uz sirak, je žitarica koja ima najviše različitih vrsta fenolnih kiselina (55). U prosu prevladavaju ferulinska, *p*-kumarinska te druge hidroksicimetne kiseline (56). Slobodne fenolne

kiseline u prosu čine do 35 % ukupnih fenolnih kiselina, dok je udio vezanih fenolnih kiselina do 67 % (57). U topivoj frakciji zastupljene su kafeinska, sinapinska, klorogenska te siriginska. *p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska nalaze se u vezanom obliku (54, 57). Zanimljivo je da hidroksicimetne kiseline vezane s arabinoksilanima pokazuju jače antioksidativno djelovanje nego slobodne fenolne kiselina prosa (58).

Ferulinska i *p*-kumarinska kiselina su najzastupljenije fenolne kiseline u žitaricama općenito te se uglavnom nalaze u vezanom obliku. Obično proso ima najveće količine *p*-kumarinske kiseline u vezanom obliku u odnosu na druge vrste prosa (52).

Fenolne kiseline u vezanom obliku imaju važnu ulogu u organizmu i stoga ih se ne smije zanemarivati kod procjene antioksidativnog učinka određene žitarice. Ferulinska kiselina se izlučuje u obliku glukuronida i sulfata, što ukazuje na apsorpciju i metabolizam (52). Gastrointestinalna esteraza djeluje na esterificirani oblik *p*-kumarinske kiseline. Navedena esteraza djeluje u crijevnoj sluznici i u mikrobioti, što znači da *p*-kumarinska kiselina može djelovati antioksidativno izravno u tankom i u debelom crijevu (59). Pojedini autori predlažu da ferulinska i *p*-kumarinska kiseline djeluju individualno, ali mogu djelovati i sinergistički, pa zbog toga frakcija vezanih fenolnih spojeva u prosu može imati veće antioksidativno djelovanje od slobodnih fenolnih kiselina (52).

Konzumacija cjelovitih žitarica ima protektivni učinak na različite vrste raka, a u radu Zhanga i suradnika proso je pokazalo antiproliferativnu aktivnost na stanice raka jetre i stanice raka dojke, što je pripisano velikom sadržaju fenolnih spojeva u prosu (57).

2.4. POSIJE

Posije (mekinje) su nusproizvodi koji nastaju prilikom mljevenja zrna žitarica, a čine ih perikarp, omotač zrna, aleuronski sloj, klica i manji dio endosperma. Ovisno o vrsti žitarice, posije mogu sačinjavati 3 - 30 % ukupne mase zrna (60).

Iako se sastav posija međusobno razlikuje ovisno o žitarici, općenito je prihvaćena energetska vrijednost posija od 2 kcal g⁻¹ (61). Kemijski sastav posija ovisi o vrsti žitarice, načinu prerade zrna te o mljevenju i konačnoj veličini čestice. Kemijski sastav posija prosa prikazan je u tablici 5 (60). Posije imaju poželjan sastav proteina te predstavljaju izvor esencijalnih aminokiselina (60).

Sadržavaju manje škrobnih ugljikohidrata od ostatka zrna te su bogate vlaknima. Različiti prehrambeni proizvodi mogu se obogatiti posijama, upravo u svrhu povećanja udjela vlakana. Također, sve je veći broj proizvoda koji sadržava cjelovite žitarice, što znači da su posije još prisutne u zrnu. Adekvatan unos vlakana povezuje se s prevencijom raka debelog crijeva te kardiovaskularnih bolesti (62). Prevladavajuće masne kiseline u posijama su palmitinska, oleinska, linolna te linolenska. Određene vrste posija, primjerice posije prosa, mogu se koristiti za proizvodnju visokokvalitetnog ulja, jer sadržavaju linolensku i linolnu kiselinu te tokoferole (63). Posije su bogate vitaminima, mineralima te antioksidacijskim spojevima. Sadržavaju visoku razinu vitamina B i E te kalcija (60). Posije predstavljaju dio zrna koji je najbogatiji antioksidacijskim spojevima (64). Bogate su fenolima (ferulinska, *p*-kumarinska i kafeinska kiselina), tokolima te antocijanima. Posije mogu biti različitih boja, a što je boja tamnija, to su posije bogatije antocijanima koji im daju ljubičastu boju. Zbog širokog spektra različitih antioksidansa i njihove visoke koncentracije, posije štite od pojave raka. Njihovo konzumiranje preporučuje se osobama s povišenom tjelesnom masom i osobama s metaboličkim sindromom. Sinergističko djelovanje vlakana i fenolnih spojeva utječe na oslobađanje inzulina i apsorpciju glukoze (65).

Tablica 5. Kemijski sastav posija prosa (%) (60)

| Ugljikohidrati | Proteini | Pepeo | Masti |
|----------------|----------|-------|-------|
| 56 | 11,5 | 10,5 | 8 |

Ovisno o veličini čestica, posije mogu iskazati pozitivan učinak na fizikalna i tehnološka svojstva tijesta i različitih pekarskih proizvoda. Posije imaju utjecaj na reološka svojstva, sposobnost zadržavanja vode, teksturu, volumen i senzorska svojstva proizvoda (62). Prednost dodavanja posija određenom proizvodu upravo je mogućnost kontrole veličine čestica i odabiranje odgovarajuće veličine kako bi proizvod imao najbolje moguće karakteristike. Posije se dodaju i u bezglutenske proizvode. Zbog navedenih svojstava, one mogu poboljšati fizikalne karakteristike koje nisu zadovoljavajuće zbog nedostatka glutenske mreže. Primjenom posija može se izbjeći dodatak aditiva (66).

Iako posije imaju visoku nutritivnu vrijednost, njihova uporaba u prehrambenoj industriji susreće se s određenim problemima. Posije se sastoje od vanjskih dijelova zrna, što znači da su izravno izložene pesticidima, metalima, bakterijama i plijesnima. Sadrže više mikroorganizama i njihovih

metabolita od endosperma zrna. Kako bi se postigla adekvatna mikrobiološka sigurnost posija, preporuča se fermentacija (60, 67). Posije su bogate nezasićenim masnim kiselinama, koje ih čine podložnima kvarenju. Ukoliko se ne skladište na ispravan način, njihova stabilnost i rok trajanja nisu dugotrajni. Zbog toga, moraju se podvrgnuti određenim postupcima, kao što su zagrijavanje (suho, vlažno ili mikrovalno), ekstruzija ili primjena kemikalija, a preporuča se njihovo čuvanje u polietilenskim vrećicama na prilagođenoj temperaturi i atmosferi. Time je moguće osigurati produljenu stabilnost, no pronalazak idealne metode i načina skladištenja zahtjeva vrijeme i ulaganje (68). Spomenuto je da posije mogu popraviti određene nedostatke pekarskih proizvoda. No, one mogu uzrokovati smanjen volumen i masu proizvoda, tamniju boju, zrnatu teksturu i tvrđi kruh. Zato je važno ustanoviti koje posije najbolje doprinose kvalitetama proizvoda te koliki udio i veličina čestica bi bili primjereni. Fermentacija, primjena enzima te namakanje posija su samo neki od postupaka koji se mogu primijeniti u svrhu dobivanja konačnog obogaćenog proizvoda (60).

2.5. KSILANAZA

Ksilanaza, odnosno endo-(1,4)- β -ksilanhidrolaza, je enzim koji razgrađuje hemicelulozu cijepajući glikozidne veze u osnovnom lancu ksilana. Mjesto djelovanja ksilanaze prikazano je na slici 3, a ovisi o duljini lanca, razgranatosti i prisustvu supstituenata. Optimalni uvjeti za djelovanje ksilanaze su temperatura 40 – 80 °C i pH 4,0 - 6,5. Postoje dvije vrste ksilanaze – ona koja oslobađa arabinozu (*debranching*) i koja ne oslobađa arabinozu (*non-debranching*). Ksilanazu mogu sintetizirati različiti mikroorganizmi, protozoe te kvasci (69).

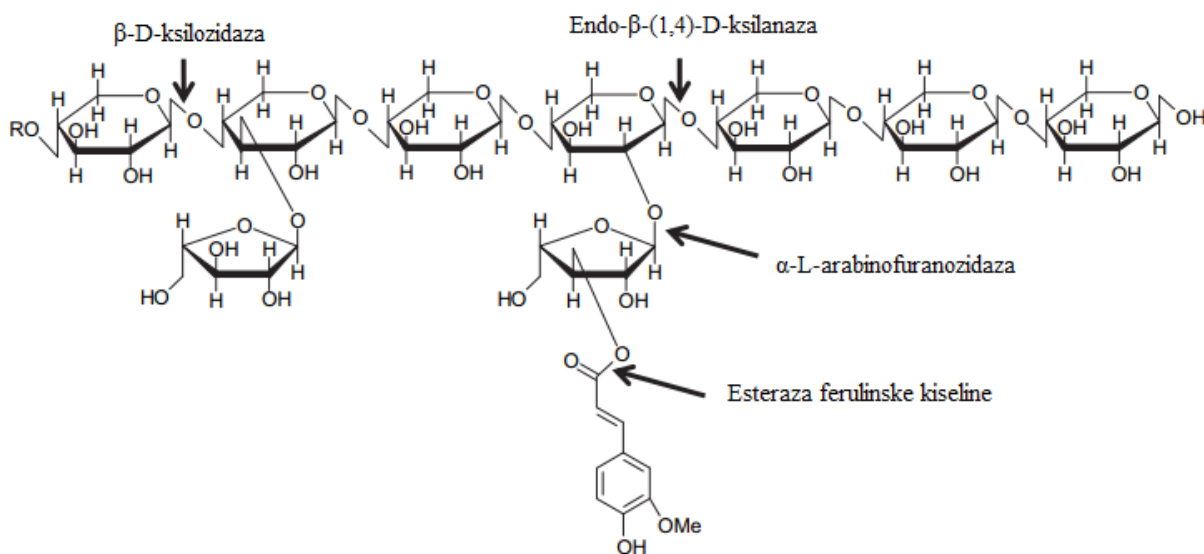
Ksilanaza ima široku upotrebu u prehrambenoj industriji – koristi se za poboljšanje tijesta u pekarstvu, za ekstrakciju kave i škroba te kao aditiv u mesnoj industriji za preradu peradi. Zajedno s celulazom i pektinazom koriste se za degumiranje biljnih izvora vlakana te za bistrenje voćnih sokova. Ksilanaza, pektinaza i celulaza čine 20 % svjetskog tržišta enzima (69).

U pekarskoj industriji ksilanaza se koristi za različite vrste kruha, keksa, krepera te konditorskih proizvoda. Njena primjena rezultira mekšim tijestom koje se lakše mijesi. Tijekom pečenja, takvo tijesto bolje raste, a kruh ima veći volumen, mrvice ujednačene veličine i produljenu svježinu. Kada se kombinira s proteazama i celulazama, poboljšava glutensku mrežu, pa pekarski proizvod ima bolju kvalitetu (69, 70). Primjena ksilanaze u kolače obogaćene posijama usporila je starenje,

tekstura je bila poželjnija, volumen je bio veći i senzorske karakteristike bile su bolje ocijenjene (70, 71). Dodatak ksilanaze u kekse može usporiti širenje tijesta čime se zadržava željeni oblik kekse (72). U radu iz 2013. godine utvrđeno je da primjena ksilanaze i transglutaminaze značajno poboljšava kvalitetu kruha od prosa i pšenice (73).

Kao što je spomenuto u poglavlju 2.4., pekarski proizvodi obogaćuju se posijama zbog njihovog visokog sadržaja vlakana. U posijama prevladavaju netopljiva vlakna, stoga na njih djeluje ksilanaza, pretvarajući ih u topljiva vlakna. Dodatak ksilanaze u proizvode obogaćene posijama ima dvostruku ulogu – poboljšanje karakteristika kvalitete te dobivanje nutritivno bogatijeg proizvoda.

Dodatak ksilanaze u proizvode obogaćene kukuruznim posijama povećava sposobnost vezanja žučnih soli, što smanjuje razinu kolesterola u krvi i time pridonosi kardiovaskularnom zdravlju (74). Također, ksilanaza utječe na posije prosa i njihovu sposobnost vezanja kolesterola. Posije tretirane ksilanazom imale su 2,23 puta veću sposobnost vezanja kolesterola (75). Ksilanaza utječe na oslobađanje fenolnih kiselina vezanih s arabinoksilanima (76). Primjena ksilanaze u proizvode obogaćene posijama poboljšava njihova funkcionalna svojstva.



Slika 3. Prikaz enzima koji cijepaju lanac arabinoksilana (77)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovine

Za pečenje kruha korišteni su sljedeći sastojci: bijelo rižino brašno (Naše klasje d.o.o., Hrvatska), posije prosa sorte Sonček (Mlinopek, Slovenija), vodovodna voda, suhi pekarski kvasac di-go (Kvasac d.o.o., Hrvatska), sitna kuhinjska sol (Paška solana, Hrvatska), šećer (Viro d.o.o., Hrvatska), maslac (Dukat, Hrvatska) te ksilanaza (BIO-CAT, Virginia, SAD).

Korištene posije prosa potječu iz uroda 2018. godine te su dobivene nakon industrijskog procesa ljuštenja i prosijavanja na situ čiji su otvori promjera 0,5 mm, korišten je propad < 0,5 mm („krupne“ posije). Dio posija usitnjen je na ciklomlinu (Ultracentrifugal Mill ZM200, Retsch, Njemačka) pri sobnoj temperaturi te su prosijane na situ otvora 200 µm kako bi se dobile posije „srednje“ veličine. Također, dio posija usitnjen je na kugličnom mlinu uz kriogeno hlađenje (CryoMill, Retsch, Njemačka) kako bi se dobile „sitne“, odnosno ultra-fino samljevene posije. Kriogeno hlađenje je provedeno uz primjenu tekućeg dušika (N₂) koji dostiže temperaturu do -196 °C. Mljevenje je provedeno stavljanjem 8 g posija je u metalnu posudicu za mljevenje zajedno s metalnom kuglicom promjera 25 mm, u trajanju od 8 minuta uz vibracijsku frekvenciju 30 Hz s automatskim prethlađenjem, a za svaki uzorak je ponovljeno 3 puta. Nakon mljevenja, posije su prosijane na situ otvora 50 µm.

Prema deklaraciji proizvođača BIO-CAT, ksilanaza je proizvedena pomoću *Trichoderma longibrachiatum*, aktivnost je iznosila 1000 XU g⁻¹ i prikladna je za bezglutenske proizvode.

3.1.2. Uzorci

U ovom diplomskom radu analizirano je 7 različitih vrsta kruha od rižinog brašna. Međusobno su se razlikovali po veličini dodanih posija prosa te po dodatku ksilanaze. Svaki uzorak kruha pripremljen je u tri ponavljanja. Opis analiziranih vrsta kruha prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Opis uzoraka kruha

| Vrsta brašna | Posije prosa | Dodatak ksilanaze | Oznaka kruha |
|---------------|--------------|-------------------|--------------|
| Rižino brašno | / | / | Kontrolni |
| Rižino brašno | krupne | / | PRPkrupne |
| Rižino brašno | krupne | + | PRPkrupne+X |
| Rižino brašno | srednje | / | PRPsrednje |
| Rižino brašno | srednje | + | PRPsrednje+X |
| Rižino brašno | sitne | / | PRPsitne |
| Rižino brašno | sitne | + | PRPsitne+X |

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica

Kako bi se provjerila veličina čestica, a time i adekvatnost mljevenja, tri navedene frakcije posija analizirane su metodom laserske difrakcije. Za navedenu analizu korišten je uređaj Malvern Instruments Limited (Malvern, Worcestershire, UK) koji ima jedinicu za suhu disperziju Scirocco 2000 i povezan je s računalom s Mastersizer 2000 softwareom v. 5.60. Posije prosa usipaju se u kadicu jedinice za suhu disperziju koja je opremljena sitom za razbijanje aglomerata i ujednačavanje dotoka uzorka u mjernu ćeliju. Zasićenje laserske zrake iznosilo je 2 – 6 % (78). Za svaki uzorak provedena su tri paralelna mjerenja. Brzina snabdijevanja ćelije uzorkom i tlak zraka prilagođavani su tijekom mjerenja kako bi zasićenje laserske bilo konstantno (79). Rezultati su izraženi kao percentili raspodjele veličine čestica:

- $d(0,5)$ predstavlja promjer čestica za koji vrijedi da je 50 % ukupnog broja čestica ima promjer veći od tog promjera i 50 % ukupnog ima promjer manji od tog promjera [μm]
- $d(0,1)$ predstavlja veličinu čestice od koje je manje 10 % čestica cijelog uzorka [μm]
- $d(0,9)$ predstavlja veličinu čestica od koje je manje 90 % čestica cijelog uzorka [μm]

3.2.2. Postupak izrade kruha

Vrste kruhe navedene u tablici 7 pripravljene su po recepturi iz rada Yano i suradnika te je receptura prilagođena za potrebe ovog diplomskog rada (80).

Posijama prosa zamijenjeno je 10 % rižinog brašna, a ksilanaza je dodana u količini od 1 % u odnosu na masu posija (tj. 0,1% u odnosu na masu kruha), što znači da je aktivnost ksilanaze iznosila 400 XU. Postupak pripreme bio je jednak za sve vrste kruha, a svaki kruh pripremljen je 3 puta. Recepture tijesta za izradu kruha nalaze se u tablici 7. Mase su izražene u gramima [g], a postotci su izraženi u odnosu na masu brašna, tj. u odnosu na masu brašna i posija.

Posije prosa (i ksilanaza, ako je bila dodana) prethodno su namočene u vodi u omjeru 1:2,5 u plastičnoj posudici. Zatim je navedena mješavina stavljena u vodenu kupelj (SBS40, Stuart, UK) na 55 °C u trajanju od 16 sati kako bi bila spremna za pripremu kruha sljedeći dan.

Rižino brašno, posije (osim u kontrolnom kruhu) i voda izmiješani su u kuhinjskoj mješalici (EKM4000, Electrolux, Francuska). Nakon 20 minuta miješanja, dodani su šećer, suhi kvasac, maslac i sol te je miješanje nastavljeno još 20 minuta. Dobiveno tijesto podijeljeno je u 3 silikonska kalupa. Odvaga tijesta iznosila je $110 \pm 0,5$ g po komadu. Zatim je provedena fermentacija u fermentacijskoj komori (GS1 ED 60/40 0600_A-BJDBA, Wieshau, Njemačka) pri 37 °C / 85 % relativne vlažnosti u trajanju od 40 minuta. Nakon toga, kruhovi su stavljeni na pečenje u prethodno ugrijanu pećnicu (EB 064-320 IS 600, Wiesheu, Njemačka). Pečenje je trajalo 18 minuta uz napanje od 150 mL. Temperatura gornjeg grijača iznosila je 200 °C, a donjeg 190 °C.

