

Ultrazvučna obrada zobnih i ječmenih posija i njihova primjena u tankom kruhu

Pavišić, Zrinka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:691595>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Zrinka Pavišić

**ULTRAZVUČNA OBRADA
ZOBENIH I JEČMENIH POSIJA I
NJIHOVA PRIMJENA U TANKOM
KRUHU**

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 te uz pomoć mag. ing. Tomislave Grgić.

Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta Flat Bread of Mediterranean area: INnovation & Emerging process & technology (Flat Bread Mine), PRIMA programa broj 2031, koji se financira Europska Unija, unutar programa istraživanja i razvoja Horizon 2020.

This thesis is supported by the PRIMA program under grant agreement No. 2031, project Flat Bread of Mediterranean area: INnovation & Emerging process & technology (Flat Bread Mine). The PRIMA program is an Art.185 initiative supported and funded under Horizon 2020, the European Union's Framework Programme for Research and Innovation. The results and content found on this paper reflects only the author's view. The PRIMA Foundation is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

ZAHVALA

Najviše se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Novotni i mag. ing. Tomislavi Grgić na srdačnosti, strpljenju za sva moja pitanja i nejasnoće te pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela istraživanja i prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem svojim roditeljima koji mi pružaju vječnu podršku u životu i koji su bili puni razumijevanja za sve uspone i padove tijekom mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

ULTRAZVUČNA OBRADA ZOBENIH I JEČMENIH POSIJA I NJIHOVA PRIMJENA U TANKOM KRUHU

Zrinka Pavišić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 58208429

Sažetak: Zobene i ječmene posije su nusprodukt obrade žitarica kojima bi se mogao nutritivno obogatiti kruh. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na funkcionalna svojstva i enzimsku aktivnost (fitaze i β -glukanaze) u zobenim i ječmenim posijama. Tretman je proveden uranjanjem zvučne sonde u 15 %-tnu suspenziju zobenih i ječmenih posija pri 400 W, 24 kHz i različitim utrošcima specifične energije (100 i 250 J mL⁻¹) te radnim ciklusima (kontinuirani i pulsirajući). U svim ultrazvučno obrađenim uzorcima se smanjila koncentracija fitata, a aktivnost β -glukanaze samo u zobenim posijama. Aktivnost fitaze uzoraka pri nižim utrošcima energije raste kao i aktivnost β -glukanaze ječmenih posija. Ultrazvučna obrada povećava kapacitet zadržavanja vode i bubrenja u vodi te smanjuje udio ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnosti. Dodatak (10 % na masu brašna) zobenih i ječmenih posija ne utječe na fizikalna svojstva tankog kruha, osim na tvrdoću i žvakljivost.

Glavne riječi: *zobene i ječmene posije, ultrazvuk visokog intenziteta, fitati, fitaza, β -glukanaza*

Rad sadrži: 63 stranice, 19 slika, 6 tablica, 98 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *Tomislava Grgić, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Nikolina Čukelj Mustač (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni (mentor)
3. doc. dr. sc. Marko Obranović (član)
4. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (zamjenski član)

Datum obrane: 28. rujna 2022.

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: Food Technology

Graduate university study program: Food Engineering

ULTRASONIC TREATMENT OF OAT AND BARLEY BRAN AND THEIR APPLICATION IN FLAT BREAD

Zrinka Pavišić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 58208429

Abstract: Oat and barley bran are by-products of grain processing that could be used to nutritionally enrich the bread. The aim of this thesis was to determine the influence of high - intensity ultrasound on functional properties and enzymatic activity (phytase and β -glucanase) in the oat and barley bran. The treatment was carried out by immersing a sound probe in a 15 % suspension of oat and barley bran at 400 W, 24 kHz with different specific energy consumptions (100 and 250 J mL⁻¹) and operation modes (continuous and pulsating). Phytate concentration decreases in all ultrasound treated samples, while β -glucanase activity decreases only in oat bran. The phytase activity of the samples with lower energy consumption increased as well as the β -glucanase activity in barley bran. Ultrasonic treatment increases the capacity of water retention and swelling in water, while it reduces total phenolic compounds and antioxidant activity. The addition (10 % of flour mass) of oat and barley bran does not affect the physical properties of flat bread, except for its hardness and chewiness.

Keywords: *oat and barley bran, high-intensity ultrasound, phytate, phytase, β -glucanase*

Thesis contains: 63 pages, 19 figures, 6 tables, 98 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Dubravka Novotni, PhD, Associate professor*

Technical support and assistance: *Tomislava Grgić, MSc*

Reviewers:

1. Nikolina Čukelj Mustač, PhD, Associate professor (president)
2. Dubravka Novotni, PhD, Associate professor (mentor)
3. Marko Obranović, PhD, Assistant professor (member)
4. Klara Kraljić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 28th, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. TANAK KRUH.....	3
2.2. ZOBENE I JEČMENE POSIJE	4
2.3. NUTRITIVNA VRIJEDNOST I SASTAV ZOBENIH I JEČMENIH POSIJA ..	6
2.3.1. Prehrambena vlakna	8
2.3.1.1. β -glukani.....	9
2.3.2. Mikronutrijenti.....	11
2.3.2.1. Fitinska kiselina	11
2.4. ENZIMI.....	13
2.4.1. β -glukanaza.....	13
2.4.2. Fitaza	14
2.5. ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA	15
2.5.1. Mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta	15
2.5.2. Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na enzimsku aktivnost.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.2. METODE.....	18
3.2.1. Ultrazvučna obrada posija	18
3.2.1.1. Liofilizacija posija	19
3.2.2. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode	20
3.2.3. Određivanje bubrenja u vodi.....	21
3.2.4. Određivanje udjela vode i suhe tvari.....	22
3.2.5. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva.....	23
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	24
3.2.7. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva.....	26

3.2.8. Određivanje fitinske kiseline (fitata) i ukupnog fosfora.....	28
3.2.9. Određivanje aktivnosti fitaze	30
3.2.10. Određivanje aktivnosti β -glukanaze	32
3.2.11. Izrada tankog kruha	33
3.2.12. Određivanje fizikalnih svojstava tankog kruha.....	35
3.2.12.1. Mjerenje boje	35
3.2.12.2. Mjerenje promjera, mase i volumena.....	35
3.2.12.3. Mjerenje teksture	37
3.2.13. Obrada podataka.....	37
4. REZULTATI I RASPRAVA	38
4.1. ULTRAZVUČNA OBRADA POSIJA.....	39
4.2. KAPACITET ZADRŽAVANJA VODE I BUBRENJE U VODI.....	39
4.3. UDIO UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	42
4.4. KONCENTRACIJA FITATA.....	44
4.5. AKTIVNOST FITAZE	45
4.5. AKTIVNOST β -GLUKANAZE	46
4.6. FIZIKALNA SVOJSTVA TANKOG KRUHA.....	48
4.6.1. Boja, oblik, gubitak mase pečenjem i volumen tankog kruha	49
4.6.2. Tekstura tankog kruha	50
5. ZAKLJUČCI.....	51
6. LITERATURA	53

1. UVOD

U novije doba je među potrošačima sve veća potražnja za nutritivno bogatom, funkcionalnom hranom zbog čega pekarska industrija nastoji povećati hranjivu vrijednost svojih proizvoda. Osim esencijalnih nutrijenata, funkcionalna hrana sadrži i biološki aktivne sastojke koji imaju značajan fiziološki učinak na ljudsko zdravlje (Chen i sur., 2021). Upravo se konzumacija hrane od cjelovitih žitarica, zbog visokog udjela prehrambenih vlakana, smatra izuzetno važnim čimbenikom za prevenciju raznih bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, karcinoma, ali i pretilosti. Posije, kao nusprodukt procesa mljevenja žitarica, su iznimno bogate prehrambenim vlaknima, ali i vitaminima, mineralnim i polifenolnim tvarima. Osobito se ističu zobene i ječmene posije po svom sadržaju β -glukana s brojnim dobrobitima na ljudsko zdravlje poput smanjenja glukoze i kolesterola u krvi te utjecaja na prevenciju pretilosti (Frost i sur., 2014). Međutim, nisu u potpunosti iskorištene u prehrambenoj industriji djelomično zbog nedostataka informacija u literaturi o svojstvima kvalitete te neznanju o načinima obrade kojima bi se poboljšala tehnološka svojstva i nutritivna iskoristivost (Patel, 2012). Posijama se mogu obogatiti razni proizvodi od žitarica poput žitarica za doručak, tjestenine te različite vrste pekarskih proizvoda, npr tanak kruh. Tanak kruh (engl. *flat bread*) vrlo je jednostavna vrsta kruha koja se radi od brašna, vode, soli i kvasca, ali može sadržavati i dodatne sastojke poput brašna ili dijelova zrna drugih žitarica, mlijeka, jaja, ulja, začinskog bilja, sušenog voća i sl. Tanak kruh je star gotovo kao i ljudska civilizacija, a tradicionalno se proizvodi i kod nas (npr. pogača, lepinja i dr.). Potrošnja tradicionalno proizvedenog tankog kruha, ali i onog na industrijskoj razini raste iz godine u godinu na području cijelog svijeta (Al dmoor, 2012).