Tablica 7. Recepture tijesta za izradu kruha

| Sirovina [g] | Kontrolni | PRP500 | PRP500+X | PRP150 | PRP150+X | PRP50 | PRP50+X |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| Rižino brašno | 400 (100 %) | 360 (90 %) | 360 (90 %) | 360 (90 %) | 360 (90 %) | 360 (90 %) | 360 (90 %) |
| Kvasac* (1,7 %) | 6,8 | 6,8 | 6,8 | 6,8 | 6,8 | 6,8 | 6,8 |
| Maslac* (1,25 %) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Sol* (1,6 %) | 6,4 | 6,4 | 6,4 | 6,4 | 6,4 | 6,4 | 6,4 |
| Šećer* (5 %) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Voda* | 356 (89 %) | 408 (102 %) | 408 (102 %) | 408 (102 %) | 408 (102 %) | 388 (97 %) | 388 (97 %) |
| Posije prosa* (10 %) | / | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Ksilanaza* (0,1 %) | / | / | 0,4 | / | 0,4 | / | 0,4 |
| Σ | 794,2 | 846,2 | 846,6 | 846,2 | 846,6 | 826,2 | 826,6 |

* na ukupne brašnaste sastojke (rižino brašno, posije prosa)

3.2.3. Određivanje kemijskih i fizikalnih svojstava kruha

Nakon pečenja, uzorci kruha su se hladili 1 sat na sobnoj temperaturi. Izvagani su te im je izmjeren volumen. Zatim su izrezani na kriške debljine 12,5 mm pomoću rezalice (Gorenje, Hrvatska) i određena im je boja i tekstura sredine kruha. Dio je podvrgnut sušenju, a dio određivanju viskoznosti. Nakon sušenja, određen je udio vode, sastav prehrambenih vlakana te ukupni fenolni spojevi. Na HPLC uređaju analizirane su sljedeće fenolne kiseline: 4-hidroksibenzojeva, ferulinska, galna, *p*-kumarinska te vanilinska.

3.2.3.1. *Određivanje udjela vode*

Oprema i uređaji:

- metalne zdjelice s poklopcem
- sušionik (Instrumentaria ST-01/02, Hrvatska)
- eksikator sa silikagelom
- analitička vaga (ALS 220-4N, Kern & Sohn GmbH, Njemačka)
- kuhinjski mlinac (AD443, Adler, Poljska)

Udio vode u uzorcima kruha određen je prema standardnoj metodi AACCC 44-15A koristeći sredinu i koru kruha (81). Prethodno usitnjeni uzorak se izvaže te ostavi da se suši na sobnoj temperaturi 20 sati. Nakon zračnog sušenja, uzorak je samljeven u laboratorijskom mlincu. Za daljnje sušenje, odvagano je 3 g uzorka koji se stavi u metalnu posudicu s poklopcem i unese u sušionik. Vrijeme sušenja je 90 min, a temperatura od 130 °C do 133 °C. Nakon sušenja, posudica se izvadi, poklopi i stavi u eksikator sa silikagelom. Kada se ohladi, izvaže se na analitičkoj vagi (točnost ± 0,001 g).

Udio vode u svakom uzorku određuje se dva puta.

Udio vode računa se prema sljedećoj formuli:

$$Ukupna\ količina\ vode\ (\%) = A + \frac{(100-A)xB}{100} \quad [1]$$

A – postotak vode dobiven zračnim sušenjem

B – postotak vode dobiven sušenjem u sušnici

3.2.3.2. *Određivanje sastava prehrambenih vlakana*

Sastav prehrambenih vlakana određen je prema metodi AOAC 2011.25 (82). Određena su netopljiva vlakna (IDF), vlakna topljiva u vodi i netopljiva u 78 %-tnom etanolu (SDFP) i vlakna topljiva u vodi i u 78 %-tnom etanolu.

Za svaki uzorak određena su prehrambena vlakna u dvije paralele.

Kemikalije:

- Megazyme set za određivanje prehrambenih vlakana (Megazyme, Irska)

- Etanol, 95 %-tni i 78 %-tni (Carlo Erba, Italija)
- Aceton (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- Celit (Megazyme, Irska)
- Natrij-maleatni pufer, 50 mM, pH=6, s 2 mM kalcijevog klorida (CaCl₂)
- Smole za deionizaciju: Amberlite 200H+ i FPA53 (Rohm and Haas, Francuska)

Oprema i uređaji:

- Duran boce s čepom (500 mL i 1L)
- Staklene čaše
- Boca štrcaljka
- Okrugle tikvice s ravnim dnom
- Stakleni filter lončići (Schott, Duran, Danska) (50 mL, veličina pora 40-60 μm)
(Priprema lončića: Lončići se stave u mufolnu peć preko noći na temperaturu od 525 °C. Nakon što se ohlade, uklone se eventualni ostatci celita i pepela pomoću vakuuma. Zatim se namoče u otopini za čišćenje i ostave 1 sat na sobnoj temperaturi. Lončići se isperu prvo običnom vodom, destiliranom vodom i, na kraju, acetonom (15 mL). Nakon što se osuše (na zraku) u lončiće se stavi 1 g celita i suše se do konstantne mase pri temperaturi 130 °C. Lončići se izvade iz sušionika, ohlade u eksikatoru (1 sat) i izvažu.)
- Automatske pipete (50 - 200 μm i 5 ml) (Eppendorf, Njemačka)
- Magneti
- pH metar (3510 Jenway, UK)
- Magnetska miješalica (JK Werke IKA, Njemačka)
- Izvor vakuuma
- Aparatura za filtraciju (odsisne boce s gumenim čepom i lijevkom za filtraciju)
- Sušionik (Instrumentaria ST/01-02, Hrvatska)
- Rotavapor (Hei-VAP Core, Heidolph, Njemačka)
- Polipropilenske posudice
- Kolone za deionizaciju (J.T. Baker, SAD)
- Falcon epruvete
- Šprice od 5 mL
- Syringe filteri veličine pora 0,45 μm (LAB-EX Labortrading LTD., Mađarska)

- Vijale za HPLC (2 mL)
- HPLC uređaj (Shimadzu LC-10AD VP, Shimadzu, Japan)
- Eksikator sa silikagelom
- Vodena kupelj s treslicom (SBS40, Stuart, UK)
- Analitička vaga (ALS 220-4N, Kern & Sohn GmbH, Njemačka)

3.2.3.2.1. Priprema uzoraka

1,000 ± 0,005 g uzorka se odvaži i prenese u Duran bocu s čepom. U bocu se otpipetira 1 mL 95 %-tnog etanola. Doda se 40 mL prethodno pripremljene otopine pankreasne α -amilaze i amiloglukozidaze u Na-maleatnom puferu kako bi se razgradio škrob u uzorku. Boca se stavi na magnetsku miješalicu 5 min kako bi se homogenizirao sadržaj. Zatim slijedi inkubacija u vodenoj kupelji, koja je prethodno temperirana na 37 °C. Inkubacija se provodi 16 sati pri temperaturi 37 °C, a brzini trešnje iznosi 120 o min⁻¹. nakon 16 sati, u bocu se otpipetira 3 mL 0,75 M trizma bazične otopine. Cilj dodavanja navedenog reagensa je zaustavljanje reakcije. U svrhu homogeniziranja sadržaja, boca se stavi na magnetsku miješalicu (2 min) i nakon toga u vodenu kupelj, koja je prethodno temperirana na 90 °C. Inkubacija traje 20 min. Sadržaj u boci se zatim ohladi na 60 °C, doda se 100 μ L proteaze i ponovno se homogenizira na magnetskoj miješalici (2 min). Nakon miješanja, boca se stavi u vodenu kupelj (čija temperatura treba biti 60 °C) na 30 min. Poslije toga, u uzorak se doda 4 mL 2 M octene kiseline i 1 mL internog standarda D-sorbitola. D-sorbitol se dodaje kako bi mogli kvantificirati uzorak na HPLC analizi. Sadržaj se homogenizira stavljanjem boce na magnetsku miješalicu (1 min).

3.2.3.2.2. Određivanje netopljivih vlakana

Lončić s celitom se stavi u prethodno postavljenu aparaturu za filtraciju te se ispere s 15 mL 78 %-tnim etanolom pomoću boce štrcaljke. Izvor vakuuma se uključi i celit treba biti pravilno i ravno raspoređen po površini. Odsisna boca se promijeni te se uzorak profiltrira kroz lončić s celitom. Zaostatci uzorka na stjenkama boce se ispiru i prenesu pomoću deionizirane vode čija temperatura treba biti 60 °C (6 puta po 5 mL). Skupljeni filtrat se podesi na volumen od 85 mL i prebaci u Duran bocu od 500 mL i dalje se koristi za određivanje topljivih vlakana. Lončić s talogom se ispere dvaput sa 78 %-tnim etanolom (15 mL), zatim dvaput s 95 %-tnim etanolom (15 mL) te, na kraju, dvaput s 15 mL acetona. Lončić se prekrije aluminijskom folijom te stavi na

sušenje preko noći na temperaturi od 105 °C. Nakon sušenja, stavi se u eksikator i, kada se ohladi na sobnu temperaturu, izvaže se.

Masa netopljivih vlakana računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$m_1 = m_3 - m_2 \quad [2]$$

m_1 = masa netopljivih vlakana u uzorku (g)

m_2 = masa lončića s celitom (g)

m_3 = masa lončića s celitom i netopljivim vlaknima u uzorku (g)

3.2.3.2.3. Određivanje vlakana topljivih u vodi i netopljivih u 78%-tnom etanolu

Filtrat dobiven u prethodnom postupku (određivanje netopljivih vlakana) se zagrije na 60 °C i u bocu se doda 340 mL 95 %-tnog etanola (koji također treba biti zagrijan na 60 °C). Otopina se zatim taloži 1 sat pri sobnoj temperaturi. Nakon taloženja, otopina se filtrira na isti način kao u prethodnom postupku, samo se sadržaj boce kvantitativno prenese sa 78 %-tnim etanolom (ne s deioniziranom vodom). Lončić s ostatkom se osuši (105 °C, preko noći) i izvaže.

Masa vlakana topljivih u vodi i netopljivih u 78 %-tnom etanolu računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$m_1 = m_3 - m_2 \quad [3]$$

m_1 = masa vlakana topljivih u vodi i netopljivih u 78 %-tnom etanolu

m_2 = masa lončića s celitom (g)

m_3 = masa lončića s celitom i vlaknima topljivih u vodi i netopljivih u 78 %-tnom etanolu (g)

3.2.3.2.4. Određivanje vlakana topljivih u vodi i u 78%-tnom etanolu

Vlakna topljiva u vodi i u 78 %-tnom etanolu određuju se na HPLC uređaju. Kako bi uzorci bili pripremljeni za HPLC analizu, moraju se upariti, deionizirati i filtrirati.

Polovina filtrata se prenese u tikvicu za otparavanje od 500 mL i otpari se na rotavaporu pod vakuumom na 60 °C do suha. Nakon što je filtrat otparen, u tikvicu se otpipetira 5 mL deionizirane vode, tikvica se rotira još 2 min pri sobnoj temperaturi i sadržaj se prenese u polipropilensku posudicu za čuvanje do analize.

Za provedbu deionizacije koristi se mješavina deionizacijskih smola u vodi. 4 g smole Amberlite 200H+ i 4 g smole Amberlite FPA53 se dobro homogenizira u malo deionizirane vode i prelije se u kolonu za deionizaciju. Na vrh kolone stavi se vata i kolona se ispere s 20 mL vode. Zatvori se ventil i nanese se 2 mL uzorka i 2 mL vode. Protok elucije u koloni treba biti 1 mL min⁻¹. Nakon što je eluiran uzorak s vodom, nanese se još 20 mL vode i provede se elucija (protok 1 mL min⁻¹). Dobiveni eluat otpari se na rotavaporu uz vakuum pri 60 °C do suha. Zatim se doda 2 mL deionizirane vode (u svrhu otapanja šećera).

Otopinu je potrebno filtrirati preko filtera čija je veličina pora 0,45 μm kako bi bila adekvatne čistoće za HPLC analizu. Tako pripremljeni uzorak injektira se u HPLC uređaj s detektorom indeksa refrakcije. Volumen injekcije bio je 20 μL. Za analizu je korištena METACARB 67C kolona. Mobilna faza je bila vodena otopina Na₂Ca – EDTA (50 mg L⁻¹). Temperatura kolone bila je 80 °C, protok 0,5 mL min⁻¹, a vrijeme propuštanja uzorka kroz kolonu 30 min.

Kroz HPLC uređaj propuštene su otopine glukoze (koncentracija: 5, 10 i 20 mg mL⁻¹) tri puta, interni standard D-sorbitol tri puta (koncentracija: 0,1 mg mL⁻¹) i standardi za utvrđivanje retencijskih vremena maltoza i maltodekstrin (dva puta). Otopine se propuštaju u svrhu kvantifikacije uzoraka. Određeno je vrijeme razgraničenja između maltoze i oligosaharida te površina svih pikova sa stupnjem polimerizacije većim od točke razgraničenja za standarde. Ukupan zbroj predstavlja vlakna topljiva u vodi i 78 %-tnom etanolu (SDFS).

U svrhu izračunavanja, očitana je površina pikova otopine glukoze i internog standarda s 3 kromatograma. Recipročna vrijednost nagiba pravca (odnosno „faktor odgovora“) se dobiva usporedbom omjera površina za D-glukozu / D-sorbitol u odnosu na omjer masa D-glukoze / D-sorbitola.

Za izračun faktora odgovora koristi se sljedeća jednadžba:

$$Rf = \left(\frac{PA-IS}{PA-Glu} \right) * \left(\frac{Wt-Glu}{Wt-IS} \right) \quad [4]$$

Rf = faktor odgovora

PA-IS = površina pika internog standarda (D-sorbitola)

PA-Glu = površina pika D-glukoze

Wt-Glu = masa D-glukoze u standardu

Wt-IS = masa D-sorbitola u standardu

Masa slijepe probe izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Slijepa proba (B)(mg)} = \frac{BR_1 + BR_2}{2 - PB - PA} \quad [5]$$

BR₁ i BR₂ = masa ostatka dvaju paralelnih određivanja slijepe probe (mg)

PB = masa proteina određena u ostatku slijepe probe (mg)

PA = masa pepela određena u ostatku slijepe probe (mg)

Udio netopljivih vlakana (IDF) i vlakana topljivih u vodi i netopljivih u 78 %-tnom etanolu (SDFP) računaju se prema sljedećim jednadžbama:

$$\text{IDF ili SDFP} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \left(\frac{\frac{R_1 + R_2}{2 - PB - PA - B}}{\frac{m_1 + m_2}{2}} \right) * 100 \quad [6]$$

$$\% \text{ IDF} = \text{IDF} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) / 1000 \quad [7]$$

$$\% \text{ SDFP} = \text{SDFP} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) / 1000 \quad [8]$$

R₁ = masa ostatka uzorka 1 mase m₁ (mg)

R₂ = masa ostatka uzorka 2 mase m₂ (mg)

m₁ = masa uzorka 1 za analizu (g)

m₂ = masa uzorka 2 za analizu (g)

PA = masa pepela u ostatku R₁ (mg)

Vlakna topljiva u vodi i u 78 %-tnom etanolu (SDFS) izračunata su prema formuli:

$$\text{SDFS} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = Rf * (m - IS) * \left(\frac{PA - SDFS}{PA - IS} \right) * \left(\frac{1000}{m} \right) \quad [9]$$

m-IS = masa internog standarda sadržana u 1 mL otopine internog standarda pipetiranog u uzorak (mg)

PA-SDFS = površina pikova za SDFS

M = masa uzorka (m_1 i m_2) čiji je filtrat koncentriran i analiziran na HPLC-u (g)

3.2.3.3. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva

Kemikalije i standardi:

- 3,5-dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina (interni standard, koncentracija $0,9409 \text{ mg ml}^{-1}$) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 80 %-tni etanol (Kefolab, Slovenija)
- Metanol, apsolutni, HPLC grade (J.T. Baker, Fisher Scientific, SAD)

Oprema i uređaji:

- Analitička vaga (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Njemačka)
- Epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka)
- Mikropipeta (1 mL) (Eppendorf, Njemačka)
- Vortex mješalica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Njemačka)
- Mikrocentrifuga (MicroCL 21, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Termoblok (C-MAG HS 7, IKA, Njemačka)
- Komprimirani dušik (Messer Croatia Plin d.o.o., UN 1066, Hrvatska)
- Syringe filteri veličine pora $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (LAB-EX Labortrading LTD., Mađarska)
- Plastične šprice volumena 5mL
- Vijale za HPLC volumena 2 mL

100 mg uzorka izvagano je u Eppendorf epruvete (2 mL) i dodano je $25 \text{ }\mu\text{L}$ internog standarda i 1 mL 80 %-tnog etanola. Uzorci se homogeniziraju na vortex mješalici u horizontalnom položaju 10 minuta. Nakon toga se stavljaju u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Epruvete se zatim stavljaju u mikrocentrifugu 15 minuta na $8000 \text{ okretaja min}^{-1}$. Supernatant se dekantira u nove epruvete pomoću mikropipete (1 mL) te se podvrgava procesu uparavanja u struji dušika (N_2) s grijanjem $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Postupak ekstrakcije se ponavlja još dva puta s dodavanjem 1 mL 80 %-tnog

etanola. Supernatanti se nakon svakog centrifugiranja spajaju i ponavlja se postupak uparavanja s dušikom.

Za daljnje analize, u uparene ekstrakte se dodaje 200 μL metanola HPLC čistoće. Uzorci s dodanim metanolom se stavljaju na vortex mješalicu (30 s) i zatim centrifugiraju ($14000 \text{ okretaja min}^{-1}$, 10 min). Uzorci se filtriraju kroz syringe filtere (promjer pora 0,45 μm) kako bi bili adekvatni za HPLC analizu.

Svaki uzorak ekstrahiran je u 3 paralele.

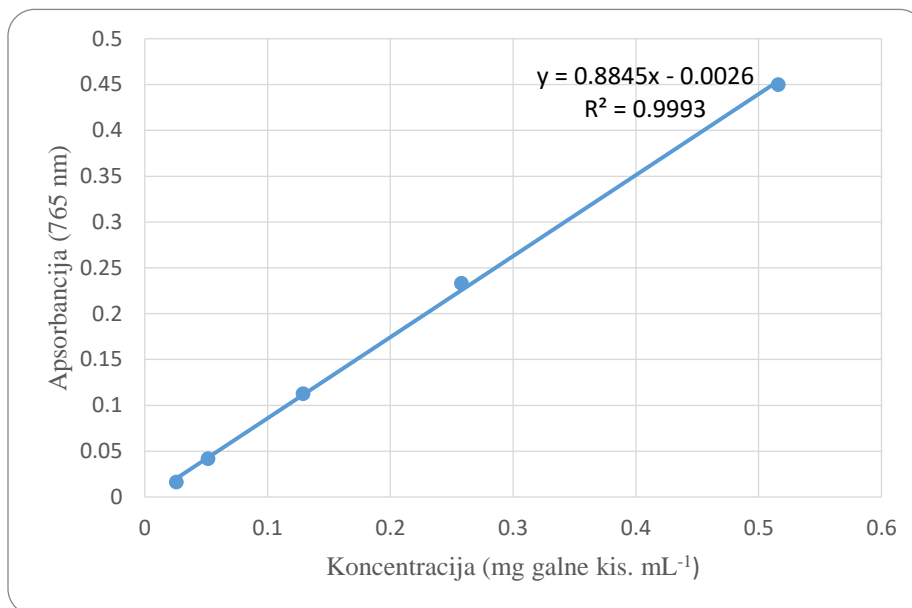
3.2.4.4. *Određivanje ukupnih fenolnih spojeva*

- Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Automatske pipete (10-100 μL , 100-1000 μL , 1-5 mL) (Eppendorf, Njemačka)
- Folin-Ciocalteu reagens (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- 20 %-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3) (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Massachusetts, SAD)
- Metanol, apsolutni, HPLC grade (J.T.Baker, Fisher Scientific, SAD)
- Galna kiselina, 98 %-tna čistoća (Sigma Aldrich, Njemačka)

U kivete se pipetira 20 μL uzorka, 400 μL deionizirane vode te 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute, u kivete se doda 300 μL 20 %-tnog natrijevog karbonata (Na_2CO_3) i 1180 μL deionizirane vode. Kivete se zatvore, promućkaju i ostave 2 sata u mraku pri sobnoj temperaturi. Nakon što je prošlo 2 sata, mjeri se apsorbancija na spektrofotometru. Valna duljina mjerenja iznosila je 765 nm.

U slijepu probu se umjesto uzorka pipetira metanol u istom volumenu kao i uzorak. Za daljnji izračun, apsorbancija slijepe probe oduzima se od apsorbancije uzorka. Dobiveni rezultat se koristi za konačno određivanje ukupnih fenolnih spojeva.

Za konstruiranje baždarne krivulje, korištena je galna kiselina kao standard. Postupak pripreme i analize na spektrofotometru isti je kao priprema za uzorke, a umjesto uzorka se dodaje galna kiselina poznate koncentracije. Uzeto je 5 poznatih koncentracija galne kiseline, a sve su analizirane u 3 paralele. Iz dobivene baždarne krivulje očita se jednadžba i ona se koristi za izračun fenolnih spojeva u uzorcima. Baždarna krivulja s pripadajućom jednadžbom prikazana je na slici 4.



Slika 4. Baždarna krivulja s pripadajućom jednađbom za određivanje ukupnih fenolnih spojeva

3.2.3.5. Određivanje sastava fenolnih kiselina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Kemikalije i standardi:

- 3,5-dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina (interni standard, koncentracija 0,9409 mg mL⁻¹) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Ferulinska kiselina, 99 %-tna čistoća (Fluka, Švicarska)
- Galna kiselina, 98 %-tna čistoća (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Vanilinska kiselina, 97 %-tna čistoća (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 4-hidroksibenzojeva kiselina, 99 %-tna čistoća (Sigma Aldrich, Njemačka)
- *p*-kumarinska kiselina, 99 %-tna čistoća (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Metanol, apsolutni, HPLC grade (J.T.Baker, Fisher Scientific, SAD)

Oprema i uređaji:

- Mikropipete volumena 0-200 μL (Eppendorf, Njemačka)

- Syringe filteri veličine pora 0,45 μm (LAB-EX Labortrading LTD., Mađarska)
- Plastične šprice volumena 5mL
- Vijale za HPLC volumena 2 mL
- HPLC uređaj (1200 Series, Agilent Technologies, SAD)

Fenolne kiseline koje su se određivale tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) su: ferulinska, galna, vanilinska, 4-hidroksibenzojeva te *p*-kumarinska.

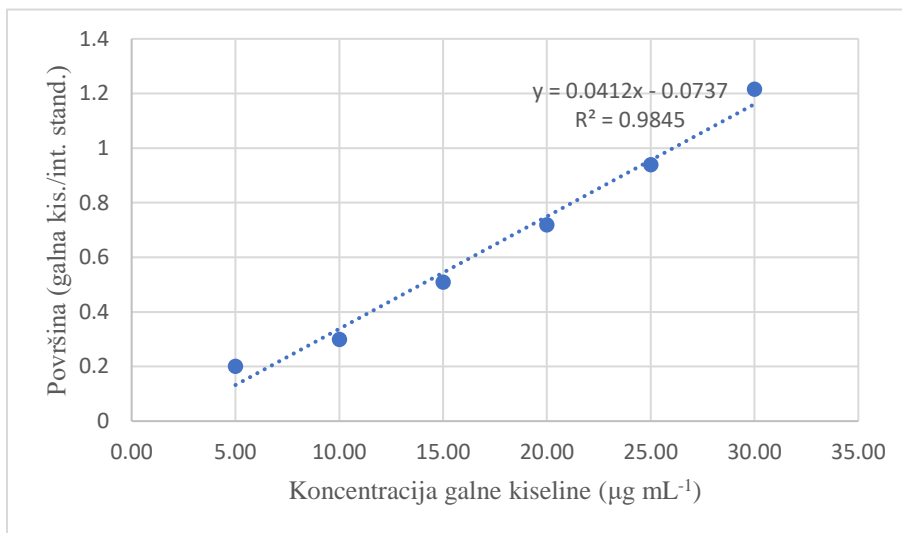
Za analizu udjela fenolnih kiselina u uzorcima upotrijebljene su otopine uzoraka čiji je proces pripreme opisan u poglavlju 3.2.3.3.. Svaki uzorak analiziran je u 3 paralele.

Za konstrukciju baždarnog pravca koristile su se otopine standarda navedenih fenolnih kiselina. U vijalu se otpipetira 125 μL internog standarda, prethodno određeni volumen fenolne kiseline (volumen se određuje prema željenoj koncentraciji s ispravkom za čistoću) te se vijala nadopuni metanolom tako da volumen bude 1 mL. Za konstrukciju baždarnog pravca uzeto je 5 poznatih koncentracija fenolnih kiselina (odnosno 6 za galnu kiselinu). Za izračun se podijele površina pika kiseline i površina pika internog standarda i dalje se računa pomoću jednadžbe pripadajuće baždarne krivulje.

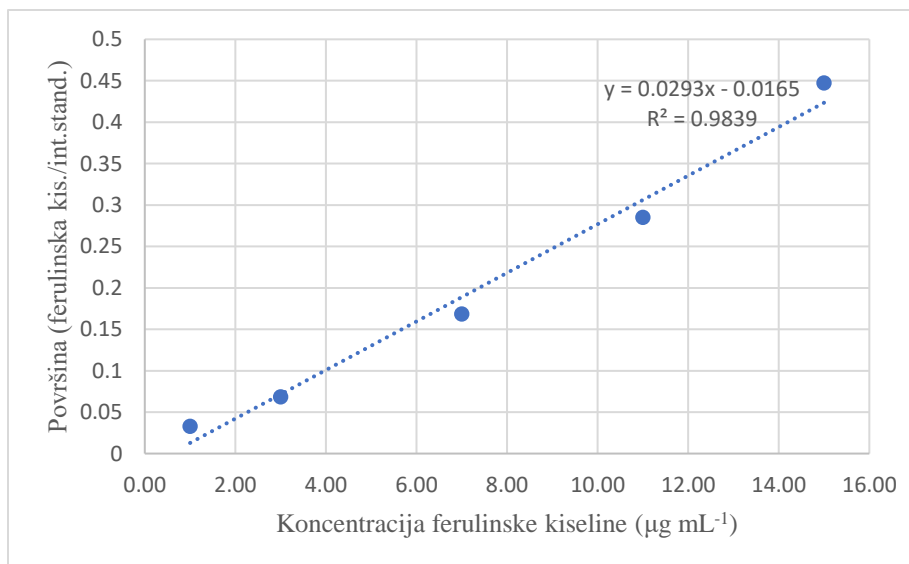
Analiza uzoraka i standardnih otopina provedena je na isti način:

Volumen injektirane otopine iznosio je 15 μL . Korištene mobilne faza bile su 0,1 %-tna mravlja kiselina u metanolu i 0,1 %-tna mravlja kiselina u vodi. Protok je iznosio 0,9 mL min^{-1} . Analiza na HPLC uređaju trajala je 30 min, a pikovi su se gledali na valnoj duljini od 280 nm. Korištena kolona je C18 Phenomenex, promjera 2,6 μm . Program za očitavanje površina pikova i obradu podataka je „Agilent ChemStation for LC and LC/MS Systems“.

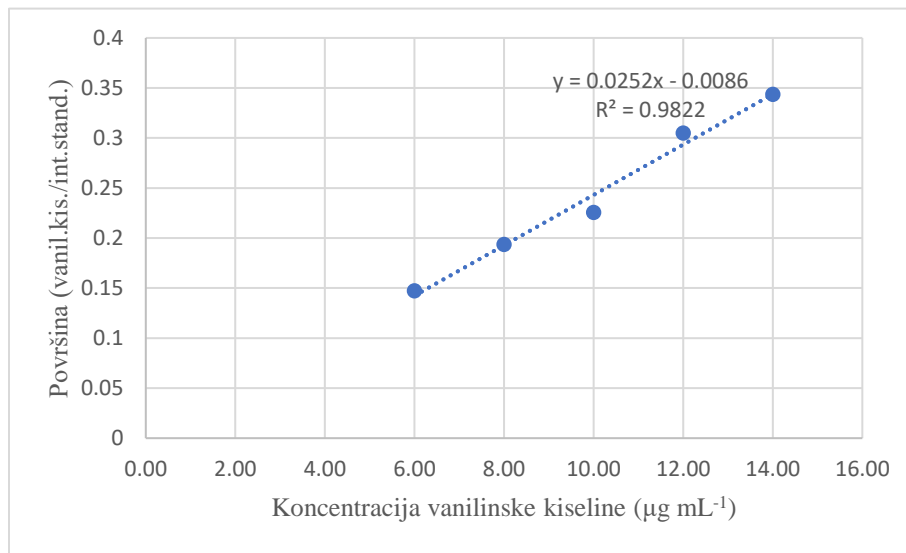
Na slikama 5 - 9 su, po redu, prikazane baždarne krivulje za galnu, ferulinsku, vanilinsku, 4-hidroksibenzojevu te *p*-kumarinsku kiselinu.



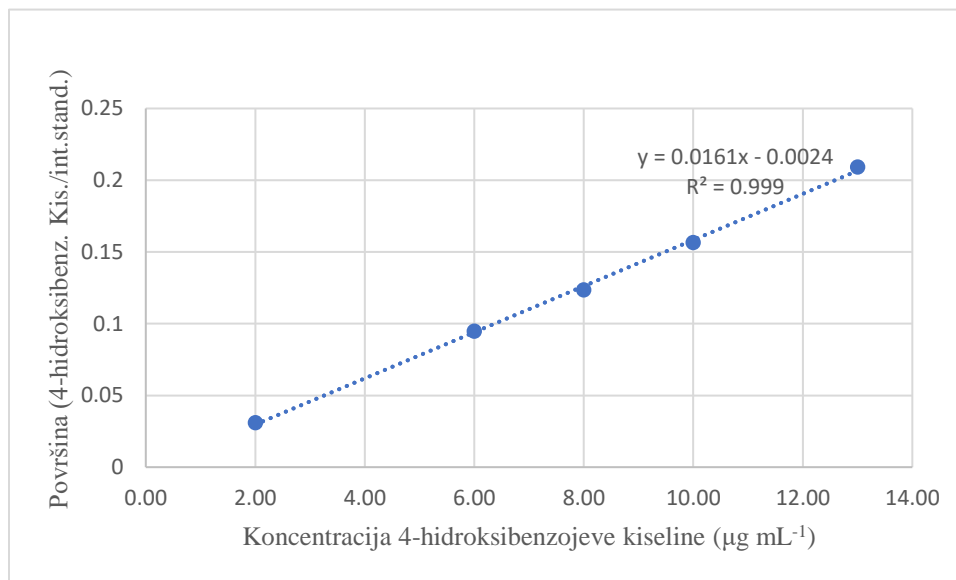
Slika 5. Baždarna krivulja za galnu kiselinu s pripadajućom jednačicom



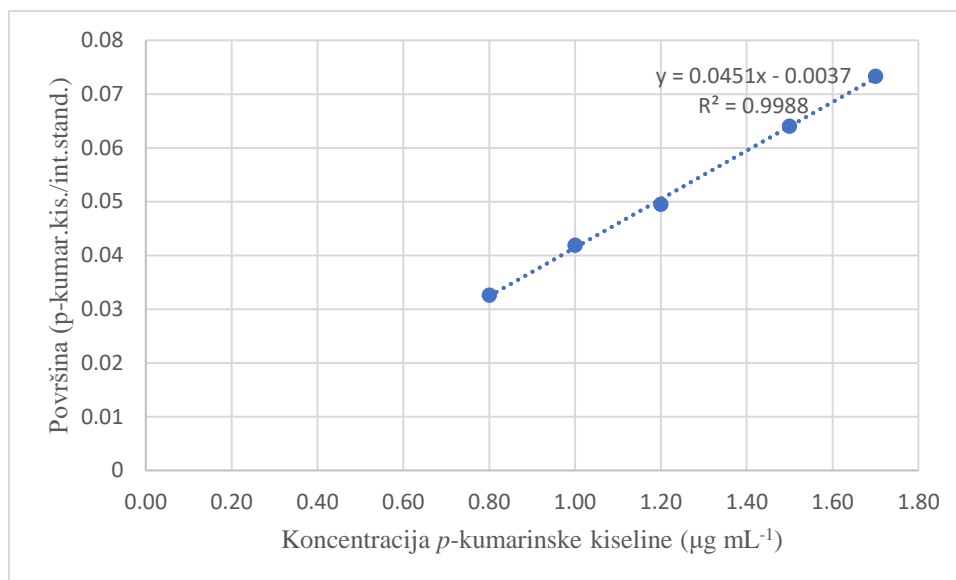
Slika 6. Baždarna krivulja za ferulinsku kiselinu s pripadajućom jednačicom



Slika 7. Baždarna krivulja za vanilinsku kiselinu s pripadajućom jednađbom



Slika 8. Baždarna krivulja za 4-hidroksibenzojevu kiselinu s pripadajućom jednađbom.



Slika 9. Baždarna krivulja za *p*-kumarinsku kiselinu s pripadajućom jednačicom

3.2.3.6. Određivanje volumena i specifičnog volumena

Za svaki uzorak volumen je mjereno u najmanje 3 paralele prema standardnoj metodi (AACC 10-05.01) (83). Za mjerenje je korišteno sjeme uljane repice. Specifični volumen izražen je kao omjer volumena i mase.

3.2.3.7. Određivanje boje sredine kruha

Za određivanje boje sredine kruha korišten je kolorimetar (Spectrophotometer CH-32500 D, Konica Minolta, UK) koji ima ploču promjera 8 mm. Dvije kriške kruha, posložene jedna na drugu, stave se na otvor te se pokrene snimanje pomoću računalnog programa. Uzorak se osvjetljava te se očitava refleksija na računaru.

Međunarodni standard za prostor boja, čiji je utemeljitelj CIE (Commission Internationale de l'Eclairage's), odredio je parametre koji se koriste za određivanje boje hrane. To su: L^* , a^* , b^* , C^* i h^* . Za uzorke analizirane u ovom radu određivali su se parametri L^* , a^* i b^* . Parametar L^* označava aproksimativnu mjeru svjetlosti, tj. svojstvo prema kojem se svaka boja klasificira na skali između crne boje (0) i bijele boje (100). Parametar a^* služi za određivanje vrijednosti crvenih i zelenih tonova (crveni tonovi daju pozitivne vrijednosti, a zeleni tonovi daju negativne

vrijednosti). Parametar b^* označava vrijednosti žutih i plavih tonova (žuti tonovi su tonovi pozitivnih vrijednosti, a plavi su tonovi negativnih vrijednosti) (84).

Određivanje boje sredine kruha ponovljeno je 10 puta za svaki uzorak.

3.2.3.7. Određivanje teksture sredine kruha

Profil teksture sredine kruha određen je na uređaju TA.HD plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK). Korištena je cilindrična sonda promjera 25 mm. Dvije kriške kruha debljine 12,5 mm (kojima je uklonjena korica) stave se jedna na drugu kako bi debljina sredine iznosila 25 mm. Provedena je dvostruka 50 % kompresija brzinom 2 mm s^{-1} , s pauzom od 30 s.

Određivanje teksture sredine kruha provedeno je 6 puta za svaki uzorak.

3.2.3.8. Određivanje viskoznosti suspenzije kruha u vodi

Viskoznost suspenzije kruha u vodi određena je na mikroviskoamilografu (Brabender, Njemačka). 15 g usitnjenog kruha pomiješa se sa 105 mL vode i viskoznost se mjeri pri zagrijavanju i hlađenju uz konstantno miješanje. Viskoznost se određivala prema standardu ICC Standard Method 162: početna temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$, zagrijavanje do $90 - 92 \text{ }^\circ\text{C}$ brzinom $7,5 \text{ }^\circ\text{C m}^{-1}$, održavanje temperature 1 min, broj okretaja 250 m^{-1} , mjerno područje 250 cmg. Rezultati su izraženi u Brabenderovim jedinicama (BU) (85).

Za svaki uzorak provedena su 2 mjerenja, a rezultat je izračunat kao srednja vrijednost.