Primjena posija u hranu je zahtjevna zbog tehnoloških nedostataka prilikom proizvodnje, ali i zbog slabije prihvatljivosti među potrošačima zbog drugačije boje, okusa i teksture gotovog proizvoda. Neobrađene posije nisu prikladne za izravnu uporabu zbog prisutnih prehrambenih vlakana koja imaju veliki kapacitet zadržavanja vode čime se mijenja volumen i elastičnost tijesta u proizvodnji kruha, ali i zbog nepoželjnih senzorskih svojstava poput gorčine i osjećaja pijeska u ustima (Prückler i sur., 2014). Osim toga posije su bogate fitinskom kiselinom koja ima visok afinitet za vezanje mineralnih tvari radi čega se njihova bioraspoloživost u tijelu smanjuje (Reddy i Sathe, 2001). Dodatni problem je razgradnja β -glukana tijekom fermentacije tijesta prirodno prisutnim enzimima posija kao što je β -glukanaza. Posije se stoga moraju obraditi prije dodatka u neki prehrambeni proizvod. Neki

od tradicionalnih načina obrade su fermentacija, enzimsko procesiranje, namakanje, toplinska obrada ili ekstruzija. U novije vrijeme javlja se potreba za razvojem novih, ekološki prihvatljivih tehnologija obrade hrane kojima se mogu zamijeniti starije tehnologije, a jedna od takvih tehnologija je ultrazvuk.

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj obrade ultrazvukom visokog intenziteta ovisno o utrošenoj specifičnoj energiji i načinu radnog ciklusa na funkcionalna svojstva zobnih i ječmenih posija za obogaćivanje tankog kruha. Ispitana je aktivnost enzima fitaze i β -glukanaze, ukupna koncentracija fitatnog i slobodnog fosfora, kapacitet zadržavanja vode, sposobnost bubrenja u vodi, udjel ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost posija. Tankom kruhu s dodatkom zobnih i ječmenih posija određena je boja, oblik, gubitak pečenjem, volumen i tekstura.

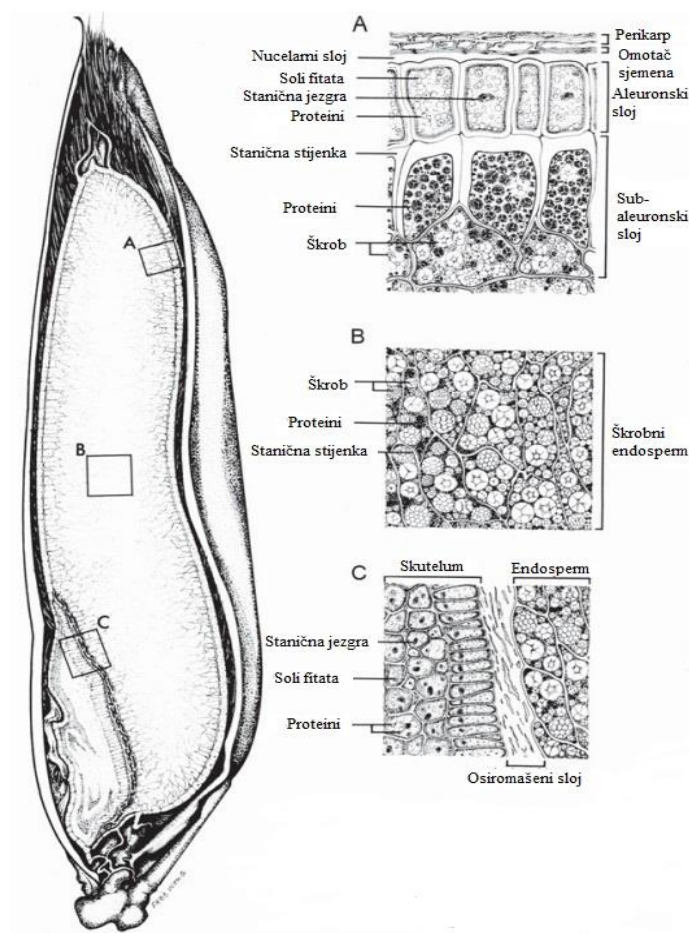
2. TEORIJSKI DIO

2.1. TANAK KRUH

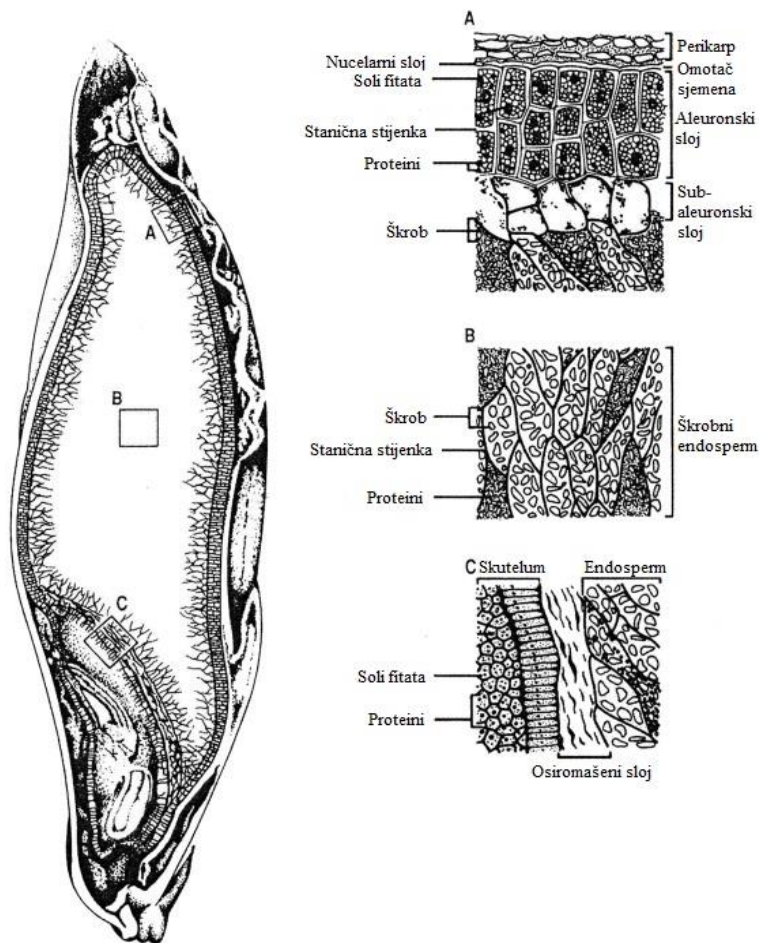
Proizvodnja kvalitetnog tankog kruha najprije započinje odabirom brašna koje utječe na kvalitetu i rok trajanja gotovog proizvoda. Neki od kriterija brašna koji se gledaju su sposobnost upijanja vode, kvaliteta proteina, količina glutena, želatinizacija škroba i sadržaj vlage. Ispravna viskozno – elastična svojstva su bitna prilikom procesa oblikovanja i valjanja tijesta. U zamjes tijesta idu brašno i voda te najčešće sol i kvasac, a miješanje zamjesa traje dok tijesto ne poprimi glatku i mekanu teksturu. Gluten se razvija hidratacijom pšeničnog brašna i mehaničkom energijom koja se unese miješanjem. Nakon toga tijesto se ostavi da fermentira u masi neko vrijeme čime tijesto dodatno mekša i raste. Masa tako fermentiranog tijesta se podijeli na jednake mase, kružno se oblikuju te se ponovno ostavi na kratkoj fermentaciji i odmaranju. Nakon toga tijesto se izvalja u željeni oblik i debljinu od nekoliko milimetara, te se odloži na drvenim daskama. Pečenje tankog kruha provodi se na vrlo visokim temperaturama, a temperatura i vrijeme pečenja ovisi o veličini i debljini kruha. Konačni proizvod obično je plosnatog, okruglog oblika, promjera od 120 do 650 mm i debljine od svega nekoliko pa do 30 mm. Kora je tanka i svijetla s tamnijim smeđim mrljama. Također, kao parametri kvalitete gledaju se formirani džepovi zraka, lako odvajanje vrha i donjeg sloja, bijela boja krušnih mrvica, fina ujednačena struktura i jednostavno kidanje. To je sve povezano s osjećajem kruha u ustima koji bi se trebao lako žvakati i nikako ne biti žilav (Al dmoor, 2012). Jedna od podjela tankog kruha je na dizani kruh s kvascem i beskvasni kruh koji se ne podvrgava fermentaciji tijesta. Druga podjela je na jednoslojne i dvoslojne tanke kruhove. Najvažnija razlika kod jednoslojnih i dvoslojnih tankih kruhova je u fazi dizanja koja je za jednoslojne kruhove kraća i traje par minuta. Kako bi se spriječilo stvaranje džepova zraka kod jednoslojnih kruhova, pečenje traje dulje na nižoj temperaturi ili se tijesto netom prije pečenja probuši. Kod dvoslojnih tankih kruhova vrijeme zadnje fermentacije oblikovanih komada može trajati i preko 20 min, za to vrijeme se površina osuši i formira se korica na tijestu što tijekom pečenja omogućuje nadimanje tijesta i stvaranje dvoslojnog tankog kruha (Qarooni i sur., 1992).

2.2. ZOBENE I JEČMENE POSIJE

Oljušteno cijelo zrno žitarica sastoji se od posija, endosperma i klice (Slika 1 i 2). Posije su frakcija koja nastane prilikom procesa mljevenja žitarica, a uglavnom ih sačinjava perikarp, omotač sjemena, aleuronski sloj te dio klice i endosperma (Lebesi i Tzia, 2012). Posije su nutritivno bogat dio žitarica s vrlo visokim udjelom vlakana, minerala, vitamina i biološki aktivnih spojeva koji se nažalost često odbacuje tijekom mljevenja zbog neznanja, organoleptičkih razloga ili problema s užeglošću (Patel, 2012). Sastav žitarica, pa tako i posija, varira ovisno o sorti biljke, veličini i obliku zrna, stupnju zrelosti, debljini vanjskog sloja, uvjetima i trajanju skladištenja, kondicioniranju zrna prije mljevenja i samom načinu mljevenja (Zitterman, 2003). Posije žitarica mogu se dodavati u različitu vrstu hrane radi poboljšanja nutritivne vrijednosti, ali imaju i potencijal da osnaže teksturu, da djeluju kao emulgatori, zgušnjivači, stabilizatori te imaju mogućnost želiranja (Sharma, 1981). Također, posije imaju ekonomsku prednost nad ekstrahiranim prehranbenim vlaknima jer jednako dobro obogaćuju prehranbeni proizvod bez dodatnih troškova ekstrakcije (Alan i sur. 2012).