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišteni su Microsoft Office Excel 2016 i Statistica 10 (StarSoft Inc., Tulsa, SAD). Za izradu grafičkih prikaza rezultata korišten je Microsoft Office Excel 2016. Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Za usporedbu rezultata korištena je analiza varijance (ANOVA) s Tukey post-hoc testom, a granica statističke značajnosti bila je $p \leq 0,05$. Provedena je faktorska analiza varijance u cilju utvrđivanja utjecaja dvaju nezavisnih varijabli (veličina čestica i primjena enzima ksilanaze), kao i njihovih interakcija,

na specifični volumen, parametre boje, teksture i viskoznosti, vlagu, količinu i udjele vlakana, ukupne fenolne spojeve te pojedine analizirane fenolne kiseline.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je povećati nutritivnu vrijednost bezglutenskog rižinog kruha dodatkom posija prosa bez narušavanja fizikalnih svojstava kvalitete. Primijenjene posije prosa razlikovale su se prema veličini čestica i dodatku ksilanaze, stoga je ispitan utjecaj veličine čestica, primjene ksilanaze te njihova interakcija na poboljšanje nutritivnih svojstava i svojstava kvalitete kruha.

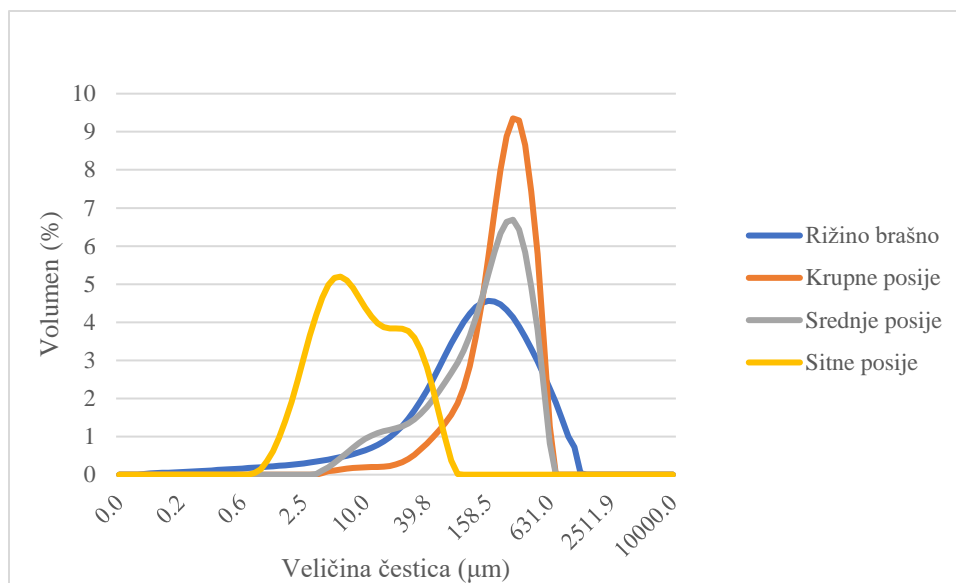
U ovom poglavlju prikazani su rezultati analize posija prosa i rižinog brašna (veličina čestica), kemijski sastav analiziranih vrsta kruha (udio vode, sastav vlakana, ukupni fenolni spojevi te sastav fenolnih kiselina) i fizikalna svojstva (specifični volumen, boja sredine kruha, tekstura sredine kruha te viskoznost).

Pregledom literature ustanovljeno je da se utjecaj posija na nutritivna i fizikalna svojstva uglavnom proučavao na pšeničnom kruhu, no postoje i radovi o utjecaju posija drugih žitarica na bezglutenski kruh. U raspravi ovog diplomskog rada za usporedbu su se koristili podatci dobiveni ispitivanjem različitih vrsta posija, jer utjecaj posija običnoga prosa na bezglutenski kruh do sada nije proučavan.

4.1. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA RIŽINOG BRAŠNA I POSIJA PROSA

Veličina čestica rižinog brašna i posija prosa mljevenih na tri različita načina utvrđene su metodom laserske difrakcije. Kao što je spomenuto u poglavlju 3.1.1. krupne posije dobivene su nakon industrijskog procesa ljuštenja (prosijavanje na situ promjera otvora 500 μm), srednje posije dobivene su mljevenjem na ultra-centrifugalnom ciklomlinu (sa sitom promjera otvora 200 μm), a za dobivanje sitnih posija korišteno je mljevenje na kugličnom mlinu uz primjenu kriohlađenja (uz

prosijavanje na situ promjena otvora 50 μm). Na slici 10 prikazana je raspodjela veličine čestica rižinog brašna i posija prosa.



Slika 10. Raspodjela veličine čestica rižinog brašna i posija prosa

Analiza je pokazala sljedeće rezultate:

- 10 % čestica rižinog brašna manje je od 52,67 μm , 90 % čestica manje je od 375,56 μm , a 50 % čestica manje je (i veće) od 176,62 μm ,
- 10 % čestica krupnih posija manje je od 69,23 μm , 90 % čestica manje je od 422,24 μm , a 50 % čestica manje je (i veće) od 223,40 μm ,
- 10 % čestica srednjih posija manje je od 20,48 μm , 90 % čestica manje je od 381,25 μm , a 50 % čestica manje je (i veće) od 157,03 μm ,
- 10 % čestica sitnih posija manje je 2,41 μm , 90 % čestica manje je od 31,82 μm , a 50 % čestica manje je (i veće) od 7,86 μm .

Veličina čestica brašna iznimno je važna za dobivanje kruha poželjnih tehnoloških i senzorskih karakteristika. Za rižino brašno pokazalo se da veličina čestica od 132 do 200 μm daje kruh zadovoljavajućih svojstava kvalitete (86), a rižino brašno takve veličine čestica korišteno je i u ovome radu. Sličnu raspodjelu veličinu čestica imale su i 'srednje' posije prosa usitnjene na ciklomlinu.

Posije prosa koje su podvrgnute kugličnom mljevenju uz kriohlađenje imale su najmanju veličinu čestica, što je bilo i očekivano. Utjecaj ultra-finog mljevenja (s i bez primjene kriohlađenja) uglavnom je proučavan na pšenici, riži i različitim škrobovima (87, 88). Na pšeničnim posijama dokazano je da se najmanja veličina čestica može dobiti primjenom kriomljevenja. U radu Hemery i suradnika, pokazano je da jedan proces kriomljevenja usitnjava čestice posija jednako kao i tri procesa usitnjavanja pri sobnoj temperaturi (89).

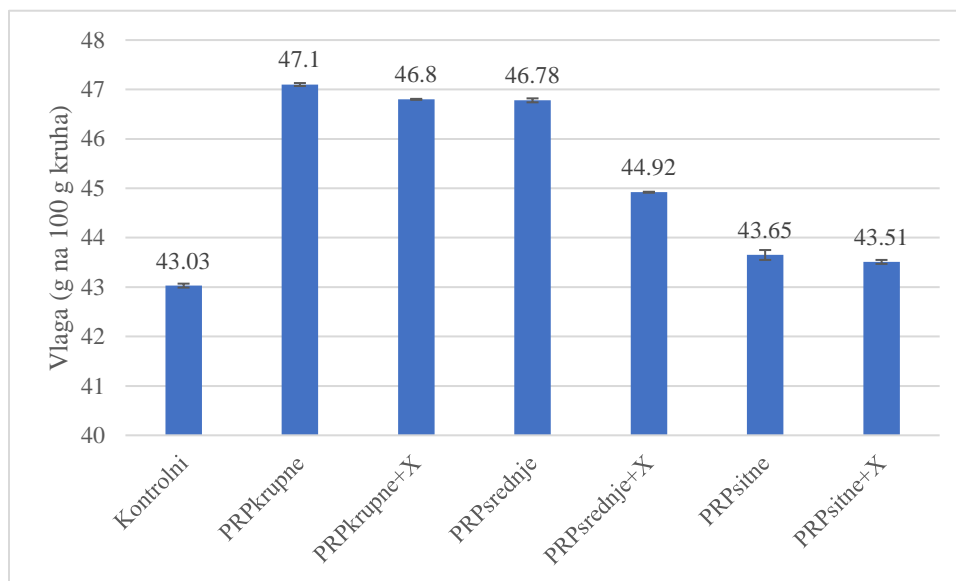
U diplomskom radu iz 2018. godine najmanja veličina čestica posija prosa postignuta je uz primjenu 12-minutnoga programa mljevenja uz kriohlađenje. Za takve čestice posija dobivene su slijedeće vrijednosti: 10 % čestica manje je od 4,59 μm , 90 % čestica manje je od 178,63 μm , a 50 % čestica manje je (i veće) od 16,75 μm (90). Budući da se za potrebe ovog diplomskog rada primjenjivalo kriomljevenje u trajanju od 8 minuta (vrijeme mljevenja odabrano je prema rezultatima navedenog diplomskog rada, u kojem je potvrđeno da se najveći antioksidacijski potencijal posija prosa ostvari primjenom mljevenja u trajanju od 8 minuta), ali 3 puta, za očekivati je da će se dobiti još manja veličina čestica posija prosa.

4.2. NUTRITIVNA SVOJSTVA KVALITETE KRUHA

4.2.1. Udio vode

Na slici 11 prikazani su udjeli vode u kontrolnom uzorku i uzorcima s posijama. Može se primjetiti porast udjela vode u uzorcima s posijama. Najveći udio vode sadržavao je kruh s krupnim posijama (47,1 g na 100 g). Najmanji udio vode sadržavao je kruh sa sitnim posijama i ksilanazom (43,51 g na 100 g), osim kontrolnog uzorka, gdje je udio vode bio 43,03 g na 100 g kruha. Poznato je da posije pokazuju povećano upijanje vode, što je utjecalo i na dodatak vode prilikom izrade kruha – bilo je potrebno dodati više vode u uzorcima s posijama kako bi se dobio kruh zadovoljavajuće strukture (slika 14). Kod zamjesa kruha s krupnim i srednjim posijama bilo je potrebno dodati 13 % više vode u odnosu na kontrolni kruh, a za kruh sa sitnim posijama dodano je 8 % više vode u odnosu na kontrolni kruh. Količine vode u recepturama prikazane su u tablici 7 u poglavlju 3.2.2. Time možemo zaključiti da su sitne posije imale smanjenu sposobnost zadržavanja vode. Isto tako,

uzorci s posijama tretiranima ksilanazom imali su manji udio vode u odnosu na one koje nisu sadržavali ksilanazu, a najveći utjecaj pokazao se na kruhu sa srednjim posijama.



Slika 11. Udjeli vode u kontrolnom uzorku i uzorcima s posijama (g na 100 g kruha)

Poznato je da posije imaju značajnu sposobnost upijanja vode. U radu Rosell i suradnika, posije pšenice i zobi imale su veće vrijednosti zadržavanja vode od drugih komercijalno dostupnih pripravaka vlakana (91). Kao što je objašnjeno u prethodnom dijelu poglavlja, bilo je potrebno dodati više vode u uzorke s posijama da bi se postigla poželjna struktura kruha. U radu Katina i suradnika, iz istog razloga je dodano više vode u kruh koji je sadržavao pšenične posije (76 g na 100 g) u odnosu na kontrolni kruh (69 g na 100 g) (92). Kruh sa sitnim posijama imao najmanju retenciju vode, što je primijećeno i u rezultatima Lapčikove i suradnika (93). U njihovom istraživanju kruh s fino mljevenim pšeničnim posijama pokazao je najnižu sposobnost zadržavanja vode. Primjena ksilanaze, odnosno modifikacija netopljivih vlakana u topljiva smanjuje sposobnost zadržavanja vode u tijestu (94). To se podudara s ovdje dobivenim rezultatima – iz rezultata prikazanih na slici 11 vidljivo je da uzorci čije su posije tretirane ksilanazom imaju manji udio vode od onih čije posije nisu tretirane ksilanazom.

4.2.2. Udio i sastav prehrambenih vlakana

Rezultati određivanja sastava prehrambenih vlakana u kontrolnom uzorku i uzorcima s posijama prikazani su u tablici 8. Rižin kruh siromašan je vlaknima, dok su posije dio zrna koji je bogat vlaknima. Može se primijetiti da je dodatak posija gotovo udvostručio udio vlakana (Σ ITDF) u gotovo svim uzorcima bezglutenskog kruha. Količina vlakana u kontrolnom rižinom kruhu iznosila je 2,42 g na 100 g kruha, a najveću količinu vlakana imao je kruh s dodatkom enzimiški tretiranih srednjih posija (4,75 g na 100 g kruha). U svim vrstama kruha s posijama prosa, najveći dio vlakana čine netopljiva vlakna (IDF) (75 – 82 %), a manji dio čine vlakna topljiva u vodi (SDFP) i vlakna topljiva u vodi i 78 %-tnom etanolu (SDFS). Kruh s krupnim posijama i ksilanazom imao je najveću količinu netopljivih vlakana (3,62 g na 100 g kruha). Najmanju količinu netopljivih vlakana (osim u kontrolnom kruhu) imao je kruh sa sitnim posijama i ksilanazom (3,38 g na 100 g kruha). Najveći udio topljivih vlakana imao je kruh sa srednjim posijama i ksilanazom (1,19 g na 100 g kruha), ne uzimajući u obzir kontrolni kruh (1,32 g na 100 g kruha). Najmanji udio topljivih vlakana imao je kruh sa sitnim posijama i ksilanazom (0,75 g na 100 g kruha). Ksilanaza je imala pozitivan utjecaj na količinu ukupnih vlakana u uzorcima s krupnim i srednjim posijama, ali negativan utjecaj u uzorku sa sitnim posijama. Najizraženiji utjecaj ksilanaze pokazao se na kruhu sa srednjim posijama, gdje je dodatak ksilanaze povećao udjele obje vrste topljivih vlakana te je ukupni udio topljivih vlakana iznosio 25 %.

Tablica 8. Udio netopljivih (IDF) i topljivih (SDFP i SDFS) te ukupna prehrambena vlakna (ITDF) u uzorcima (g vlakana na 100 g kruha) (izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

| Uzorak | IDF | SDFP | SDFS | Σ ITDF |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------|
| Kontrolni | 1,10 ^a \pm 0,01 | 0,36 ^c \pm 0,00 | 0,96 ^e \pm 0,02 | 2,42 |
| PRPkrupne | 3,56 ^{bc} \pm 0,07 | 0,31 ^{bc} \pm 0,07 | 0,50 ^a \pm 0,01 | 4,37 |
| PRPkrupne+X | 3,62 ^c \pm 0,05 | 0,26 ^{bc} \pm 0,02 | 0,55 ^b \pm 0,01 | 4,43 |
| PRPsrednje | 3,42 ^{bc} \pm 0,08 | 0,40 ^c \pm 0,05 | 0,48 ^a \pm 0,00 | 4,30 |
| PRPsrednje+X | 3,56 ^{bc} \pm 0,03 | 0,44 ^{cd} \pm 0,02 | 0,75 ^d \pm 0,01 | 4,75 |
| PRPsitne | 3,54 ^{bc} \pm 0,05 | 0,17 ^{ab} \pm 0,05 | 0,65 ^c \pm 0,00 | 4,36 |
| PRPsitne+X | 3,38 ^b \pm 0,04 | 0,08 ^a \pm 0,01 | 0,67 ^c \pm 0,01 | 4,13 |

^{a,b,c,d}Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$)

Kao što je spomenuto u poglavlju 2.3.2., u posijama prosa prevladavaju netopljiva vlakna, što se vidi i u rezultatima prikazanim u tablici 8. Hemiceluloza uglavnom čini netopljiva vlakna prosa, a glavna komponenta hemiceluloze su arabinoksilani. Stoga se primjenom ksilanaze očekuje porast udjela topljivih vlakana, što je u ovom radu najviše izraženo na posijama srednje veličine. Zhu i suradnici su primjenjivali ksilanazu na posije talijanskog prosa (75). Njihov cilj bio je povećati sposobnost vezanja kolesterola, što je obilježje topljivih vlakana. Njihovi rezultati pokazali su povećanu sposobnost vezanja kolesterola, čime se može zaključiti da se primjenom ksilanaze povećao udio topljivih vlakana posija talijanskog prosa. Autori Lebesi i Tzia proučavali su utjecaj ksilanaze na posije riže i zobi (raspodjela veličine čestica navedenih posija bila je slična posijama srednje veličine u ovom radu) (71). Ksilanaza je smanjila udio netopljivih vlakana, a povećala udio topljivih vlakana u objema vrstama posija. U radu Coda i suradnika, ksilanaza je također povećala udio topljivih vlakana u pšeničnim posijama (77). Može se zaključiti da su rezultati dobiveni u ovom diplomskom radu u skladu s istraživanjima koja su se provodila na posijama prosa te drugih žitarica.

Ksilanaza je pokazala najizraženiji učinak na posije srednje veličine, a vjerojatni razlog slabijeg djelovanja ksilanaze na sitne posije je primjena ultra-finog mljevenja. Mljevenjem se oslobađaju bioaktivne komponente posija, među kojima su inhibitori enzima (60). Inhibitori ksilanaze smanjuju aktivnost primjenjene ksilanaze i stoga je njezin učinak na vlakna sitnih posija manje izražen. Inhibitori ksilanaze imaju zaštitnu ulogu u biljkama (95). Također, najveća koncentracija inhibitora ksilanaze nalazi se u vanjskim dijelovima zrna, u koje se uključuju posije (96). Preciznije, u zrnu žitarica inhibitori ksilanaze vezani su uz neškrobne polisaharide, odnosno vlakna (97). Isto tako, na krupnim posijama zamijećen je manji utjecaj ksilanaze nego na posijama srednje veličine. Krupne posije nisu bile podvrgnute procesu mljevenja i vjerojatno je njihova veća veličina čestica bila ograničavajući faktor djelovanja ksilanaze. Mljevenjem se omogućava, odnosno olakšava djelovanje mikroorganizama i enzima na posije, stoga je učinak ksilanaze na krupne posije bio manji nego kod srednjih posija (93).

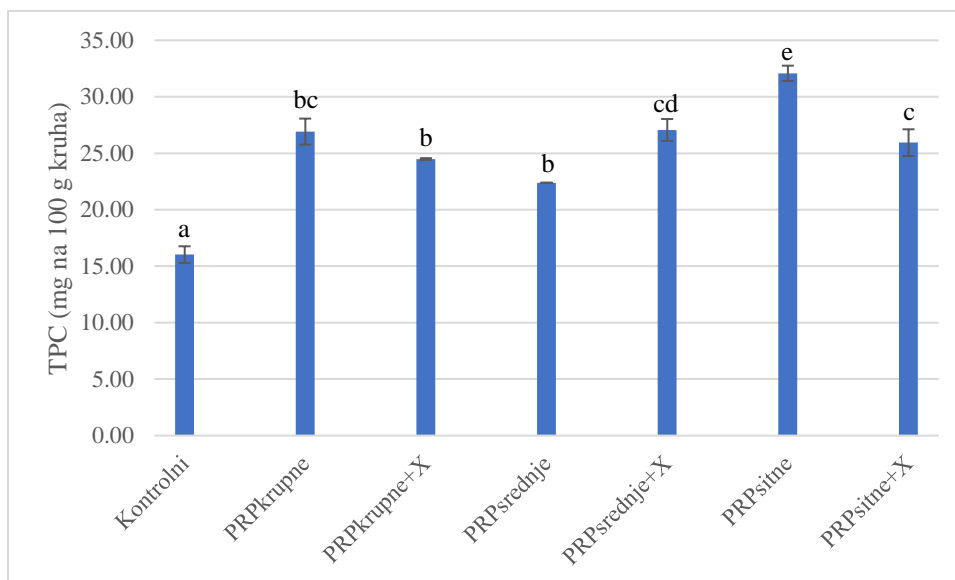
U tablici 8 može se vidjeti da je količina ukupnih vlakana manja u uzorku sa sitnim posijama tretiranim ksilanazom u odnosu na sitne posije bez ksilanaze. Takav rezultat u skladu je s rezultatima rada autora Coda i suradnika (77). Iako se u njihovim uzorcima primjenom ksilanaze smanjila ukupna količina vlakana u posijama veće veličine čestica, smanjenje nije bilo značajno

($p < 0,05$). No, u tretiranim posijama koje su bile manje od 50 μm dogodilo se značajno ($p < 0,05$) smanjenje ukupnih vlakana. U radu Laurikainena i suradnika, primjena ksilanaze također je smanjila količinu ukupnih vlakana, a povećala udio topljivih vlakana (98).

Prema Pravilniku o prehranbenim i zdravstvenim tvrdnjama, hrana koja sadrži najmanje 3 g vlakana na 100 g hrane naziva se izvorom vlakana (99). U tablici 8 može se vidjeti da svaki uzorak kruha s posijama ima više od 3 g vlakana na 100 g kruha, stoga bi svaki analizirani kruh mogli deklarirati kao „izvor vlakana“. Može se zaključiti da bi konzumacija kruha obogaćenog posijama prosa (i ksilanazom) mogla imati pozitivan učinak na zdravlje probavnog i kardiovaskularnog sustava.

4.2.3. Ukupni fenolni spojevi

Na slici 12 prikazane su količine ukupnih fenolnih spojeva (TPC) u kontrolnom uzorku te u uzorcima s posijama (i ksilanazom). U kontrolnom uzorku nalazi se 16,02 mg TPC na 100 g kruha, što je najmanja količina od svih analiziranih uzoraka. Dodatak posija gotovo je udvostručio sadržaj TPC. Najviše TPC analizirano je u uzorku sa sitnim posijama (32,08 mg na 100 g), zatim u uzorku sa srednjim posijama i ksilanazom (27,06 mg na 100 g) i u uzorku s krupnim posijama (26,91 mg na 100 g). Dodatak ksilanaze smanjio je količinu TPC u uzorcima s krupnim i sitnim posijama, dok je povećao ukupne fenolne spojeve u uzorku sa srednjim posijama. Najizraženije smanjenje bilo je u kruhu sa sitnim posijama i ksilanazom (25,94 mg na 100 g), dok je sadržaj TPC u kruhu s tretiranim krupnim posijama iznosio 24,49 mg na 100 g. Kruh sa srednjim posijama bez dodatka ksilanaze sadržavao je 22,39 mg fenolnih spojeva na 100 g.



a, b, c, d, e Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$)

Slika 12. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg na 100 g kruha)

Dodatak posija značajno je povećao količinu slobodnih fenolnih spojeva, što je bilo očekivano. Kao što je navedeno u poglavlju 2.4., posije su dio zrna žitarica koje je bogato fenolnim i drugim antioksidacijskim spojevima. Pradeep i Sreerama proučavali su udjele fenolnih spojeva u talijanskom prosu i malom prosu te se najveći udio nalazio u vanjskim dijelovima zrna prosa (ljuska te posije) (54). Kruh sa sitnim posijama sadržavao je najveći udio TPC, tj. manja veličina čestica posija pokazala je najveći sadržaj ukupnih fenolnih spojeva. U radu Brewer i suradnika došlo se do istih rezultata, kao i u radu Rosa i suradnika (100, 101). U navedenom radu, autori Rosa i suradnici primijenili su kuglično mljevenje s kriogenim hlađenjem na pšenične posije te najmanja veličina posija (čije su čestice bile manje od $50 \mu\text{m}$) pokazale su najveće antioksidacijsko djelovanje.

U uzorcima s ksilanazom, jedino je kruh sa srednjim posijama imao povećani udio TPC. Navedeni kruh također je imao najveći udio topljivih vlakana, što bi značilo da se modifikacijom netopljivih vlakana u topljiva oslobađaju fenolni spojevi. Ista pojava zapažena je u radu Arte i suradnika (102). Dodatak ksilanaze smanjio je količinu ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima s krupnim i sitnim posijama. Stoga bi se trebalo optimizirati djelovanje ksilanaze na posije prosa te uključiti i druge metode (kao što su fermentacija, primjena ultrazvuka, upotreba mješavine enzima umjesto jednog enzima, dodatak esteraze ferulinske kiseline) kako bi se postigao što pozitivniji učinak na strukturu, vlakna te fenolne spojeve proizvoda obogaćenih posijama prosa.

4.2.4. Sastav fenolnih kiselina

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti analizirane su galna, ferulinska, vanilinska, 4-hidroksibenzojeva te *p*-kumarinska kiselina, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 9. U kontrolnom uzorku detektirane su galna i ferulinska kiselina, dok ostale promatrane kiseline nisu detektirane. Dodatkom posija povećala se količina prisutne galne i ferulinske kiseline, a detektirane su i vanilinska, 4-hidroksibenzojeva te *p*-kumarinska. Najveća količina galne kiseline bila je u kruhu sa sitnim posijama (668 µg na 100 g kruha), a najmanja u kruhu sa srednjim posijama (384 µg na 100 g kruha). Najveći udio ferulinske kiseline bio je prisutan u kruhu s krupnim posijama i ksilanazom (1043 µg na 100 g kruha), a najmanji u kruhu s krupnim netretiranim posijama (852 µg na 100 g kruha). Količina ferulinske kiseline u kontrolnom rižinom kruhu iznosila je 296 µg na 100 g kruha. Vanilinska kiselina bila je najzastupljenija u kruhu s krupnim posijama (376 µg na 100 g kruha), a najmanje zastupljena bila je u kruhu sa srednjim posijama i ksilanazom (289 µg na 100 g kruha). Najveća količina 4-hidroksibenzojeve kiseline detektirana je u uzorku s krupnim posijama (550 µg na 100 g kruha), a najmanja u u uzorku sa stnim posijama i ksilanazom (416 µg na 100 g kruha). U kruhu s tretiranim sitnim posijama bilo je najviše *p*-kumarinske kiseline (189 µg na 100 g kruha), a najmanje *p*-kumarinske bilo je u uzorku s krupnim posijama (138 µg na 100 g kruha). Utjecaj dodatka ksilanaze nije bio konstantan i ovisno o veličini posija značajno je utjecao na koncentraciju vanilinske, 4-hidroksibenzojeve i *p*-kumarinske kiseline. S druge strane, primjenom ksilanaze povećan je udio galne kiseline u posijama krupne i srednje veličine, a smanjen u sitnim posijama. Primjenom ksilanaze smanjeni su udjeli vanilinske i 4-hidroksibenzojeve kiseline u svim uzorcima, no smanjenje nije bilo značajno ($p > 0,05$).

Tablica 9. Količine pojedinih fenolnih kiselina izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (μg na 100 g kruha)

| Uzorak | Galna | Ferulinska | Vanilinska | 4-hidroksibenzojeva | <i>p</i> -kumarinska |
|--------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Kontrolni | 399 ^a \pm 5 | 296 ^a \pm 21 | n. d. | n. d. | n. d. |
| PRPkrupne | 411 ^a \pm 3 | 852 ^b \pm 11 | 376 ^b \pm 9 | 550 ^b \pm 17 | 138 ^a \pm 5 |
| PRPkrupne+X | 476 ^b \pm 3 | 1043 ^b \pm 29 | 342 ^{ab} \pm 27 | 536 ^b \pm 4 | 148 ^{ab} \pm 13 |
| PRPsrednje | 384 ^a \pm 22 | 932 ^b \pm 40 | 304 ^a \pm 31 | 467 ^a \pm 23 | 151 ^{ab} \pm 7 |
| PRPsrednje+X | 631 ^{cd} \pm 1 | 942 ^b \pm 101 | 289 ^a \pm 29 | 445 ^a \pm 33 | 156 ^{ab} \pm 17 |
| PRPsitne | 668 ^d \pm 37 | 894 ^b \pm 40 | 330 ^{ab} \pm 11 | 445 ^a \pm 64 | 174 ^b \pm 12 |
| PRPsitne+X | 585 ^c \pm 35 | 929 ^b \pm 79 | 309 ^a \pm 27 | 416 ^a \pm 18 | 189 ^b \pm 16 |

n. d. = nije detektirana

^{a, b, c, d} Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$)

Iz rezultata prikazanih u tablici 9 može se primjetiti da je u najvećem udjelu zastupljena ferulinska kiselina, što je očekivano. Ferulinska kiselina (zajedno s diferulinskom kiselinom) je najzastupljenija fenolna kiselina u posijama prosa te u posijama žitarica općenito (51, 52). *p*-kumarinska kiselina također je zastupljena u prosu, no većinom u vezanom obliku. Štoviše, obično proso ima najveći udio *p*-kumarinske kiseline u vezanom obliku u odnosu na biserno, prstasto, talijansko, i malo proso (52). Budući da se u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada provodila ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva, nije neuobičajeno da je udio *p*-kumarinske kiseline u uzorcima detektiran kao relativno nizak. Dodatkom ksilanaze zabilježeno je statistički značajno povećanje koncentracije slobodne ferulinske kiseline. U žitaricama se ferulinska kiselina nalazi vezana uz ostatke hemiceluloze koja čini staničnu stijenku (51). Budući da se dodatkom ksilanaze povećao udio topljivih vlakana (prikazano u tablici 8 u poglavlju 4.2.2.), za očekivati je da će se povećati udio slobodne ferulinske kiseline, što se može vidjeti i u ovom radu gdje je svaki uzorak čije su posije tretirane ksilanazom imale veći udio ferulinske kiseline naspram uzoraka s netretiranim posijama, neovisno o veličini čestica posija (tablica 9).

Galna, vanilinska i 4-hidroksibenzojeva kiselina derivati su hidroksibenzojeve kiseline, dok su *p*-kumarinska i ferulinska derivati hidroksicimetne kiseline (103). Ksilanaza djeluje na oslobađanje hidroksicimetnih kiselina iz vezanog oblika, što se može vidjeti i prema rezultatima ovog rada

(102). Uzorci s ksilanazom uglavnom su pokazali povećanje udjela ferulinske kiseline i blago povećanje koncentracije *p*-kumarinske naspram uzoraka čije posije nisu bile tretirane ksilanazom, dok ksilanaza nije pokazala izražen učinak na udjele vanilinske i 4-hidroksibenzojeve kiseline. Kako bi se postiglo povećanje udjela slobodnih i hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina, Arte i suradnici preporučaju primjenu esteraze ferulinske kiseline zajedno s ksilanazom (103).

Iako su u prosu fenolne kiseline najvećim dijelom prisutne u vezanom obliku, to ne znači da nemaju značajno antioksidacijsko djelovanje (104). Štoviše, autori Chandrasekara i Shadidi su proučavali antioksidacijski kapacitet prosa i zaključili da vezana frakcija ima višu aktivnost od slobodne (52). Stoga se može zaključiti da bi konzumacija analiziranih vrsta kruha s prosom mogla biti kvalitetan izvor antioksidacijskih spojeva.

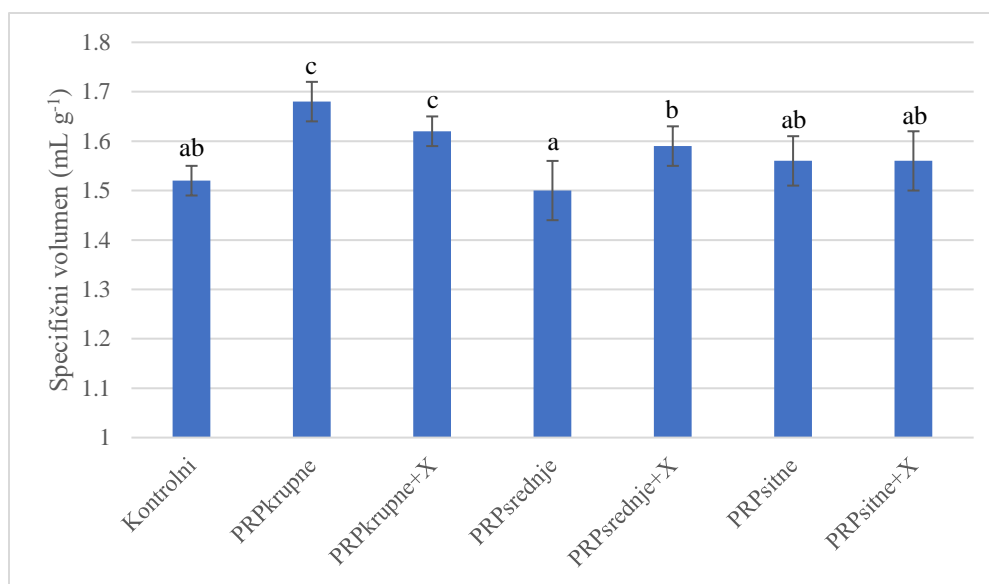
4.3. FIZIKALNA SVOJSTVA KVALITETE KRUHA

4.3.1. Specifični volumen kruha

Dodatak posija najčešće negativno djeluje na volumen kruha, odnosno smanjuje ga. Budući da je volumen prvo svojstvo kojeg kupci primijete, traže se načini kako kruh obogatiti posijama, a da pritom volumen ostane zadovoljavajući (105).

Veličina čestica posija ima utjecaj na volumen kruha, no optimalna veličina još nije ustanovljena. Određeni autori tvrde da posije čije su čestice manje imaju povoljniji utjecaj na volumen (106, 107). No, drugi autori daju prednost krupnijim posijama (108). Razlog oprečnih mišljenja vjerojatno je sama razlika u posijama (vrsta i kemijski sastav te količina dodanih posija), ali i vrsta analiziranog kruha te njegov način pripreme (62).

Na slici 13 mogu se vidjeti vrijednosti specifičnog volumena kontrolnog kruha te ostalih vrsta kruha s posijama. Može se primijetiti da je dodatak posija prosa i ksilanaze uglavnom pozitivno djelovao na volumen kruha. Najveći specifični volumen imao je kruh s dodatkom krupnih posija ($1,68 \text{ mL g}^{-1}$), dok je kombinacija krupnih posija i ksilanaze rezultirala manjim volumenom ($1,62 \text{ mL g}^{-1}$). Obje vrste kruha sa sitnim posijama imale su isti volumen – $1,56 \text{ mL g}^{-1}$. Volumen kruha sa srednjim posijama iznosio je $1,50 \text{ mL g}^{-1}$, a dodatak ksilanaze rezultirao je povećanjem volumena navedenoga kruha ($1,59 \text{ mL g}^{-1}$). Sve vrste kruha imale su veći ili jednak volumen kao i kontrolni rižin kruh ($1,52 \text{ mL g}^{-1}$). Dodatak ksilanaze pozitivno je djelovao na povećanje volumena kruha s posijama srednje veličine.



a, b, c Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$).

Slika 13. Specifični volumen analiziranih vrsta kruha (mL g^{-1})

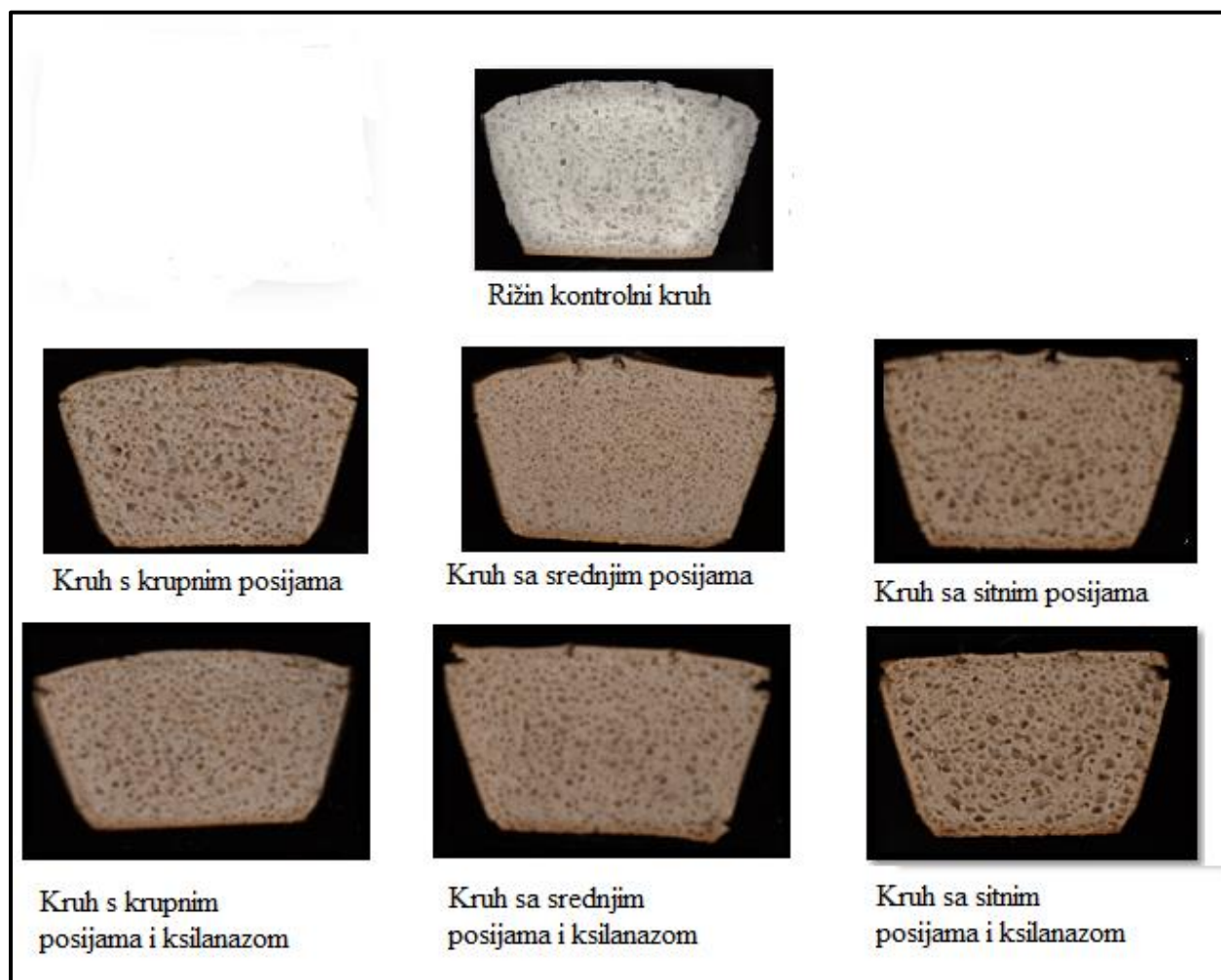
Iako je za očekivati da će volumen kruhova s posijama biti manji od kontrolnog kruha, to se u ovom radu nije dogodilo. Razlog može biti vrsta kruha – dok se u ovom radu analizirao bezglutenski kruh, većina objavljene literature bavi se utjecajem posija na glutensku mrežu. Dokazano je da dodatkom posija, arabinoksilani mogu tvoriti veze s podjedinicama glutena i na taj način onemogućiti razvijanje pravilne glutenske mreže, koja je i zaslužna za povećanje volumena tijekom pečenja. No, dodatkom posija i ksilanaze povećava se udio topljivih vlakana, a navedena vlakna stabiliziraju mjehuriće zraka tijekom fermentacije i tijekom prve faze pečenja, time povećavajući volumen bezglutenskog kruha. To se potvrdilo i u radu Doringa i suradnika, koji su proučavali utjecaj dodatka posija raži i ksilanaze (109). U radu Katine i suradnika, dodatak