Slika 1. Morfološki prikaz zobnog zrna (prema Miller i Fulcher, 2011).



Slika 2. Morfološki prikaz ječmenog zrna (prema Sullivan i sur., 2013)

Najvažniji dio posija je aleuronski sloj koji morfološki pripada endospermu, međutim prilikom mljevenja uklanja se sa svim vanjskim dijelovima zrna i ulazi u sastav posija. Ima relativno visok udio pepela, vitamina, proteina, ukupnog fosfora, fitatnog fosfora i masti. Kod zobnih posija aleuronski sloj sačinjava jedan sloj stanica s debelom staničnom stijenkom poprilično otpornom na ljudsku probavu (Miller i Fulcher, 2011), dok se u zrnu ječma sastoji od 2 – 4 reda stanica također s debelom staničnom stijenkom sastavljenom uglavnom od arabinoksilana i β -glukana (Fincher i Stone, 1986). Aleuronske stanice popunjene su gustim matriksom proteinskih tjelešaca (aleuronskih zrnaca) okruženih lipidnim tjelešcima sa značajnom količinom tokoferola. Postoji još jedna strukturalna nakupina u stanicama aleuronskog sloja koja se razlikuje od proteinskih tjelešaca, a sačinjena je od fitata – najčešće kalcijevih ili magnezijevih soli fitinske kiseline. Za razliku od nepravilnih stanica škrobnog endosperma, stanice aleuronskog sloja jednakog su promjera u svim smjerovima. Količina β -glukana u aleuronskom sloju je mala u usporedbi s količinom koja se nalazi u škrobnom endospermu, međutim može značajno pridonijeti posijama u sposobnosti vezanja vode,

odnosno njihovoj učinkovitosti kao dijetalna vlakna. Perikarp, omotač sjemena i nucelarni sloj u zreom zrnu gube metaboličku aktivnost i uglavnom se sastoje od netopljivih polisaharida poput celuloze, hemiceluloze i lignina (Miller i Fulcher, 2011).

Najčešća sirovina koja se koristi kao izvor prehrambenih vlakana u pekarstvu su posije, i to najviše pšenične posije (Seibel, 1975). Upotreba ječmenih i zobnih posija raste zahvaljujući njihovom visokom sadržaju topivih prehrambenih vlakana, osobito β -glukana. Međutim dodavanje posija u takvim količinama od kojih se mogu očekivati zdravstvene dobrobiti uzrokuju ozbiljne probleme u kvaliteti kruha (Noort i sur., 2006). Dodatak vlakana uzrokuje mnoštvo tehnoloških problema poput smanjene tolerancije na fermentaciju, tijesto postane vlažnije, volumen konačnog proizvoda je manji te se mijenja tekstura i boja proizvoda. Do problema dolazi jer dodatkom vlakana, osobito vlakana topivih u vodi, kapacitet vode koju tijesto može vezati značajno raste. Osim tipa vlakana, na kapacitet vezanja vode utječe i veličina vlakna – veća vlakna mogu vezati na sebe više vode. Dakle prisutna vlakna u posijama značajno utječu na vrijeme koje je potrebno da se formira tijesto, a osim toga utječu i na stabilnost tijesta jer s dodatkom vlakana glutenska mreža se razrjeđuje i slabi (Almeida i sur., 2010). Za uspješan dodatak posija u kruh potrebno je provesti određene tehnike prerade poput fermentacije ili enzimske obrade kako bi se nutritivna vrijednost i iskoristivost povećala, a tehnološki problemi do kojih dolazi prilikom proizvodnje smanjili (Coda i sur., 2015). U novije vrijeme ultrazvuk se počeo koristiti kao nova metoda obrade hrane. Osim što utječe na povećanje dostupnosti spojeva visoke nutritivne vrijednosti, obrada ultrazvukom može utjecati i na reološka svojstva hrane i uzrokovati promjenu u boji (Čukelj Mustač i sur., 2019).

2.3. NUTRITIVNA VRIJEDNOST I SASTAV ZOBENIH I JEČMENIH POSIJA

Posije su bogate mnogim biološki aktivnim spojevima poput prehrambenih vlakana, esencijalnih masnih kiselina, fitosterola, antioksidansa, vitamina i minerala od kojih svi imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje. Uz navedene biološki aktivne spojeve, posije nose i kalorijsku vrijednost zbog prisutnih proteina, ugljikohidrata i masti. Drugim riječima, posije su skladište hranjivih tvari u žitaricama i svakako ih treba uključiti u ljudsku prehranu (Patel, 2012). Nutritivni sastav zobnih i ječmenih posija naveden je u tablici 1. On uvelike ovisi o sorti žitarice, načinu prerade i stupnju mljevenja. Zobene i ječmene posije imaju otprilike podjednak udio proteina i minerala, međutim zobene posije imaju u prosjeku znatno više masti. U zobnim posijama je najviše zastupljena esencijalna nezasićena linolna (18:2) masna

kiselina, potom oleinska (18:1) te zasićena palmitinska (16:0). U ječmenim posijama prevladava također esencijalna linolna (18:2) te palmitinska (16:0) masna kiselina. Aminokiselinski sastav je poprilično ujednačen, međutim kao i u svim žitaricama nedostaje cisteina i fenilalanina, a triptofan koji nije prisutan u ječmu, riži i sirku, prisutan je u zobi, dok je najviše zastupljena glutaminska kiselina (Chinma i sur., 2015). Fitinska kiselina koja se smatra antinutrijentom zbog ometanja apsorpcije minerala u tijelu u zobnim posijama je prisutna oko 1,37 % na suhu tvar, dok je u ječmenim posijama koncentracija nešto manja 1,19 % fitinske kiseline na suhu tvar (Reddy i Sathe, 2001). Za zobene posije specifični su topivi fenolni spojevi male molekularne mase koji se nazivaju avenantramidi; njih zob sintetizira kao odgovor na izloženost patogenim gljivicama (Okazaki i sur., 2004). Antioksidacijska aktivnost avenantramida može biti od 10 do 30 puta veća od ostalih fenolnih spojeva u zobnim posijama poput vanilina ili kafeinske kiseline (Dimberg i sur., 1992). Ječmene posije su također bogate antioksidansima poput proantocijanidina, glavne vrste flavonoida u ječmu, te polifenola poput vanilinske, kafeinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline (Irakli i sur., 2020).

Tablica 1. Nutritivni sastav zobnih i ječmenih posija (prema Chinma i sur., 2015)

Sastojak (na suhu tvar)	Zobene posije	Ječmene posije
Proteini (%)	8,80 – 16,70	11,90 – 14,00
Pepeo (%)	1,45 – 6,30	3,07 – 5,00
Masti (%)	3,00 – 10,60	2,80- 5,00
Ugljikohidrati(%)	55,60 – 61,40	51,90 – 58,40
Ukupna vlakna (%)	24,70	37,6
Topiva vlakna (%)	11,70	11,00
Netopiva vlakna (%)	13,00	26,6
Kalcij (mg 100g ⁻¹)	53,00	43,00
Željezo (mg 100g ⁻¹)	5,00	9,50
Magnezij (mg 100g ⁻¹)	216,00	155,00
Fosfor (mg 100g ⁻¹)	580,00	396,00
Kalij (mg 100g ⁻¹)	521,00	580,00
Natrij (mg 100g ⁻¹)	4,00	-

Cink (mg 100g ⁻¹)	3,00	0,02
Tiamin (mg 100g ⁻¹)	1,10	0,60
Riboflavin (mg 100g ⁻¹)	0,20	0,20
Niacin (mg 100g ⁻¹)	0,86	6,20
Pantotenska kiselina (mg 100g ⁻¹)	1,40	0,70
Folna kiselina (mg 100g ⁻¹)	48,00	73,00

2.3.1. Prehrambena vlakna

Prehrambena vlakna se prema Codexu Alimentariusu (2009) definiraju kao polimeri ugljikohidrata s tri ili više monomernih jedinica koji se u ljudskom probavnom traktu ne mogu ni probaviti ni apsorbirati nego djelovanjem mikrobiote u debelom crijevu dolazi do njihove fermentacije (Weickert i Pfeiffer, 2008), a uključuju neškrobne polisaharide, neprobavljive oligosaharide i rezistentni škrob. Tvari prehrambenih vlakana su celuloza, hemiceluloza, pektin, β -glukani, hidrokoloidi i lignin, a one se mogu dodatno podijeliti na u vodi netopiva prehrambena vlakna i u vodi topiva prehrambena vlakna koja se u crijevima lakše fermentiraju. U vodi topiva prehrambena vlakna su β -glukani, pektinske tvari i hidrokoloidi, a njihov dobar izvor su voće, povrće, mahunarke, psilijum te zobene i ječmene posije. U vodi netopiva prehrambena vlakna su celuloza, hemiceluloza i lignin čiji su bogat izvor općenito cjelovite žitarice (Wardlaw i Insel, 1997). Neka prehrambena vlakna su čisti polisaharidi ili oligosaharidi, dok neka prehrambena vlakna biljnog podrijetla nakon ekstrakcije sadrže i druge spojeve poput proteinskih frakcija, fenolnih spojeva, voskova i sl. koji mogu imati dodatne korisne fiziološke učinke (Phillips i Cui, 2011).

Sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana u zobenim posijama varira od 12 – 24 % ovisno o sorti, lokaciji uzgoja, vremenskim prilikama, gnojdbi, ali i načinu obrade (Mälkki i Virtanen, 2001). Otprilike polovica ukupnih prehrambenih vlakana je topiva u vodu od kojih je glavna tvar β -glukan, dok drugu polovicu netopivih vlakana sačinjavaju celuloza, lignin i hemiceluloza (Mälkki, 2001). Prema istraživanju Sullivana i sur. (2010) količina ukupnih prehrambenih vlakana u posijama cjelovitog ječma je 37,6 %. Količina netopivih vlakana veća je i iznosi 26,6 %, dok je količina topivih vlakana 11 % od kojih je β -glukana 1,42 %.

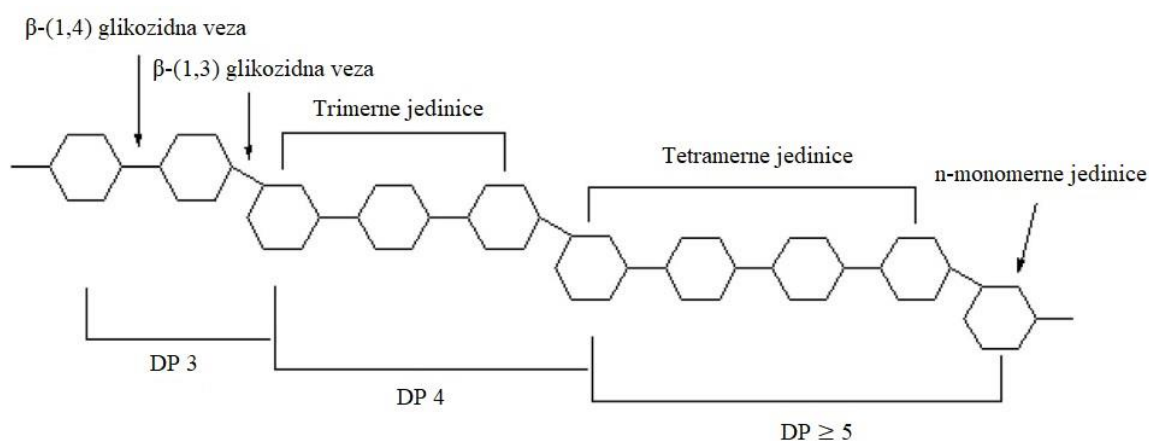
Radi funkcionalnih svojstava kao i njihovog potencijalno pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje interes za korištenje prehrambenih vlakana sve više raste. Od svih pozitivnih učinaka najpoznatiji je učinak na povećanje peristaltike crijeva i prevenciju zatvora (Rao i sur., 2015). Također, utvrđeno je da topljiva prehrambena vlakna utječu na smanjenje visoke razine kolesterola, triglicerida i glukoze u krvi te produljuju vrijeme pražnjenja želuca, a osim toga s obzirom na to da stvaraju vrlo viskozne vodene otopine mogu utjecati i na teksturu, želiranje, zgušnjavanje i emulgiranje hrane (Anderson, 1986). S druge strane, netopiva prehrambena vlakna smanjuju vrijeme prolaza fecesa kroz crijeva zbog sposobnosti zadržavanja vode (Bader i sur., 2019). Prehrambena vlakna pozitivno djeluju i na balans crijevne mikroflore, naime disbioza crijevne mikroflore uzročnik je velikom broju zdravstvenih problema poput kroničnih upalnih procesa koji mogu uzrokovati razvitak autoimune bolesti i intolerancije na hranu. Prehrambena vlakna osim što sprječavaju eroziju sluzne barijere u debelom crijevu, poboljšavaju proizvodnju ključnih mikrobnih metabolita poput kratkolančanih masnih kiselina koje imaju dodatan pozitivan učinak na ljudsko zdravlje (Makki i sur., 2018).

Suvremena prehrana u zemljama Europe i Sjeverne Amerike izuzetno je osiromašena prehrambenim vlaknima zbog visoko prerađene hrane koju ljudi učestalo konzumiraju. Stoga je potrebno uvesti širi izbor hrane koja na pakiranju ima jasno naznačeno da je obogaćena prehrambenim vlaknima poput kruha od cjelovitih žitarica ili tjestenine obogaćene prehrambenim vlaknima (Barber i sur., 2020).

2.3.1.1. β -glukani

β -glukani su polisaharidi koji se kod žitarica nalaze u aleuronskom i subaleuronskom sloju i endospermu staničnih stijenki sjemenki uključujući zob, ječam, raž i pšenicu. Razina β -glukana u navedenim žitaricama varira od 0,5 – 2 % u cjelovitoj pšenici i raži, nešto više u zobi (3,5 – 4,9 %), a najviše u ječmu (3 – 7 %; Cui i Roberts, 2009). Osim kod žitarica, β -glukani mogu se pronaći i kod kvasaca, gljiva, bakterija i algi, a različiti izvori čine i različite strukture. β -glukani kod žitarica su homopolisaharidi građeni od β -D-glukopiranoze povezani s β -(1,3) i β -(1,4) glikozidnim vezama (Slika 3). Glukopiranozne jedinice raspoređene su kao blokovi od tri ili četiri uzastopnih jedinica povezanih β -(1,4) vezom odvojene jednom β -(1,3) vezom čime se tvore dva građevna bloka od trimera i tetramera. Ostatak polimera sastoji se od oligomera sličnih celulozi sa stupnjem polimerizacije (DP – engl. *degree of polymerization*) većim od 5, pa čak sve do 13 ili 16. Nasumična distribucija i omjer tih jedinica je važan jer utječe na svojstvo topljivosti ugljikohidrata u vodi (Johansson, 2006).

Takva nepravilna struktura β -glukana omogućava vezanje vode jer je spriječeno formiranje kristalinične strukture kakvu primjerice tvori celuloza koja ima isključivo β -(1,4) veze. Posljedično takva struktura kod celuloze omogućava formiranje vodikove veze između dijelova lanca pa se voda nema gdje vezati (Oakenfull, 1998). Zob i ječam razlikuju se u omjeru trimernih i tetramernih jedinica, ječam posjeduje više trimera i oligomera; omjer trimer : tetramer je u rasponu od 1,6 – 3,5 te je veći od onog u zobi koji varira od 1,4 – 2,3 (Johansson, 2006). Osim stupnja polimerizacije i omjera trimernih i tetramernih jedinica, molekulska masa i koncentracija β -glukana također utječu na fizikalna svojstva otapanja i viskoznosti – visoka molekulska masa u kombinaciji s visokom koncentracijom tvore vrlo viskozne sustave (Wood i sur., 2000). β -glukan je glavna komponenta topivih prehrambenih vlakana u zobi i ječmu. Vodene otopine β -glukana su vrlo viskozne pa se zobeni i ječmeni β -glukani često nazivaju i zobena i ječmena guma (Welch, 2011). Ekstrahirani β -glukani visoke molekulske mase imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji kao stabilizatori i sredstva za zgušnjavanje primjerice u sladoledima, umacima i preljevima za salate (Wood, 2011).



Slika 3. Strukturni prikaz β -glukana (prema Bai i sur., 2019)

β -glukani iz žitarica imaju pozitivne učinke na smanjenje glukoze i kolesterola u krvi što dovodi do općenito smanjenog rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Također mogu utjecati na prevenciju pretilosti zbog duljeg osjećaja sitosti nakon konzumacije, te zbog nastajanja butirata i acetata tijekom fermentacije u crijevima koji imaju utjecaj na suzbijanje apetita (Frost i sur., 2014). β -glukani iz mikroorganizama koji u svojoj strukturi imaju β -(1,3) i β -(1,6) glikozidne veze pokazuju bolje antitumorsko, protuupalno i antivirusno djelovanje, te štite od bolesti imunološkog sustava (Bai i sur., 2019).

2.3.2. Mikronutrijenti

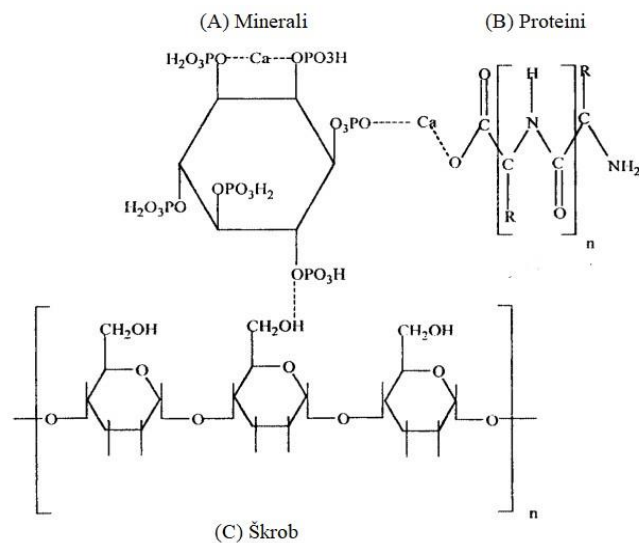
Mikronutrijenti se sastoje od minerala i vitamina koji su potrebni u značajno manjim količinama u prehrani nego makronutrijenti (ugljikohidrati, masti i proteini). Mineralne tvari čine anorgansku komponentu, odnosno pepeo, dok vitamini čine manji organski dio. U svim žitaricama vitamini i minerali su najviše koncentrirani u vanjskim slojevima sjemenke, odnosno u posijama. U zobnim i ječmenim posijama od minerala najviše su zastupljeni fosfor (P), kalij (K), magnezij (Mg) i kalcij (Ca), a su manjim količinama su prisutni željezo (Fe), mangan (Mn), natrij (Na) i cink (Zn). Od vitamina najzastupljeniji su folna kiselina (B₉), biotin (B₇), kolin, niacin (B₃), pantotenska kiselina (B₅) i vitamin E (USDA, 2019).