suhih pšeničnih posija u kruh rezultirao je manjim volumenom (110). No, namakanje posija uz primjenu mješavine enzima (u kojoj je bila prisutna ksilanaza) povećao je volumen kruha u odnosu na kontrolni, što se podudara s rezultatima ovoga rada. U radu Fostea i suradnika, koji su analizirali utjecaj dodatka posija kvinoje u bezglutenski kruh, rezultati su pokazali da 10 % posija kvinoje pozitivno utječe na volumen kruha povećavajući ga za 7,4 % (111). To se može usporediti s povećanjem volumena kruhova s posijama prosa u ovom radu, gdje je udio dodanih posija također iznosio 10 % i pozitivno je djelovao na volumen kruha. Spomenuto je da je dodatak ksilanaze povećao volumen kruha sa srednjim posijama. Dokazano je da povećani udio proteina i topljivih vlakana povećava volumen kruha (66, 110, 112). To je u skladu s rezultatima koji su prikazani u poglavlju 4.2.2. u tablici 8 u kojoj je vidljivo da upravo kruh sa srednjim posijama i dodatkom ksilanaze ima najveći udio topljivih vlakana. Također, posije prosa imaju relativno visok udio proteina, a posije općenito su dio zrna koji je bogat proteinima (tablica 5, poglavlje 2.4.). Drugi razlog povećanja volumena kruhova s posijama može biti stabilnost emulzije koja je postignuta relativno dugim mješanjem (40 min) tijekom pripreme kruha (poglavlje 3.2.2.). Masti imaju veliki utjecaj na specifični volumen kruha jer stabiliziraju mjehuriće zraka koji su inkorporirani u tijesto prilikom miješanja (113). U tablici 5 (poglavlje 2.4.) opisan je sastav posija prosa i može se vidjeti da posije prosa imaju relativno visok udio masti (8 %) koje mogu pridonijeti stabilnosti mjehurića zraka i, posljedično, povećanom specifičnom volumenu kruha.

4.3.2. Izgled i boja kruha

Presjeci analiziranih vrsta kruha prikazani su na slici 14. Za bezglutenski kruh karakteristična je zbijena struktura, koja je vidljiva i u prikazanim uzorcima. Kruhovi s posijama imali su nešto veću poroznost, osim kruha s dodatkom posija srednje veličine – vjerojatno jer su navedene posije imale veličinu čestica najbližnju rižinom brašnu (157,03 μm , odnosno 176,62 μm) te nisu bile tretirane ksilanazom. Mjehurići kruhova s posijama veći su i ujednačeni, što je također poželjno. Može se primjetiti da je dodatkom sitnih posija površina kruha izgubila zaobljenost gornje površine. Iako presjeci kruhova s posijama imaju veću poroznost i pravilniju strukturu od kontrolnog kruha, oni se još uvijek dosta razlikuju od pšeničnog kruha kakav je privlačan potrošačima. Kruh s dodatkom posija obično ima nižu senzorsku prihvatljivost (105). Kako bi se proizveo kruh s povećanim udjelom vlakana, a prihvatljivih senzorskih svojstava, najčešće se modificira veličina čestica,

dodaju se enzimi (među kojima je i ksilanaza), provodi se fermentacija i drugi bioproceni postupci (105).



Slika 14. Presjek analiziranih vrsta kruha

Analizirana je boja sredine kuha, a rezultati dobiveni na kolorimetru prikazani su u tablici 10. Parametar L^* označava svjetlinu kruha (0 je vrijednost za crnu boju, a 100 za bijelu boju). Njegove vrijednosti prikazane u tablici 10 su niže za vrste kruha s posijama, što znači da je dodatak posija potamnio kruh, a to je vidljivo i na slici 14. Dodatak ksilanaze također je potamnio sredinu kruha. a^* je parametar crvenih (pozitivna vrijednost) i zelenih (negativna vrijednost) tonova. Dodatkom posija boja kruha je postala više crvena, dok je ksilanaza smanjila vrijednost parametra a^* (osim kod kruha sa srednjim posijama). b^* je parametar žutih (pozitivna vrijednost) i plavih (negativna vrijednost) tonova. Dodatak posija povećao je vrijednost b^* u odnosu na kontrolni kruh, što znači

da su bili izraženiji žuti tonovi. Dodatak ksilanaze smanjio je vrijednost parametra b^* , dakle ksilanaza je doprinijela plavim tonovima. Sveukupno, sve analizirane vrste kruha su tamnije, crvenije i više žute od kontrolnog rižinog kruha.

Tablica 10. Parametri boje sredine kruha izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

| Uzorak | L^* | a^* | b^* |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Kontrolni | 79,07 ^a \pm 0,21 | -0,40 ^a \pm 0,04 | 14,78 ^a \pm 0,14 |
| PRPkrupne | 56,11 ^c \pm 0,30 | 5,38 ^b \pm 0,09 | 18,63 ^c \pm 0,25 |
| PRPkrupne+X | 55,23 ^d \pm 0,39 | 5,21 ^b \pm 0,17 | 17,85 ^b \pm 0,33 |
| PRPsrednje | 56,87 ^b \pm 0,33 | 5,28 ^b \pm 0,13 | 19,52 ^d \pm 0,34 |
| PRPsrednje+X | 54,58 ^e \pm 0,44 | 5,39 ^b \pm 0,09 | 19,44 ^d \pm 0,24 |
| PRPsitne | 53,15 ^f \pm 0,50 | 6,14 ^c \pm 0,26 | 22,00 ^f \pm 0,41 |
| PRPsitne+X | 51,23 ^g \pm 0,51 | 5,97 ^c \pm 0,15 | 20,87 ^e \pm 0,21 |

a, b, c, d, e, f, g Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$).

Posije mogu negativno djelovati na boju kruha, čineći ga neprivlačnim za potrošače. U radu Lebesi i Tziae, među ostalim, proučavao se utjecaj ksilanaze na boju (71). U dvije vrste kruha (s rižinim te sa zobnim posijama) dodana je ksilanaza. Primjena ksilanaze pridonijela smanjenju parametara a^* i b^* , što se podudara i s rezultatima ovog rada. No, parametar L^* se povećao (što znači da je boja kruha posvijetlila s primjenom ksilanaze), što je različito od rezultata ovog rada. Razlog tome može biti različitost posija – Lebesi i Tzia proučavali su posije riže i zobi, dok su se ovdje proučavale posije prosa. Zob i riža su žitarice koje su općenito svjetlije boje od prosa. Također, vrijeme primjene ksilanaze bilo je različito: u navedenom radu namakanje posija trajalo je 30 min, dok je za potrebe ovog diplomskog rada namakanje trajalo 16 sati. U radu Phimolsiripola i suradnika, dodatak 10% rižinih posija u rižin kruh rezultirao je tamnijom bojom kruha, što se pokazalo i u ovom diplomskom radu (66). Rižin kruh je izrazito blijede boje, pa se tamnija boja bezglutenskog kruha smatra poželjnom (66).

4.3.3. Tekstura sredine kruha

Prilikom analize teksture sredine kruha promatralo se 5 parametara: tvrdoća, rezlijencija, elastičnost, kohezivnost te žvakljivost. Vrijednosti navedenih parametara za kontrolni kruh i ostale

uzorke navedene su u tablici 11. Najveću tvrdoću imao je kruh sa srednjim posijama (3185 g), a najmanju kruh sa sitnim posijama i dodatkom ksilanaze (2257 g). Tvrdoću najbližnju kontrolnom uzorku (2773 g) imao je kruh s krupnim posijama tretiran ksilanazom (2772 g). Najveću rezilijenciju imao je kontrolni kruh (0,374), a najmanju kruh s krupnim posijama i dodatkom ksilanaze (0,279). Najveću elastičnost pokazao je kruh sa sitnim posijama i ksilanazom (0,998). Najmanju elastičnost imao je kruh sa srednjim posijama i ksilanazom (0,976). Kohezivnost je bila najveća u kontrolnom uzorku (0,618), a najmanju kohezivnost pokazali su uzorci s tretiranim krupnim posijama te sa srednjim posijama. U navedenim uzorcima kohezivnost je imala istu vrijednost (0,540). Najveću žvkljivost imao je kruh sa srednjim posijama (1677 g), koja je bila i najbližnja žvkljivosti kontrolnog kruha (1675 g). Najmanju žvkljivost imao je kruh sa sitnim posijama tretiranim ksilanazom (1339 g). U četiri od pet parametara teksture (sve osim kohezivnosti) ksilanaza je pokazala najveći utjecaj na uzorke s posijama srednje veličine.

Tablica 11. Parametri teksture sredine kruha izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

| Uzorak | Tvrdoća (g) | Rezilijencija | Elastičnost | Kohezivnost | Žvkljivost (g) |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Kontrolni | 2773 ^b \pm 205 | 0,374 ^a \pm 0,007 | 0,977 ^a \pm 0,019 | 0,618 ^a \pm 0,013 | 1675 ^a \pm 159 |
| PRPkrupne | 2706 ^b \pm 57 | 0,300 ^{cd} \pm 0,011 | 0,966 ^a \pm 0,014 | 0,570 ^{bc} \pm 0,017 | 1491 ^b \pm 55 |
| PRPkrupne+X | 2772 ^b \pm 84 | 0,279 ^d \pm 0,007 | 0,968 ^a \pm 0,018 | 0,540 ^c \pm 0,010 | 1450 ^b \pm 73 |
| PRPsrednje | 3185 ^a \pm 91 | 0,283 ^{cd} \pm 0,008 | 0,976 ^a \pm 0,029 | 0,540 ^c \pm 0,014 | 1677 ^a \pm 70 |
| PRPsrednje+X | 2671 ^b \pm 117 | 0,302 ^c \pm 0,006 | 0,965 ^a \pm 0,009 | 0,552 ^c \pm 0,003 | 1423 ^b \pm 62 |
| PRPsitne | 2603 ^b \pm 104 | 0,319 ^b \pm 0,010 | 0,989 ^a \pm 0,013 | 0,574 ^{bc} \pm 0,022 | 1478 ^b \pm 47 |
| PRPsitne+X | 2257 ^c \pm 134 | 0,324 ^b \pm 0,019 | 0,998 ^a \pm 0,012 | 0,594 ^{ab} \pm 0,016 | 1339 ^b \pm 98 |

^{a, b, c} Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$).

Na teksturu sredine kruha, osim posija, utječe veličina čestica rižinog brašna. Najpoželjnija tekstura rižinog bezglutenskog kruha bez aditiva postignuta je s česticama veličine od 132 do 200 μm (86). $d(0,5)$ čestica riže u ovom radu iznosio je 176,62 μm . Iako dodatak posija može povećati tvrdoću kruha, ovdje se to nije dogodilo. Jedini uzorak koji je imao veću tvrdoću od kontrolnog kruha bio je kruh sa dodatkom srednjim posija, dok su svi ostali ostali uzorci imali manju tvrdoću. U radu Curti i suradnika, dodatak pšeničnih posija povećao je tvrdoću pšeničnog kruha, bez obzira na veličinu dodanih posija (114). No, u radu Phimolsiripola i suradnika, dodatak rižinih posija povećao je mekoću sredine rižinoga kruha (66). Takvi rezultati su se dobili i u ovom diplomskom

radu. Iako su u radu Phimolsiripola i suradnika upotrijebljene rižine posije (a u ovom radu posije prosa), kruh koji se radio u oba rada bio je bezglutenski rižin kruh. U radu Fostea i suradnika, utjecaj dodatka 10% posija kvinoje u bezglutenski kruh, rezultirao je smanjenom tvrdoćom kruha (111). U radu Abdul-Hamida i Luana, dodatak vlakana izoliranih iz rižinih posija, smanjio je žvackljivost pšeničnog kruha (115). I u ovom radu dodatak posija prosa smanjio je žvackljivost rižinog kruha. Ksilanaza je uglavnom pozitivno djelovala na teksturu kruha. U radu Katina i suradnika, također se potvrdio pozitivan utjecaj ksilanaze na teksturu kruha s tretiranim pšeničnim posijama u odnosu na kruh koji je sadržavao samo posije (110). Iako su se u navedenome radu koristile pšenične posije, one su namakane 16 sati (što se radilo i s posijama prosa u ovom istraživanju). To je mogući razlog pozitivnog djelovanja posija na tvrdoću – namakanje omogućava apsorpciju vode i time se modificira tekstura samih posija i prije nego što su dodane u tijesto. Drugi razlog poželjnog djelovanja ksilanaze na senzorske karakteristike teksture je mijenjanje sastava vlakana posija, odnosno povećanje udjela topljivih vlakana (116). U radu Banu i suradnika, primjena ksilanaze na zobene posije također je poboljšala teksturu kruha, a kao objašnjenje takvog djelovanja navedeno je povećanje udjela topljivih vlakana (117).

Vidljivo je da posije uvelike utječu na svojstva kvalitete kruha i njihova primjena može dovesti do niže senzorske prihvatljivosti. Boja, izgled i tekstura kruha s posijama (i integralnog kruha) neki su od glavnih razloga slabije potražnje od strane kupaca (105). Prijašnja istraživanja pokazala su da primjena ksilanaze i prilagodba veličine čestica posija mogu poboljšati navedena senzorska svojstva (118). To se može vidjeti i iz rezultata ovog rada.

4.3.4. Viskoznost suspenzije kruha u vodi

Prilikom mjerenja viskoznosti suspenzije kruha u vodi, promatrala su se tri parametra. Maksimalna viskoznost mjera je želatinizacije škroba. Manja želatinizacija škroba znači niži glikemijski indeks kruha, odnosno niži porast razine glukoze u krvi nakon konzumacije kruha. Viskoznost na kraju perioda hlađenja i povratna viskoznost ukazuju na dulju trajnost kruha. U tablici 12 prikazani su rezultati mjerenja viskoznosti uzoraka. Dodatak posija smanjio je vrijednosti sva tri promatrana parametra viskoznosti, što se može povezati i s kapacitetom vezanja vode. Prilikom pravljenja kruha, bilo je potrebno dodati veću količinu vode u kruhove s posijama (13% veća količina vode za krupne i srednje posije te 8% za sitne posije). Vrste kruha s posijama (i bez i sa ksilanazom)

imale su upola manju maksimalnu viskoznost u odnosu na kontrolni rižin kruh. Najmanju maksimalnu viskoznost imao je kruh s dodatkom posija srednje veličine i ksilanazom ($176,5 \pm 2,1$ BU). Viskoznost na kraju perioda hlađenja i povratna viskoznost analiziranih uzoraka također su bili upola manji u odnosu na kontrolni kruh. Kruh s ksilanazom tretiranim posijama srednje veličine imao je najmanju viskoznost na kraju perioda hlađenja ($330 \pm 8,5$ BU) i najmanju povratnu viskoznost (151 ± 6 BU). Najizraženiji utjecaj ksilanaze može se primjetiti na kruhu s posijama srednje veličine.

Tablica 12. Parametri viskoznosti suspenzije kruha u vodi (BU) izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

| Uzorak | Maksimalna viskoznost | Viskoznost na kraju perioda hlađenja | Povratna viskoznost |
|---------------------|------------------------------|---|----------------------------|
| Kontrolni | $433,5^a \pm 7,8$ | $823^a \pm 38$ | $436^a \pm 23$ |
| PRPkrupne | $211,5^b \pm 4,9$ | $429,5^b \pm 7,8$ | $216^b \pm 3$ |
| PRPkrupne+X | $201,0^c \pm 8,5$ | $397^{bc} \pm 19,8$ | $194^b \pm 11$ |
| PRPsrednje | $221,0^b \pm 0,1$ | $445,5^b \pm 2,1$ | $223^b \pm 3$ |
| PRPsrednje+X | $176,5^d \pm 2,1$ | $330^c \pm 8,5$ | $151^c \pm 6$ |
| PRPsitne | $198,0^c \pm 0,1$ | $397^{bc} \pm 1,4$ | $197^b \pm 1$ |
| PRPsitne+X | $200,5^c \pm 3,5$ | $395,5^{bc} \pm 7,8$ | $193^b \pm 5$ |

^{a, b, c, d} Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p \leq 0,05$).

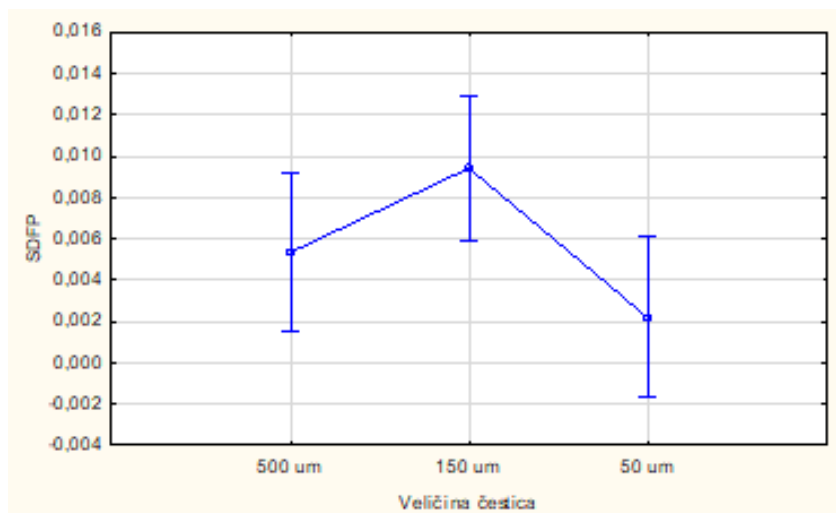
Kao što je spomenuto u poglavlju 2.2., bezglutenski kruh može imati povišeni glikemijski indeks. To rezultira višom razinom glukoze u krvi, što je nepoželjno. Budući da je viskoznost proizvoda povezana s njegovim glikemijskim indeksom, istražuju se različiti načini za optimiranje viskoznosti i smanjenje glikemijskog indeksa (119). Isto tako, svježina i rok trajanja pekarskog proizvoda povezani su s vrijednostima viskoznosti. Primjena enzima transglutaminaze, izolata proteina ili kiselog tijesta pokazali su se kao uspješne metode za sniženje viskoznosti bezglutenskog kruha (120, 121). U ovom radu, primjena posija prosa i ksilanaze također se pokazala kao uspješna metoda za snižavanje parametara viskoznosti. To se podudara i s rezultatima rada Boita i suradnika, gdje je dodatak pšeničnih posija smanjio tri navedena parametra viskoznosti (122). U jednom od ranijih radova, pokazalo se da dodatak hemiceluloze izolirane iz rižinih posija smanjuje viskoznost (sva tri navedena parametra) rižinog brašna (123). Dodatak

posija snizio je vrijednost parametara viskoznosti na kraju perioda hlađenja i povratne viskoznosti, koji se povezuju sa svježinom kruha. Dakle, posije mogu djelovati pozitivno i produljiti svježinu proizvoda, koja je često izazov na tržištu bezglutenskih proizvoda. Najvjerojatniji razlog takvog djelovanja posija je apsorpcija vode prilikom namakanja (koje je za potrebe ovog rada provedeno 16 sati). Posije imaju ulogu „spremnik vode“ koja tijekom se tijekom starenja distribuira među molekulama škroba i proteina te time produljuje svježinu kruha (70, 109, 110).

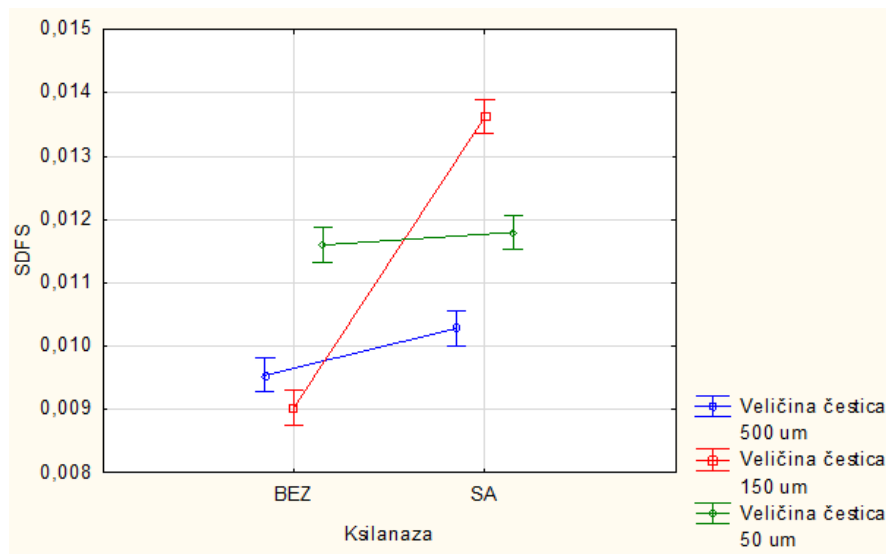
4.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Na slikama 15 i 16 prikazani su određeni značajni utjecaji ($p \leq 0,05$) dobiveni provedenom faktorskom analizom varijance. Na slici 15 prikazan je utjecaj veličine čestica na SDFP frakciju topljivih vlakana, a na slici 16 prikazan je utjecaj ksilanaze na SDFS frakciju topljivih vlakana.

U tablici 13 prikazane su p -vrijednosti faktorske analize varijance utjecaja veličine čestica prosa, dodatka ksilanaze i njihove interakcije na promatrana svojstva kruha.



Slika 15. Utjecaj veličine čestica na SDFP frakciju topljivih vlakana (g g^{-1} suhe tvari kruha)



Slika 16. Utjecaj ksilanaze na SDFS frakciju topljivih vlakana (g g^{-1} suhe tvari)

Iz grafičkog prikaza provedene statističke analize može se vidjeti utjecaj veličine čestica i primjene ksilanaze na udjele frakcija topljivih vlakana. SDFP frakcija je najzastupljenija kod kruha sa srednjim posijama, dok je manje zastupljena u kruhu s krupnim posijama i najmanje u kruhu sa sitnim posijama (slika 15). Veličina čestica imala je značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) na SDFP topljiva vlakna. Ksilanaza je značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) na SDFS vlakna, a najizraženiji utjecaj je pokazala u uzorku sa srednjim posijama, gdje je udio navedene vrste vlakana i bio najveći (slika 16). Također, dodatak ksilanaze je značajno djelovao na koncentraciju ferulinske kiseline.

Općenito, ksilanaza je imala najpoželjniji i najizraženiji utjecaj na kruh koji je sadržavao posije srednje veličine ($157,03 \mu\text{m}$). Navedeni kruh pokazao je najveće povećanje volumena, imao je zadovoljavajuću boju i teksturu te najniže vrijednosti parametara viskoznosti, što ukazuje na dulju trajnost i niži glikemijski indeks. Također, imao je najviši udio topljivih vlakana te je imao povišenu količinu slobodnih fenolnih spojeva. Razlog za pozitivno djelovanje ksilanaze na posije srednje veličine objašnjen je u poglavlju 4.2.2., a takvi rezultati dobiveni su i u drugim istraživanjima (118).

Tablica 13. *p*-vrijednosti faktorske analize varijance utjecaja veličine čestica posija, primjene ksilanaze i njihove interakcije na svojstva kruha

| Svojstvo | Veličina čestica | Ksilanaza | Veličina čestica*Ksilanaza |
|-------------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------------------|
| Specifični volumen | 0,005* | 0,047* | 0,018* |
| L* | 0,000* | 0,000* | 0,000* |
| a* | 0,000* | 0,077 | 0,012* |
| b* | 0,000* | 0,000* | 0,000* |
| Tvrdoća | 0,000* | 0,000* | 0,000* |
| Rezilijencija | 0,000* | 0,806 | 0,002* |
| Elastičnost | 0,004* | 0,940 | 0,460 |
| Kohezivnost | 0,000* | 0,883 | 0,002* |
| Žvackljivost | 0,001* | 0,000* | 0,008* |
| Maks. viskoznost | 0,089 | 0,000* | 0,001* |
| Viskoznost na kraju hlađenja | 0,028* | 0,000* | 0,000* |
| Povratna viskoznost | 0,013* | 0,000* | 0,000* |
| IDF | 0,000* | 0,042* | 0,149 |
| SDFP | 0,000* | 0,131 | 0,319 |
| SDFS | 0,000* | 0,000* | 0,000* |
| TPC | 0,362 | 0,000* | 0,067 |
| Udio vode | 0,000* | 0,000* | 0,000* |
| Galna kiselina | 0,000* | 0,000* | 0,000* |
| Ferulinska kiselina | 0,625 | 0,024* | 0,067 |
| Vanilinska kiselina | 0,002* | 0,063 | 0,785 |
| 4-hidroksibenzojeva kiselina | 0,000* | 0,076 | 0,882 |
| <i>p</i>-kumarinska kiselina | 0,000* | 0,1000 | 0,808 |

Iz tablice 13 možemo vidjeti da su veličina čestica, ksilanaza te njihova interakcija imale značajan utjecaj na promatrana svojstva kvalitete. Veličina čestica imala je značajan utjecaj na 20 od 23

svojstva (nije imala utjecaj na maksimalnu viskoznost, TPC te udio ferulinske kiseline). Primjena ksilanaze imala je značajan utjecaj na 15 od 23 svojstava (nije imala utjecaj na parametar boje a^* , rezilijenciju, elastičnost, kohezivnost, SDFP frakciju vlakana te na udjele vanilinske, 4-hidroksibenzojeve i *p*-kumarinske kiseline). Međudjelovanje veličine čestica i ksilanaze imalo je značajan utjecaj na 15 od 23 promatranih svojstava (nije imalo utjecaj na elastičnost, IDF i SDFP frakcije vlakana, na TPC te na udjele ferulinske, vanilinske, 4-hidroksibenzojeve i *p*-kumarinske kiseline).

Ovom statističkom obradom dobivenih rezultata može se zaključiti da optimiziranje veličine čestica posija prosa te primjena enzima ksilanaze mogu biti adekvatni načini za dobivanje bezglutenskog kruha koji je nutritivno bogatiji i senzorski privlačniji. Krajnji rezultat je kruh kojemu volumen i tekstura nisu bili narušeni te koji je imao poželjna nutritivna svojstva. Udio vlakana se povećao te se može smatrati izvorom vlakana, a povećala se i količina ukupnih fenolnih spojeva i fenolnih kiselina. Kruh s dodatkom posija prosa i ksilanaze može se smatrati obogaćenim bezglutenskim kruhom.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitan je utjecaj dodatka posija prosa različite veličine čestica i primjene enzima ksilanaze na bezglutenski kruh, a cilj je bio dobiti nutritivno obogaćeni kruh poželjnih fizikalnih karakteristika. Na temelju provedenih analiza, dobivenih rezultata i provedene rasprave mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Dodatak posija prosa povećao je udio vode u bezglutenskom kruhu, obzirom da je bilo potrebno dodati više vode u zamjes (8 - 13 %, ovisno o veličini čestica posija) kako bi se postigla zadovoljavajuća struktura kruha. Sitne posije pokazale su smanjenu sposobnost upijanja i zadržavanja vode u odnosu na krupne i srednje posije. Primjena ksilanaze smanjila je sposobnost zadržavanja vode u kruhu.
2. Rižin kruh je siromašan prehranbenim vlaknima (2,44 g na 100 g kruha). Zamjena 10 % rižinog brašna posijama prosa gotovo je udvostručila udio prehranbenih vlakana. Bezglutenski kruh s dodatkom posija (neovisno o veličini čestica i dodatku ksilanaze) može se označiti kao „izvor vlakana“ jer sadržavaju više od 3 g vlakana na 100 g kruha. Udio netopljivih vlakana i SDFP ovisio je veličini čestica posija, dok je SDFS frakcija topljivih vlakana ovisila o interakciji veličine čestica i ksilanaze. Najveći udio ukupnih (4,75 g na 100 g kruha) i topljivih vlakana (25 %) imao je kruh s dodatkom posija srednje veličine i ksilanaze. Ksilanaza je djelovala na smanjenje udjela netopljivih vlakana i na povećanje SDFS frakcije topljivih vlakana.
3. Dodatak posija značajno je povećao količinu ukupnih fenolnih spojeva i pojedinih fenolnih kiselina u bezglutenskom kruhu. U kontrolnom rižinom kruhu detektirane su galna i ferulinska kiselina, dok su u uzorcima s dodanim posijama detektirane i vanilinska, 4-hidroksibenzojeva te *p*-kumarinska. Kruh sa sitnim posijama imao je najveći udio ukupnih fenolnih spojeva (32,08 mg na 100 g kruha). Dodatak ksilanaze smanjio je količinu ukupnih fenolnih spojeva, ali povećao udio ferulinske kiseline u kruhu.
4. Glavna fizikalna svojstva bezglutenskog kruha ovise o veličini čestica posija i dodatku ksilanaze. U odnosu na kontrolni kruh, gotovo svi uzorci s posijama imali su veći specifični volumen. Najveći specifični volumen imao je kruh s dodatkom krupnih posija (10,5 % veći u odnosu na kontrolni kruh). Najbolji profil teksture sredine imao je kruh s dodanim sitnim posijama i ksilanazom. Kruh s posijama prosa ima tamniju, crveniju i više žutu boju sredine

u odnosu na kontrolni kruh. Primjena posija prosa smanjila je viskoznost suspenzije kruha u vodi. Maksimalna viskoznost, viskoznost na kraju perioda hlađenja te povratna viskoznost bili su upola manji u uzorcima s posijama u odnosu na kontrolni kruh.

Konačno, može se zaključiti da je primjena posija prosa poboljšala nutritivna svojstva i bioaktivni potencijal pri čemu nije narušila fizikalne karakteristike bezglutenskog rižinog kruha. Većina nutritivnih i fizikalnih svojstava bezglutenskog kruha ovisi o veličini čestica dodanih posija, kao i njihovoj interakciji s ksilanazom. Primjena ksilanaze imala je najizraženije djelovanje na posije srednje veličine, pri čemu je pozitivno djelovala na povećanje specifičnog volumena kruha te na smanjenje tvrdoće i žvakljivosti sredine, na smanjenje viskoznosti kruha, ali je djelovala negativno na smanjenje rezilijencije i kohezivnosti sredine kruha. Zbog njenog djelovanja na smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva, primjenu ksilanaze potrebno je optimirati daljnjim istraživanjima.

6. LITERATURA

1. FAO, WHO (2008) Codex standard 118-1979 for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. WHO – World Health Organization.
2. Kissing Kucek, L., Veenstra, L. D., Amnuaycheewa, P., Sorrells, M. E. (2015) A Grounded Guide to Gluten: How Modern Genotypes and Processing Impact Wheat Sensitivity. *Compr. Rev. Food. Sci. F.* **14**, 285-302.
3. Sapone A., Bai J.C., Ciacci C., Dolinsek J., Green P., Hadjivassiliou M., Kaukinen K., Rostami K., Sanders D.S., Schumann M., Ullrich R., Villalta D., Volta U., Catassi C., Fasano A. (2012) Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine* **10**, 1-12.
4. Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsa, L., Ferretti, F., Roncoroni, L., Bardella, M. T. (2015) Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J. Gastroenterol.* **21**, 7110-7119.
5. Uredba Komisije (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani.
6. Fasano A. (2012) Novel therapeutic/integrative approaches for celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1-7.
7. Anonymus (2019) <<https://javno-zdravlje.hr/gluten-i-celijakija/>> Pristupljeno 21. Svibnja 2019.
8. Autodore, J., Verma, R., Gupta, K. (2012) Celiac Disease and Its Treatment. *Top. Clin. Nutr.* **27**, 270-276.
9. Vici, G., Belli, L., Biondi, M. and Polzonetti, V. (2016) Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin. nutr.* **35**, 1236-1241.
10. Melini, V., Melini, F. (2019) Gluten-Free Diet: Gaps and Needs for a Healthier Diet. *Nutrients* **11**, 170-191.
11. Anderson, J.W., Baird, P., Davis, R.H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V. and Williams, C.L. (2009) Health benefits of dietary fiber. *Nutr. rev.* **67**, 188-205.

12. Pellegrini, N., Agostoni, C. (2015) Nutritional aspects of gluten-free products. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 2380-2385.
13. Tortora, R., Capone, P., De Stefano, G., Imeratore, N., Gerbino, N., Donetto, S., Monaco, V., Caporaso, N., Rispo, A. (2015) Metabolic syndrome in patients with coeliac disease in a gluten-free diet. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **41**, 352-359.
14. Rybicka, I. (2018) The Handbook of Minerals on a Gluten-Free Diet. *Nutrients* **10**, 1683-1691.
15. Hallert, C., Grant, C., Grehn, S., Grännö, C., Hultén, S., Midhagen, G., Ström, M., Svensson, H. and Valdimarsson, T. (2002) Evidence of poor vitamin status in coeliac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 1333-1339.
16. Theethira, T.G., Dennis, M., Leffler, D.A. (2014) Nutritional consequences of celiac disease and the gluten-free diet. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 123-129.
17. Efthymakis, K., Milano, A., Laterza, F., Serio, M., Neri, M. (2017) Iron deficiency anemia despite effective gluten-free diet in celiac disease: Diagnostic role of small bowel capsule endoscopy. *Dig. Liver Dis.* **49**, 412-416.
18. Scrimgeour, A.G., Condlin, M.L. (2009) Zinc and micronutrient combinations to combat gastrointestinal inflammation. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Meta. Care.* **12**, 653-660.
19. Capriles, V. D., dos Santos, F. G., Areas, J. A. G. (2016) Gluten-free breadmaking: Improving nutritional and bioactive compounds. *J. Cereal Sci.* **67**, 83-91.
20. Houben, A., Hochstotter, A., Becker, T. (2012) Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: an overview. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 195-208.
21. FAO (2017) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Pristupljeno: 4. Srpnja 2019.
22. De Steur, H., Mogendi, J. B., Blancquart, D., Lambert, W., van der Straeten, D., Gellynck, X. (2014) Genetically Modified Rice with health Benefits as a Means to Reduce Micronutrient Malnutrition: Global Status, Consumer Preferences, and Potential Health Impacts of Rice Biofortification. U: Wheat and Rice in Disease Prevention and Health (Watson, R. R., Preedy, V. R., Zibadi, S., ured.), Elsevier, SAD, str. 283-301.