Bioiskoristivost opisuje do kojeg se stupnja mikronutrijenti prisutni u posijama mogu apsorbirati u ljudskom probavnom traktu. Primjerice značajan udio ukupnog fosfora pohranjen je u obliku fitinske kiseline koja ne podliježe apsorpciji u crijevima zbog nedostataka enzima za razgradnju pa je stoga fitatni fosfor uglavnom nedostupan. Osim toga, fitinska kiselina tvori soli fitate s raznim kationskim mineralima poput kalcija, željeza i magnezija čineći ih time također nedostupnim za apsorpciju (Welch, 2011). Osim minerala, vitamini također mogu imati nižu bioiskoristivost. Prema istraživanju Roth-Maiera i sur. (2002) vitamini poput niacina, pantotenske kiseline i biotina nisu u potpunosti bioiskoristivi, međutim bioiskoristivost tiamina je ipak visoka. Stoga analitički podaci mogu precijeniti količine koje su dostupne za probavu i apsorpciju i iskoristive u ljudskom tijelu.

2.3.2.1. Fitinska kiselina

Fitinska kiselina (mio-inozitol-1,2,3,4,5,6-heksakisfosfat) glavni je skladišni oblik fosfora u žitaricama, čini 50 – 80 % ukupnog fosfora. Većinski je koncentrirana u aleuronskom sloju te embriju zrna, a čini oko 1 % suhe tvari žitarica. Pri staničnom pH fosfatne skupine fitinske kiseline su negativno nabijene što omogućuje interakciju s pozitivno nabijenim komponentama poput kationa minerala i proteina (Slika 4). Metalni ioni se mogu vezati s jednom ili više fosfatnih grupa tvoreći komplekse različite topljivosti. Od minerala čini se da fitinska kiselina ima najveći afinitet prema cinku (Zn) jer tvori najstabilniji netopljiv kompleks. Ostali minerali koji se potencijalno mogu vezati na fitinsku kiselinu su kalcij (Ca), natrij (Na), željezo (Fe), magnezij (Mg), mangan (Mn) i klor (Cl). Proteini se mogu izravno povezati s fitinskom kiselinom putem elektrostatskog naboja. Osim toga, preko vodikovih veza se može vezati i škrob. Vezanje fitinske kiseline s ostalim nutrijentima

mijenja njihovu topivost, funkcionalnost, probavu i u konačnici mogućnost apsorpcije u tijelu što smanjuje bioiskoristivost (Rickard i Thompson, 1997).



Slika 4. Strukturni prikaz fitinske kiseline i interakcija s mineralima (A), proteinima (B) i škrobom (C) (prema Oatway i sur., 2001)

Fitinska kiselina uzrokuje probleme pri obradi i konzumaciji hrane jer povećan unos fitinske kiseline putem cjelovitih žitarica ili posija može imati nepoželjne učinke na bioraspoloživost minerala u tijelu. Neki procesi čak povećaju netopivost kompleksa između minerala i fitinske kiseline čime se dodatno smanjuje dostupnost minerala. Kivisto i sur. (1986) su otkrili da ekstruzijsko kuhanje mješavine bogate fitatima od škroba, pšeničnih posija i glutena uzrokuje smanjenje cinka, magnezija i fosfora kod ispitivanih pacijenata, a kao razlog se navodi inaktivacija fitaze. Bioraspoloživost minerala iz kruhova od cjelovitih žitarica vrlo je niska iako se pečenjem sadržaj fitata u takvom kruhu zbog hidrolitičkog djelovanja enzima fitaze smanji za 50 – 60 % (Turk i sur., 1996). Međutim postoje i procesi obrade poput namakanja, fermentacije, klijanja i zračenja koji imaju uspješan efekt u razgradnji fitinske kiseline radi aktivacije prirodno prisutne fitaze u zrnu žitarica.

Fitinska kiselina pokazuje i neke pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Shamsuddin (1995) je u svom istraživanju dokazao kako fitinska kiselina ima antioksidacijski učinak zbog sposobnosti keliranja dvovalentnih kationa. Naime, životinje kojima su davane niske koncentracije fitinske kiseline u vodi za piće pokazale su značajno manji broj i veličinu tumora, čak i ako je dana u kasnoj fazi kad se očekivalo da će životinja imati razvijen karcinom. Dakle fitinska kiselina može djelovati i kao preventiva, ali ima i terapijski

učinak. Iako fitinska kiselina nije bila izravni antagonist protiv karcinoma, uspjela je normalizirati stopu dioba stanica. Osim toga, pokazalo se da fitinska kiselina suzbija i druge upalne bolesti crijeva (Reddy i sur., 1989).

2.4. ENZIMI

Žitarice sadrže velik broj specifičnih enzima čije aktivnosti utječu na konačnu kvalitetu sirovina. Položaj enzima nije ujednačen kroz cijelo zrno – mnogi enzimi nalaze se vanjskom i aleuronskom sloju te u klici. Prilikom mljevenja, enzimi su neravnomjerno raspoređeni kroz dobivene frakcije gdje frakcije endosperma imaju nižu enzimsku aktivnost dok je najveća enzimska aktivnost prisutna u posijama. Visoka razina enzimске aktivnosti može utjecati na topivost, viskoznost, ali i nutritivna svojstva prehrambenih vlakana te biodostupnost ostalih tvari poput minerala ili proteina (Poutanen, 1997).

2.4.1. β -glukanaza

Aktivacijom endogene β -glukanaze u biljkama dolazi do hidrolitičkog cijepanja glikozidnih veza u molekuli β -glukana. Klijanjem dolazi do pucanja stanične stijenke što potiče endogene enzime na hidrolitičku razgradnju molekula škroba i drugih polisaharida, pa se tako aktivira i β -glukanaza koja započinje razgradnju prisutnih β -glukana u endospermu i aleuronskom sloju (Hoj i sur., 1989). Optimalan pH za aktivnost β -glukanaze je u rasponu od 4,5 – 5,5 (Bielecki i Galas, 1991). Također, β -glukanaza je relativno termostabilan enzim koji podnosi temperature od 30 °C do 70 °C, međutim pri optimalnoj temperaturi od 65 °C β -glukanaza pokazuje najveću aktivnost (Bestzyme, 2021).

Kako bi se zadržao pozitivan fiziološki učinak β -glukana dodan pečenim pekarskim proizvodima potrebno mu je zadržati molekularnu masu i strukturu prilikom miješanja, fermentacije i dizanja tijesta, a to se najbolje postiže inaktivacijom β -glukanaze (Andersson i sur., 2004). Moriarteya i sur. (2010) istraživali su utjecaj dodatka kvasca u zamjes za bijeli kruh obogaćen ječmenim β -glukanima. Nakon završetka zamjesa, β -glukani su ekstrahirani te se mjerila njihova viskoznost koja ovisi o koncentraciji i molekularnoj masi β -glukana. Viskoznost nije značajno smanjena čime su zaključili da enzimska aktivnost kvasaca prilikom fermentacije tijesta te mehaničko miješanje tijesta nema značajan utjecaj na aktivnost β -glukanaze. Ovaj zaključak je suprotan onome kojeg su Cleary i sur. (2007) sugerirali kako bi enzimska hidroliza β -glukana u bijelom kruhu obogaćenom β -glukanom mogla biti posljedica enzima prisutnih u dodanom kvascu. U pokušaju da se inaktivira

endogena β -glukanaza Rieder i sur. (2014) su ječmeno brašno od cjelovitog zrna podvrgnuli toplinskoj obradi na temperaturi od 130 °C u trajanju od 90 min. Ovakav tretman smanjio je aktivnost β -glukanaze oko tri puta, ali nije doveo do potpune inaktivacije. Za smanjenje aktivnosti ispod 0,15 U kg⁻¹ bilo je potrebno primijeniti temperaturu od 150 °C u trajanju od 3 h. Također, Pérez-Quirce i sur. (2016) su u pokušaju inaktivacije β -glukanaze mikrovalovima tretirali rižino brašno. Mikrovalna obrada rižinog brašna je dovela do značajnog smanjenja aktivnosti β -glukanaze, a učinak je izraženiji kad se poveća vrijeme tretmana i sadržaj vlage u brašnu.

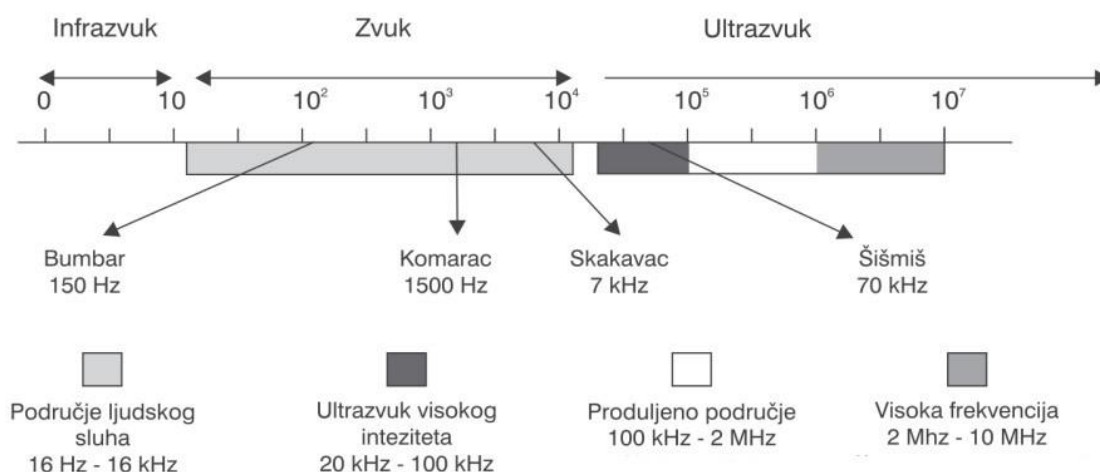
2.4.2. Fitaza

Aktivacijom endogene fitaze u žitaricama fitinska kiselina se hidrolizira u mio-inozitol preko intermedijarnih mio-iozitolfosfata (penta- do monofosfata) pritom oslobađajući anorganski fosfat. Uklanjanjem fosfatnih skupina s fitinske kiseline, kapacitet vezanja minerala se smanjuje. Postoji nekoliko vrsta fitaza čije aktivnosti ovise o pH vrijednosti, za većinu njih najveća aktivnost je pri kiselom pH u rasponu od 5,0 – 6,0. Također optimalna temperatura koja potiče najveću aktivnost fitaze je u rasponu od 45 – 65 °C (Fredlund i sur., 1997). Fitaza je smještena u aleuronskom sloju žitarica gdje je uglavnom u deaktiviranom stanju zbog nedostatka vlage koja je potrebna za aktivaciju. Primjeri tradicionalnih prehrambenih procesa kojima je moguće aktivirati endogenu fitazu su namakanje, pravljenje slada i fermentacija. Klijanjem biljke se također aktivira fitaza čime se povećava dostupnost slobodnog fosfora koji je potreban embriju u razvoju (Oatway, 2001).

Aktivnost fitaze varira ovisno o vrsti žitarica, primjerice da se postigne potpuno hidroliza fitata za integralno raženo brašno bilo je potrebno 30 minuta namakanja, za pšenične posije 2 h, dok kod zobenog integralnog brašna fitati nisu bili u potpunosti hidrolizirani čak ni nakon 17 h namakanja (Bartnik i Szafranska, 1987). Tijekom pečenja pšeničnog i raženog kruha od cjelovitog zrna, sadržaj fitata je smanjen na 20 – 33 % zbog povoljnijeg pH i povećanja aktivnosti enzima fitaze (Fretzdorff i Brummer, 1992). U istraživanju koje su proveli Turk i sur. (1996) fitati su se tijekom pečenja pšeničnog kruha smanjili za 50 – 60 %. Bitno je znati kako optimirati aktivnost fitaze tijekom pečenja kruha jer time dobijemo proizvod s većom bioraspoloživošću minerala. Neki od bitnijih čimbenika koji utječu na aktivnost endogene fitaze su veličina čestica brašna, pH, temperatura, vrijeme obrade i sadržaj vode.

2.5. ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA

Ultrazvučni valovi se klasificiraju kao valovi s frekvencijom većom od 20 kHz (Slika 5). U prehrambenoj industriji, primjena ultrazvuka se dijeli na ultrazvuk visokog intenziteta i ultrazvuk niskog intenziteta ovisno o korištenoj zvučnoj snazi (W), intenzitetu zvuka ($W\ m^{-2}$) ili gustoći zvučne energije ($Ws\ m^{-3}$). Ultrazvuk niskog intenziteta ima frekvenciju višu od 100 kHz, a intenzitet ispod $1\ W\ cm^{-2}$. Takav ultrazvuk ne mijenja fizikalna ili kemijska svojstva tvari stoga se koristi u analitičke svrhe poput određivanja fizikalno – kemijskih svojstava materijala, sastava, čvrstoće, zrelosti i sl. Nasuprot tome, ultrazvuk visokog intenziteta ima frekvenciju od 20 – 100 kHz te znatno veći intenzitet od $10 - 1000\ W\ cm^{-2}$. Takav ultrazvuk može mijenjati fizikalno – kemijska svojstva i strukturu tvari. Koristi se za inaktivaciju ili aktivaciju enzima, poboljšanje procesa sušenja i smrzavanja, ekstrakciju, kontrolu procesa kristalizacije, emulgiranja, te otplinjavanje tekuće hrane (Chavan i sur., 2022).

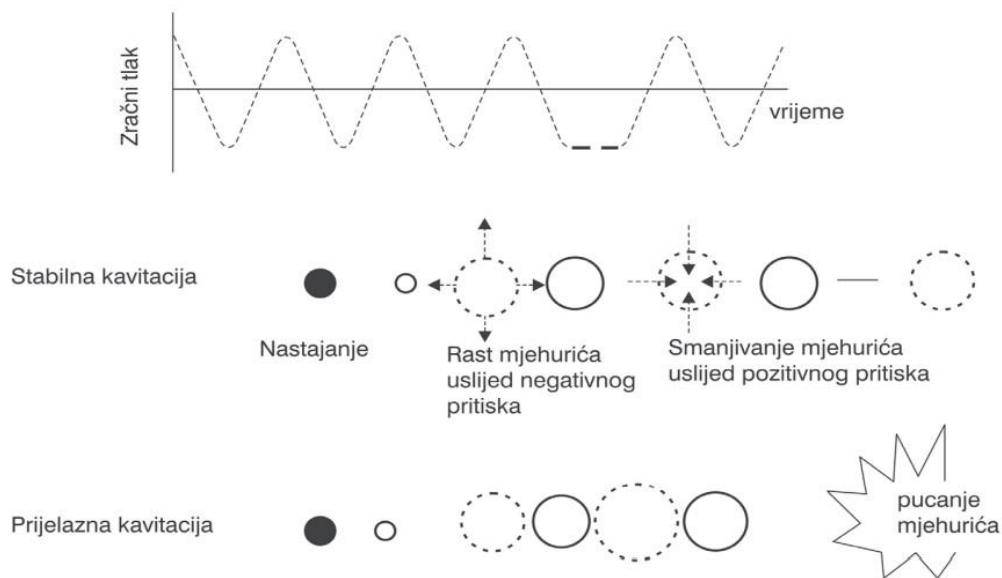


Slika 5. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (prema Mason, 1998).

2.5.1. Mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta

Ultrazvučni valovi prolazeći kroz bilo kakav medij utječu na razmake molekula tako da ih skupljaju i rastežu. Kad udaljenost između molekula premaši maksimalnu molekularnu udaljenost potrebnu za držanje tekućine u kontaktu, tekućina se raspadne stvarajući praznine s negativnim tlakom. Takav negativan tlak rezultira formiranjem mjehurića plina koji se nazivaju kavitacijski mjehurići (Slika 6). Mjehurić koji nastane ovim procesom može rasti dok se dosegne kritičnu veličinu koja ovisi o primijenjenoj frekvenciji zvučnog vala. S

obzirom na to da se tekućina oko kavitacijskih mjehurića i dalje skuplja i rasteže, oni se mogu ponašati na dva načina. Pri niskim ultrazvučnim intenzitetima oko 1 W cm^{-2} nastaju stabilni kavitacijski mjehurići, dok se pri intenzitetu većem od 10 W cm^{-2} formiraju prijelazni kavitacijski mjehurići koji se šire do radijusa koji je najmanje dvostruko veći od početne veličine prije nego li se uruše u ciklusu kompresije. Prilikom takvog urušavanja mjehurića, odnosno implozije, dolazi do lokaliziranih visokih temperatura od 5000 K i tlakova većih od 1000 atm. Upravo te ekstremne temperature i tlakovi uzrokuju oštećenje stanica što posljedično ima učinak na fizikalno – kemijska svojstva tretirane tvari (Chavan i sur., 2022).



Slika 6. Prikaz stabilne i prijelazne kavitacije nastale djelovanjem ultrazvuka (prema Kuijpers i sur., 2002).

2.5.2. Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na enzimsku aktivnost

Ultrazvuk se u prehrambenoj i biotehnoškoj industriji najprije koristio kao metoda inaktivacije mikrobnog i enzimskog aktivnosti, međutim nedavno je otkriveno kako ultrazvuk ne mora inaktivirati sve enzime osobito ako se koriste blagi uvjeti. Pokazalo se kako upotreba ultrazvučnog tretmana pri odgovarajućim frekvencijama i razinama intenziteta može dovesti do aktivacije enzimskog aktivnosti zbog povoljnijih konformacijskih promjena enzimskog strukture (Nadar i Rathod, 2017).

Najčešće se koristi ultrazvuk visokog intenziteta frekvencije uglavnom iznad 30 kHz za inaktivaciju mnogobrojnih enzima primjerice kako bi se spriječile posjije i tijesto od raznih negativnih učinaka poput posmeđivanja, gubitka nutritivne vrijednosti i oksidacijskog

kvarenja (Habuš i sur., 2021a, b i c). Inaktivacija enzima ultrazvukom je uglavnom posljedica implozije kavitacijskih mjehurića radi koje na mikro razini nastaju ekstremna lokalna povećanja temperature i tlaka (Islam i sur., 2014). Ultrazvukom se razvijaju i stabilni kavitacijski mjehurići koji pod utjecajem ultrazvučnih valova vibriraju i pokreću mikrostrujanja u tekućini koja su dovoljno snažna da utječu na konformaciju enzima razarajući vodikove i van der Waalsove interakcije (Huang i sur., 2017). Također, ako je riječ o vodenom mediju, dolazi do stvaranja visokoreaktivnih hidroksilnih radikala koji mogu oštetiti strukturu proteinskog lanca čime se inaktivira enzimska aktivnost (Ercan i Soysal, 2011). U novije vrijeme počeo se istraživati ultrazvuk niže frekvencije za modificiranje enzimskog proteinskog lanca bez narušavanja strukture i enzimske aktivnosti. Naime periodične fluktuacije promjena tlakova uzrokovane ultrazvukom mogu promijeniti prostornu konformaciju enzima i time utjecati na njegovu aktivnost (Duan i sur., 2011). Dakle, enzimi su osjetljivi na ultrazvučno zračenje, bilo da ih ono aktivira ili inaktivira, a njihova tolerancija ovisi o fiziološkim svojstvima samog enzima kao i parametrima ultrazvuka poput snage, frekvencije i tipa ultrazvučne obrade (Huang i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom radu kao uzorak koristile su se zobene (Eko – Jazo, Ivanovec, Hrvatska) i ječmene (OPG Ivan Varga, Čakovec, Hrvatska) posije sa svrhom određivanja utjecaja različitih tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na njihova fizikalno-kemijska svojstva, koncentraciju fitata, aktivnost fitaze i β -glukanaze, udio ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost. Nakon tretiranja zobenih i ječmenih posija ultrazvukom visokog intenziteta posije su podvrgnute procesu liofilizacije i bile skladištene u zamrzivaču na -18 °C.