23. Sciarini, L. S., Ribotta, P. D., Leon, A. E., Perez, G. T. (2008) Influence of Gluten-free Flours and their Mixtures on Batter Properties and Bread Quality. *Food Bioprocess. Technol.* **3**, 577-585.
24. Rai, S., Kaur, A., Sings, B., Minhas, K. S. (2012) Quality characteristics of bread produces form wheat, rice and maize flours. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 786-789.
25. Devcich, D. A., Pedersen, I. K., Petrie, K. J. (2007) You eat what you are: Modern health worries and the acceptable natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite* **48**, 333-337.
26. Taylor, J. R. N., Emmambux, M. N. (2008) Gluten-free foods and beverages from millets. U: *Gluten-free cereal products and beverages* (Arendt, E. K., Dal Bello, F., ured.), Elsevier, Cork, str. 119-148.
27. Taylor, J. R. N. (2017) Millets: Their Unique Nutritional and Health-Promoting Attributes. U: *Gluten-Free Ancient Grains:Cereals, Pseudocereals, and Legumes: Sustainable, Nutritious, and Health-promoting Foods for the 21st Century* (Taylor, J. R. N., Awika, J. M., ured.), Woodhead Publishing, Duxford, UK, str. 55-103.
28. Valamoti, S M. (2016) Millet, the late comer: on the tracks of *Panicum miliaceum* in prehistoric Greece. *Archaeol. Anthropol. Sci.* **8**, 51-63.
29. Lu, H., Yang, X., Ye, M., Liu, K.B., Xia, Z., Ren, X., Cai, L., Wu, N., Liu, T.S. (2005) Culinary archaeology: millet noodles in late Neolithic China. *Nature* **437**, 967.
30. FAO (2013) Food and Agriculture organization of the United Nations <<http://www.fao.org/faostat/en/>> Pristupljeno: 24. lipnja 2019.
31. Baltensperger, D., Cai, Y. Z. (2004) Millet/Minor. U: *Encyclopedia of Grain Science* (Corke, H., Wrigley, C. W., ured.), Elsevier, Oxford, str. 261-268.
32. Rose, D. J., Santra, D. (2013) Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) fermentation for fuel ethanol production. *Ind. Crop. Prod.* **43**, 602-605.
33. Saleh, A. S. M., Zhang, Q., Chen, J., Shen, Q. (2013) Millet Grains: Nutritional Quality, Processing, and Potential Health Benefits. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **12**, 281-295.

34. Arendt, E. K., Zannini, E. (2013) Cereal grains for the food and beverage industry. Woodhead Publishing, Cambridge, str. 312-350.
35. Kalinová, J. (2007) Nutritionally Important Components of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.). *Food* **1**, 91 - 100.
36. Osborne, T. B. (1907) The proteins of the wheat kernel, 84, Carnegie Inst, Washington, DC.
37. Kalinova, J., Moudry, J. (2006) Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties. *Plant Food Hum. Nutr.* **61**, 45-49.
38. Annor, G. A., Tyl, C., Marcone, M., Ragaee, S., Marti, A. (2017) Why do millets have slower starch and protein digestibility than other cereals? *Trends Food Sci. Technol.* **66**, 73-83.
39. Devisetti, R., Yadahally, S. N., Bjattacharya, S. (2014) Nutrients and antinutrients in foxtail and proso millet fractions: Evaluation of their flour functionality. *LWT – Food Sci. Technol.* **59**, 889-895.
40. Sridhar, R., Lakshminarayana, G. (1994) Contents of Total Lipids and Lipid Classes and Composition of Fatty Acids in Small Millets: Foxtail (*Setaria italica*), Proso (*Panicum miliaceum*) and Finger (*Eleusine coracana*). *Cereal Chem.* **71**, 355-359.
41. Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., Millington, K. J. (2004) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Dietet.* **17**, 449-459.
42. Kim, J., Hyun, T. K., Kim, M. (2011) The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtail millet and proso millet on α -glucosidase and α -amylase activities. *Food chem.* **124**, 1647-1651.
43. AACC (2001) The Definition of Dietary Fiber. *Cereal Food. World* **46**, 112-126.
44. Tosh, S. M., Yada, S. (2010) Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Res. Int.* **43**, 450-460.

45. Kurek, M. A., Karp, S., Wyrwisz, J., Niu, Y. (2018) Physicochemical properties of dietary fibres extracted from gluten-free sources: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus maudatus*) and millet (*Panicum milliaceum*). *Food hydrocoll.* **85**, 321-330.
46. Izydorczyk, M. S. (2009) Arabinoxylans. U: Handbook of Hydrocolloids (Phillips, G. O., Williams, P. A., ured.) Woodhead Publishing, Cambridge, str. 653-592.
47. Savitha Prashanth, M. R., Muralikrishna, G. (2014) Arabinoxylan from finger millet (*Eleusine coracana*, v. Indaf 15) bran: Purification and characterization. *Carbohydr. Polym.* **99**, 800-807.
48. Dong, J., Wang, L., Lu, J., Zhu, Y., Shen, R. (2019) Structural, antioxidant and adsorption properties of dietary fiber from foxtail millet (*Setaria italica*) bran. *J. Sci. Food Agric.* **99**, 3886-3894.
49. Bagdi, A., Balazs, G., Schmidt, J., Szatmari, J., Schoenlechner, R., Berghofer, E. Tomoskozi, S. (2011) Protein characterization and nutrient composition of Hungarian proso millet varieties and the effect of decortication. *Acta Aliment.* **40**, 128-141.
50. Pedisić, S. (2017) Fitokemikalije u zaštiti zdravlja - polifenoli. Prehrambeno – biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
51. Boz, H. (2015) Ferulic Acid in Cereals - a Review. *Czech J. Food. Sci.* **33**, 1-7.
52. Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2010) Content of Insoluble Bound Phenolics in Millets and Their Contribution to Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6706-6714.
53. Čukelj, N., Novotni, D., Ćurić, D. (2010) Antioxidant Properties of Whole Grain Cereals. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.* **5**, 18-23.
54. Pradeep, P. M., Sreerama, Y. N. (2017) Soluble and bound phenolics of two different millet genera and their milled fractions: Comparative evaluation of antioxidant properties and inhibitory effects on starch hydrolysing enzyme activities. *J. Funct. Foods.* **35**, 682-693.
55. Dykes, L., Rooney, L.W. (2007) Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal food. world* **52**, 105-111.
56. Dykes, L., Rooney, L. W. (2006) Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J. Cereal. Sci.* **44**, 236-251.

57. Zhang, L., Liu, R., Niu, W. (2014) Phytochemical and Antiproliferative Activity of Proso Millet. *PLoS One*. **9**, 1-10.
58. Bijalwan, V., Ali, U., Kesarwani, A. K., Yadav, K. (2016) Hydroxycinnamic acid bound arabinoxylans from millet brans - structural features and antioxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **88**, 296-305.
59. Andreasen, M.F., Kroon, P.A., Williamson, G., Garcia-Conesa, M.T. (2001) Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 304-314.
60. Chinma, C. E., Ramakrishnan, Y., Ilowefah, M., Hanis-Syazwani, M., Muhammad, K. (2015) Properties of Cereal Brans: A review. *Cereal Chem.* **92**, 1-7.
61. Wisker, E., Feldheim, W. (1992) Faecal bulking and energy value of dietary fibre. U: Dietary Fibre: A Component of Food (Schweizer, T. F., Edwards, C. A., ured.), Springer Verlan, London, str. 233-246.
62. Pavlovich-Abril, A., Rouzaud-Sandez, O., Torres, P., Robles-Sanchez, R. M. (2012) Cereal bran and wholegrain as a source of dietary fibre: technological and health aspects. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 882-892.
63. Liang, S., Yang, G., Ma. Y. (2010) Chemical Characteristics and Fatty Acid Profile of Foxtail Millet Bran Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **87**, 63-67.
64. Kundgol, N. G., Kasturiba, B., Math, K. K., Kamatar, M Y., Usha, M. (2013) Impact of Decortication on Chemical Composition, Antioxidant Content and Antioxidant Activity of Little Millet Landraces. *Int. J. Adv. Res. Technol.* **2**, 1705-1720.
65. Patel, S. (2012) Cereal bran: the next super food with significant antioxidant and anticancer potential. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* **5**, 91-104.
66. Phimolsiripol, Y., Mukprasirt, A., Schoenlechner, R. (2012) Quality improvement of rice-based gluten-free bread using different fractions of rice bran. *J. Cereal. Sci.* **56**, 389-395.
67. Katina, K., Juvonen, R., Laitila, A., Flander, L., Nordlund, E., Karilioto, S., Putanen, K. (2012) Fermented wheat bran as a functional ingredient in baking. *Cereal chem.* **89**, 126-134.

68. Sharma, S., Kaur, S., Dar, B. N., Singh, B. (2014) Storage stability and quality assessment of processed cereal brans. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 583-588.
69. Harris, A. D., Ramalingam, C. (2010) Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. *J. Exp. Sci.* **1**, 1-11.
70. Lebesi, D. M., Tzia, C. (2011) Staling of Cereal Bran Enriched Cakes and the Effect of an Endoxylanase Enzyme on the Physicochemical and Sensorial Characteristics. *J. Food Sci.* **76**, S380-S387.
71. Lebesi, D. M., Tzia, C. (2012) Use of endoxylanase treated cereal brans for development of dietary fiber enriched cakes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **13**, 207-214.
72. Uysal, H., Bilgicli, N., Elgun, A., Ibanoglu, S., Nur Herken, E., Kursat Demir, M. (2007) Effect of dietary fibre and xylanase enzyme addition on the selected properties of wire-cut cookies. *J. Food Eng.* **78**, 1074-1078.
73. Schoenlechner, R., Szatmari, M., Bagdi, A., Tomoskozi, S. (2013) Optimisation of bread quality produced from wheat and proso millet (*Panicum miliaceum L.*) by adding emulsifiers, transglutaminase and xylanase. *LWT-Food Sci. Technol.* **51**, 361-366.
74. Hu, Y., Wang, Z., Xu, S. (2007) Treatment of corn bran dietary fiber with xylanase increases its ability to bind bile salts, in vitro. *Food Chem.* **106**, 113-121.
75. Zhu, Y., He, C., Fan, H., Lu, Z., Lu, F., Zhao, H. (2019) Modification of foxtail millet (*Setaria italica*) bran dietary fiber by xylanase-catalyzed hydrolysis improves its cholesterol-binding capacity. *LWT-Food Sci. Technol.* **101**, 463-468.
76. Sancho, A. I., Bartolome, B., Gomez-Cordoves, C., Williamson, Faulds, C. B. (2001) Release of Ferulic Acid from Cereal Residues by Barley Enzymatic Extracts. *J. Cereal Sci.* **34**, 173-179.
77. Coda, R., Rizzello, C. G., Curiel, J. A., Poutaten, K., Katina, K. (2013) Effect of bioprocessing and particle size on the nutritional properties of wheat bran fractions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **25**, 19-27.
78. Benković, M., Srećec, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Bauman, I. (2013) Flow properties of commonly used food powders and their mixtures. *Food Bioprocess. Tech.* **6**, 2525 - 2537.

79. Benković, M. (2013) Fizikalno - kemijska i senzorska svojstva obogaćenih praškastih mješavina na bazi kave, Doktorski rad, Prehrambeno - biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
80. Yano, H., Fukui, A., Kajiwara, K., Kobayashi, I., Yoza, K., Satake, A., Villeneuve, M. (2017) Development of gluten-free rice bread: Pickering stabilization as a possible batter-swelling mechanism. *LWT-Food Sci. Technol.* **79**, 632-639.
81. AACC International Approved Methods (2003) Method 44-15A Determination of moisture content by air-oven method. St. Paul, MN, USA.
82. AOAC International Official Method (2012) Method 2011.25 Insoluble, Soluble and Total Dietary Fiber in Foods Enzymatic – Gravimetric – Liquid Chromatography. Rockville, MN, USA.
83. AACC International Approved Methods (2000) Method 10-05.01 Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement. St. Paul, MN, USA.
84. Granato, D., Masson, M. L. (2010) Instrumental color and sensory acceptance of soy - based emulsions: a response surface approach. *Ciencia Tecnol Alime.* **30**, 1090-1096.
85. ICC Standard Method (1996) Method 162 Rapid Pasting Method Using the Newport Rapid Visco Analyser. Beč, Austrija.
86. De la Hera, E., Rosell, C. M., Gomez, M. (2014) Effect of water content and flour particle size on gluten-free bread quality and digestibility. *Food chem.* **151**, 526-531.
87. Hasjim, J., Li, E., Dhital, S. (2013) Milling of rice grains: Effects of starch/flour structures on gelatinization and pasting properties. *Carbohydr. Polym.* **92**, 682-690.
88. Dhital, S., Shrestha, A. K., Gidley, M. J. (2010) Effects of cryo-milling on starches: Functionality and digestibility. *Food Hydrocoll.* **24**, 152-163.
89. Hemery, Y., Chaurand, M., Holopainen, U., Lampi, A., Lehtinen, P., Piironen, V., Sadoudi, A., Rouau, X. (2011) Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part I: Influence of ultra-fine grinding. *J. Cereal Sci.* **53**, 1-8.
90. Habuš, M. (2018) Utjecaj kriomljevenja na veličinu čestica i bioaktivne spojeve posija prosa, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

91. Rosell, C. M., Santos, E., Collar, C. (2009) Physicochemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach. *Food Res. Int.* **42**, 176-184.
92. Katina, K., Salamenkallio-Marttila, M., Partanen, R., Forssell, P., Autio, K. (2006) Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *LWT Food Sci. Technol.* **39**, 479-491.
93. Lapčikova, B., Burešova, I., Lapčík, L., Dabash, V., Valenta, T. (2019) Impact of particle size on wheat dough and bread characteristics. *Food Chem.* **297**, 124938.
94. Courtin, C. M., Delcour, J. A. (2002) Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-making. *J. Cereal Sci.* **35**, 225-243.
95. Dornez, E., Gebruers, K., Delcour, J., Courtin, C. M. (2009) Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 495-510.
96. Croes, E., Gebruers, K., Luyten, N. Delcour, J. A., Courtin, C. M. (2009) Immunoblot Quantification of Three Classes of Proteinaceous Xylanase Inhibitors in Different Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars and Milling Fractions. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 1029-1035.
97. Fierens, E., Gebruers, K., Courtin, C. M., Delcour, J. A. (2008) Xylanase Inhibitors Bind to Nonstarch Polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 564-570.
98. Lauikainen, T., Harkonen, H., Autio, K., Poutaten, K. (1998) Effects on Enzymes in Fibre-Enriched Baking. *J. Sci. Food Agric.* **76**, 239-249.
99. Pravilnik o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama (2010) *Narodne novine* **84**, Zagreb (NN 84/10).
100. Brewer, L. R., Kubola, J., Siriamornpun, S., Herald, T. J., Shi, Y. (2014) Wheat bran particle size influence on phytochemical extractability and antioxidant properties. *Food Chem.* **152**, 483-490.
101. Rosa, N. N., Barron, C., Gaiani, C., Dufour, C., Micard, V. (2013) Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *J. Cereal Sci.* **57**, 84-90.

102. Arte, E., Rizzello, C. G., Verni, M., Nordlund, E., Katina, K., Coda, R. (2015) Impact of Enzymatic and Microbial Bioprocessing on Protein Modification and Nutritional Properties of Wheat Bran. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8685-8693.
103. Udeh, H. O., Duodu, K. G., Jideani, A. I. O. (2017) Finger Millet Bioactive Compounds, Bioaccessibility, and Potential Health Effects – a Review. *Czech J. Food Sci.* **35**, 7-17.
104. Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2013) Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: A review. *J. Funct. Foods* **5** 570-581.
105. Heinio, R. L., Noort, M. W. J., Katina, K., Alam, S. A., Sozer, N., de Kock, H. L., Hersleth, M., Poutanen, K. (2016) Sensory characteristics of wholegrain and bran-rich cereal foods – a review. *Trends Food Sci. Technol.* **47**, 25-38.
106. Lai, C. S., Davis, A. B., Hosney, R. C. (1989) Production of whole wheat bread with good loaf volume. *Cereal Chem.* **66**, 224-227.
107. Moder, G. J., Finney, K. F., Bruinsma, B. I., Ponte J. G., Bolte, L. C. (1984) Bread-making potential of straight-grade and whole-wheat flours of triumph and eagle-plainsman hard red winter wheats. *Cereal Chem.* **61**, 269-273.
108. Zhang, D., Moore, W. R. (1999) Wheat bran particle size effects on bread baking performance and quality. *J. Sci. Food Agric.* **75**, 805-809.
109. Doring, C., Grossmann, I., Roth, M., Jekle, M., Koehler, P., Becker, T. (2016) Effect of rye bran particles on structure formation properties on rye dough and bread. *J. Food Process. Pres.* **41**, e12998.
110. Katina, K., Salmenkallio-Marttila, M., Partanen, R., Forssell, P., Autio, K. (2006) Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *LWT Food Sci. Technol.* **39**, 479-491.
111. Foste, M., Nordlohne, S. D., Elgeti, D., Linden, M. H., Heinz, V., Jekle, M., Bescker, T. (2014) Impact of quinoa bran on gluten-free dough and bread characteristics. *Eur. Food Res. Technol.* **239**, 767-775.

112. Buksa, K., Ziobro, R., Nowotna, A., Gambus, H. (2013) The influence of native and modified arabinoxylan preparations on baking properties of rye flour. *J. Cereal Sci.* **58**, 23-30.
113. Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A., Delcour, J. A. (2011) Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *J. Cereal Sci.*, **54**, 266-279.
114. Curti, E., Carini, E., Bonacini, G., Tribuzio, G, Vittadini, E. (2013) Effect of the addition of bran fractions on bread properties. *J. Cereal Sci.* **57**, 325-332.
115. Abdul-Hamid, A., Luan, Y. S. (2000) Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chem.* **68**, 15-19.
116. Coda, R., Katina, K., Rizzello, C. G. (2015) Bran bioprocessing for enhanced functional properties. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 50-55.
117. Banu, I., Macelaru, I., Aprodu, I. (2016) Bioprocessing for improving the rheological properties of dough and quality of the wheat bread supplemented with oat bran. *J. Food Process. Pres.* **41**, e13112.
118. Coda, R., Karki, I., Nordlund, E., Heinio, R., Poutaten, K., Katina, K. (2014) Influence of particle size on bioprocess induced changes on technological functionality of wheat bran. *Food Microbiol.* **37**, 69-77.
119. Jenkins, D. J. A., Wolever, T. M. S., Leeds, A. R., Gassull, M. A., Haisman, P., Dilawari, J., Goff, D. V., Metz, G. L., Alberti, K. G. M. M. (1978) Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity. *Br. Med. J.* **1**, 1392-1394.
120. Shin, M., Gang, D., Song, J. (2010) Effects of Protein and Transglutaminase on the Preparation of Gluten-free Rice Bread. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 951-956.
121. Novotni, D., Čukelj, N., Smerdel, B., Bituh, M., Dujmić, F., Čurić, D. (2012) Glycemic index and firming kinetics of partially baked frozen gluten-free bread with sourdough. *J. Cereal Sci.*, **55**, 120-125.
122. Boita, E. R. F., Oro, T., Bressiani, J., Santetti, G. S., Bertolin, T. E., Gutkoski, L. C. (2016) Rheological properties of wheat flour dough and pan bread with wheat bran. *J. Cereal Sci.* **71**, 177-182.

123. Mod, R. R., Normand, F. L., Ory, R. L., Conkerton, E. J. (1981) Effect of Hemicellulose on Viscosity of Rice Flour. *J. Food Sci.* **46**, 571-573.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Lucija Štokalj
Ime i prezime studenta