3.2. METODE

3.2.1. Ultrazvučna obrada posija

Aparatura i pribor:

- 1) Laboratorijska čaša od 250 mL
- 2) Laboratorijska žlica
- 3) Laboratorijska vaga (Kern, Njemačka)
- 4) Menzura od 100 mL
- 5) Ultrazvučni procesor UP 400st (dr. Hielscher GmbH, Njemačka)

Reagensi

- 1) Destilirana voda

Postupak:

U staklenoj laboratorijskoj čaši se pripremi 15 %-tna suspenzija posija tako da se najprije izvaže 30 g posija kojima se doda 200 mL destilirane vode i na kraju se tako pripremljena suspenzija dobro promiješa (Habuš i sur., 2021a). Slijedi obrada ultrazvukom visokog intenziteta (UVI) na uređaju UP 400st (dr. Hielscher GmbH, Njemačka) sondom promjera 22 mm. Ultrazvučna sonda se uroni u sredinu do polovice volumena suspenzije tako da ne dira stijenke čaše, potom se uroni temperaturna sonda koja mjeri promjenu temperature tijekom tretmana, postave se postavke tretmana i započne se s obradom. Uzorci su tretirani ultrazvukom visokog intenziteta snage 400 W i frekvencije 24 kHz uz amplitudu 100 %. Na zobnim i ječmenim posijama (oznaka ZP i JP) primijenjena je klasična obrada ultrazvukom

visokog intenziteta s utroškom energije od 20 000 i 50 000 Ws što se na uzorke od 200 mL izražava kao 100 J mL⁻¹ i 250 J mL⁻¹ (oznaka 100 i 250). Osim klasične, primijenjena je i pulsirajuća obrada ultrazvukom visokog intenziteta kod koje nakon 5 sekundi obrade slijedi 10 sekundi pauze. Kod tih uzoraka se također primijenio utrošak energije od 20 000 Ws i 50 000 Ws što je na uzorke od 200 mL izraženo kao 100 J mL⁻¹ i 250 J mL⁻¹ (oznaka 100 5/10s i 250 5/10s).

Radi bolje procjene utjecaja ultrazvuka visokog intenziteta na fizikalno-kemijska svojstva zobnih i ječmenih posija, pripremljena je jedna 15 %-tna suspenzija za zobene i jedna za ječmene posije koje nisu prošle ultrazvučnu obradu nego su takve nativne suspenzije (oznaka N) liofilizirane i kasnije koristile u svim postupcima analize kao i posije koje su prošle ultrazvučnu obradu.

Tablica 2. Oznake uzoraka i uvjeti tretmana ultrazvukom visokog intenziteta

Oznaka uzorka	Vrsta posija	Utrošak energije po volumenu uzorka (J/mL)	Način tretmana
ZPN		-	-
ZP100	Zobene posije	100	Kontinuiran
ZP100 5/10s		100	Pulsirajući
ZP250		250	Kontinuiran
ZP250 5/10s		250	Pulsirajući
JPN		-	-
JP100	Ječmene posije	100	Kontinuiran
JP100 5/10s		100	Pulsirajući
JP250		250	Kontinuiran
JP250 5/10s		250	Pulsirajući

3.2.1.1. Liofilizacija posija

Aparatura i pribor:

- 1) Liofilizator Christ Alpha 1-4 LSC plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
- 2) Plastične čaše (urinarke, 100 mL)

- 3) Stakleni štapić
- 4) Plastične vrećice

Postupak:

Nakon tretmana UVI, svaki uzorak se dekantira otprilike u jednakoj količini u dvije plastične čaše (urinarke), čaše se poklope i skladište u zamrzivaču na temperaturi od -18 °C. Uzorci se 24 h prije liofilizacije moraju još dodatno smrznuti na -80 °C u posebnom zamrzivaču. Otklopljene uzorke se postavi na diskove liofilizatora, uređaj se poklopi i započne se s procesom liofilizacije. Sam proces liofilizacije traje 48 h, odnosno sve dok uzorak ne postigne sobnu temperaturu. Nakon liofilizacije, osušeni uzorci se staklenim štapićem skinu sa stijenka plastičnih čaša te se isti uzorci iz dvije čaše spoje u jednu vrećicu i dobro promiješaju. Tako homogenizirani uzorak se skladišti u zamrzivaču na -18 °C, a prije analiza aktivnosti β -glukanaze i fitaze su dodatno usitnjeni na mlincu za kavu na veličinu čestica manju od 0,5 mm.

3.2.2. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode

Određivanje kapaciteta zadržavanja vode (WRC – engl. *Water Retention Capacity*) provedeno je prema opisu iz rada Guzmán i sur. (2015) uz određene modifikacije, a predstavlja vodu koja ostaje vezana za hidratizirana vlakna nakon primjene vanjske sile (tlaka ili centrifuge).

Aparatura i pribor:

- 1) Plastične mikroeprovete od 2 mL
- 2) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g (Kern &Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 3) Laboratorijska žličica
- 4) Pipeta od 1000 – 5000 μ L
- 5) Vortex miješalica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)
- 6) Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)

Reagensi:

- 1) Destilirana voda

Postupak:

Najprije se zapišu odvage praznih mikroepreveta od 2 mL. Nakon toga se u mikroeprevete izvaže 300 mg nesamljevenih posija te se doda 1,5 mL destilirane vode pritom držeći mikroeprevete na vorteksu kako bi se uzorak lakše homogenizirao. Svaki uzorak se još 20 min dodatno vorteksirao jačinom od 1500 o/min. Uzorci se nakon toga stavljaju 5 min na centrifugu jačine 8000 g. Nakon završetka centrifuge, iz mikroepreveta s uzorcima se izlije supernatant, a ono što je preostalo se okrene za 180 ° kako bi se uzorci dodatno ocijedili. Tako okrenuti uzorci se ostave 10 min nakon čega se za kraj ponovno izvažu, analiza se provodi u dvije paralele za svaki uzorak, a kapacitet zadržavanja vode se izračuna prema jednadžbi:

$$WRC \% = \left(\left(\frac{m_2}{m_1} \right) \times \left(\frac{86}{100 - \% \text{ vlage}} \right) \right) \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_2 – masa konačnog gela (g)

m_1 – masa početnog uzorka (g)

3.2.3. Određivanje bubrenja u vodi

Određivanje bubrenje u vodi (WSC – engl. *Water Swelling Capacity*) provedeno je metodom opisanom u radu Raghavendra i sur. (2004).

Aparatura i pribor:

- 1) Menzura od 10 mL
- 2) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 3) Laboratorijska žlica
- 4) Pipeta 1000 – 5000 µL
- 5) Stakleni lijevak

Reagensi:

- 1) Destilirana voda

Postupak:

U staklene menzure od 10 mL se odvažuje 200 mg nesamljevenih posija te se otpipetira 10 mL destilirane vode. Uzorci se tako ostave 18 h na sobnoj temperaturi nakon čega se očitava konačni volumen taloga. Analiza se za sve uzorke provodila u dvije paralele, a bubrenje u vodi se izračuna prema jednadžbi:

$$WSC (mL g^{-1}) = \frac{V_2}{m_1} \quad [2]$$

gdje je:

V_2 – volumen konačnog taloga (mL)

m_1 – masa početnog uzorka (g)

3.2.4. Određivanje udjela vode i suhe tvari

Metoda određivanja količine vode u zobnim i ječmenim posijama definirana je Pravilnikom o metodama fizikalno – kemijske analize za žita i mlinske proizvode 28/11. Dobiveni rezultati udjela vode preračunali su se u udio suhe tvari u uzorku koji se potom koristio u izračunu ostalih dobivenih rezultata na masu suhe tvari u zobnim i ječmenim posijama.

Aparatura i pribor:

- 1) Metalne zdjelice
- 2) Sušionik ST-01/02, Instrumentaria
- 3) Eksikator sa silicagelom
- 4) Laboratorijska žlica
- 5) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g (Kern &Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)

Postupak:

Najprije se zapiše odvaga prethodno osušene, prazne metalne zdjelice s poklopcem nakon čega se izvažuje $2 \pm 0,0005$ g uzorka. Otklopljena zdjelica s uzorkom i poklopac se stave na sušenje 90 minuta u sušionik zagrijan na 130 °C. Nakon sušenja, zdjelica s uzorkom se izvadi, poklopi i stavi u eksikator na hlađenje. Nakon hlađenja, poklopljena zdjelica s uzorkom se ponovno važe. Svaki uzorak se sušio u duplikatu, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Količina vode u uzorku prikazuje se u postocima, a računata je prema jednadžbi:

$$Udio\ vode\ (\%) = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m_0} \quad [3]$$

gdje je:

m_0 = masa uzorka (g)

m_1 = masa uzorka nakon sušenja (g)

Dobiveni podaci o udjelu vode u uzorku preračunati su na udio suhe tvari u uzorku prema jednadžbi:

$$Udio\ suhe\ tvari\ (\%) = 100\% - udio\ vode\ (\%) \quad [4]$$

3.2.5. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva

Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva provedena je metodom prema Čukelj Mustač i sur. (2019).

Aparatura i pribor:

- 1) Plastične mikroeprovete 2 mL
- 2) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 3) Laboratorijska žlica
- 4) Mikropipeta od 100 – 1000 µL
- 5) Vortex miješalica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)
- 6) Ultrazvučna kupelj (Bandelin Electronic RK 100 H; Sonorex, Berlin, Njemačka)
- 7) Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)

Reagensi:

- 1) 80 %-tni etanol

Postupak:

U plastične mikroeprovete za centrifugiranje volumena 2 mL u triplikatima se izvaže točno 250 mg uzorka te se u svaki uzorak doda 1 mL 80 %-tnog etanola. Uzorci se homogeniziraju na vorteksu 10 min nakon čega se postave u ultrazvučnu kupelj na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Slijedi centrifuga u trajanju od 15 minuta pri 8000 o/min. Tako dobiveni supernatanti se dekantiraju u nove mikroeprovete volumena 2 mL,

postupak ekstrakcije se ponovi još dva puta nakon čega se supernatanti triplikata dekantiraju u jednu čistu mikropruvetu i upare pomoću dušika. Upareni uzorci skladište se u zamrzivaču pri temperaturi od -18 °C, a prije daljnjih analiza uzorak se otopi u 500 µL metanola.

3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Određivanje antioksidacijske aktivnosti provedeno je modificiranom FRAP (engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) metodom prema Belščak i sur. (2009). Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-tirazina (Fe (III)-TPTZ) u intenzivno plavi kompleks Fe (II)-TPTZ. Reakcija se odvija u prisustvu antioksidansa koji donira elektron pri pH od 3,6. Nizak pH osigurava dobru topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Promjena boje mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 593 nm, a intenzitet boje proporcionalan je redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (Benzie i Strain, 1996; Ou i sur., 2002).

Aparatura i pribor:

- 1) Pipeta 5 mL
- 2) Mikropipete 10 – 100 µL i 100 – 1000 µL
- 3) Laboratorijska čaša
- 4) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 5) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Reagensi:

- 1) Trolox (6 - hidroksi - 2,5,7,8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2) 20 mM otopina FeCl₃ x 6 H₂O (Kemika, Hrvatska)
- 3) 10 mM otopina TPTZ (2,4,6-Tris (2 piridil)-s-triazin) (Alfa-Aesar, Njemačka)
- 4) 40 mM otopina klorovodične kiseline (Panreac, Španjolska)
- 5) 300 mM otopina acetatnog pufera

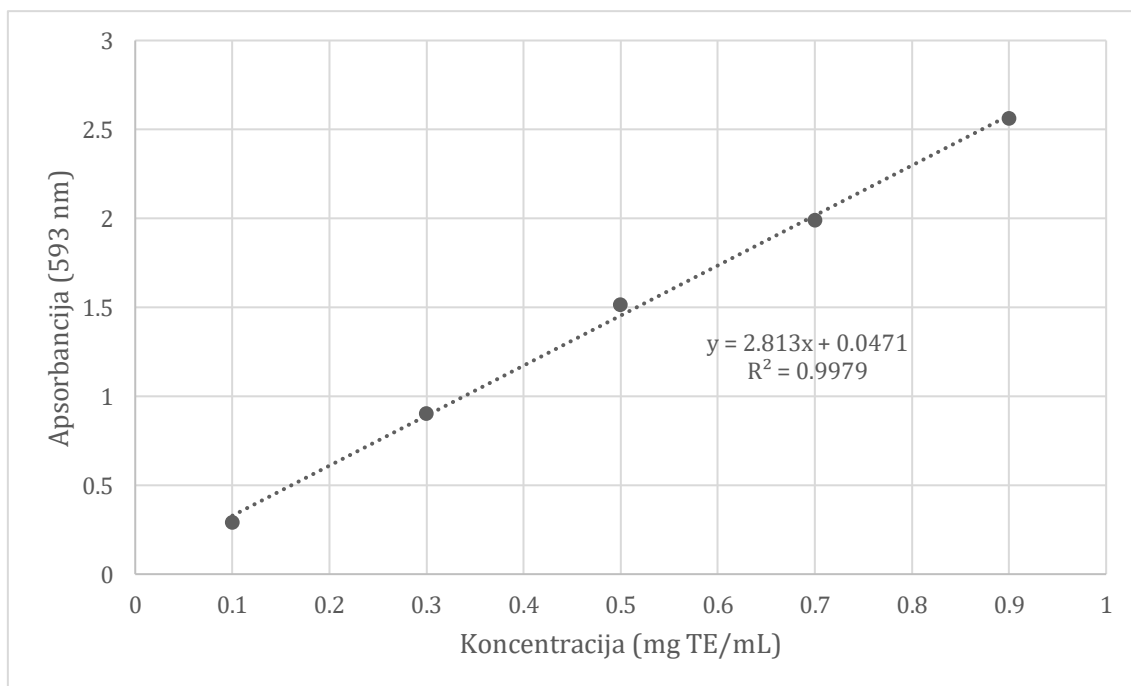
Postupak:

Najprije se pripremi FRAP reagens tako da se 2,5 mL 20 mM FeCl₃ x 6 H₂O i 2,5 mL 10 mM TPTZ u 40 mM HCl pomiješa i otopi u 25 mL 300 mM acetatnog pufera. Tako pripremljeni reagens se prije uporabe zagrije i kontinuirano održava na 37 °C. U mikrokivete

se otpipetira 20 μL ekstrahiranog uzorka otopljenom u metanolu metodom prema Čukelj Mustač i sur. (2019) i 1 mL FRAP reagensa, a osim toga za svaki uzorak pripremi se i slijepa proba gdje se umjesto uzorka otpipetira 20 μL metanola. Reakcija se pusti 4 min nakon čega se na spektrofotometru izmjeri apsorbancija otopine s uzorkom i slijepe probe prije 593 nm. Vrijednost za izračunavanje konačnog rezultata dobije se oduzimanjem apsorbancije slijepe probe od apsorbancije uzorka.

Izrada baždarnog dijagrama:

Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) je otopljen u metanolu u pet različitih koncentracija prema kojima je izrađen baždarni dijagram (Slika 7). Antioksidacijska aktivnost ispitivanog uzorka određuje se iz jednadžbe baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standardne otopine Troloxa (mg mL^{-1}). Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je u tri paralelne probe ($n=3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama u $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv. uzorka}$.



Slika 7. Baždarna krivulja za FRAP metodu

Jednadžba baždarnog pravca:

$$y = 2,813x + 0,0451$$

$$R = 0,9979$$

pri čemu je:

x – koncentracija standardne otopine Trolox (mg mL^{-1})

y – izmjerena vrijednost apsorbancije pri 593 nm

3.2.7. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC) provedeno je modificiranom Folin-Ciocalteu metodom prema Yu i sur. (2002). Ukupni fenolni spojevi određeni su prema Folin-Ciocalteu metodi temeljenoj na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s fenolima kao reducensima. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koja reagira s fenoksid ionom iz uzorka. Dolazi do oksidacijsko-redukcijske reakcije gdje fenoksid ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja odredi se na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm (Agbor i sur., 2014). Očitana apsorbancija proporcionalna je intenzitetu nastalog plavog obojenja, odnosno koncentraciji ukupnih polifenola iz uzorka (Singleton i Rossi, 1965).

Aparatura i pribor:

- 1) Mikropipete 10 – 100 μL i 100 – 1000 μL
- 2) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 3) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Reagensi:

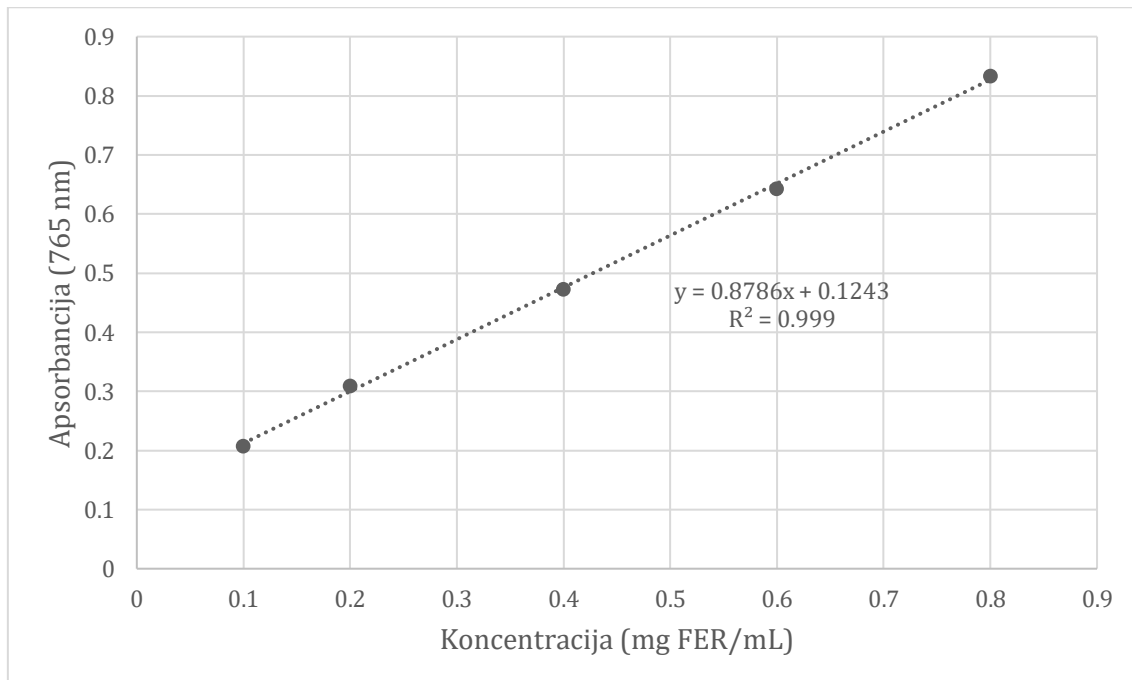
- 1) Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2) 20 %-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3) (Gram-mol, Hrvatska)

Postupak:

U mikrokivetu se otpipetira 400 μL destilirane vode, 20 μL ekstrahiranog uzorka otopljenom u metanolu metodom prema Čukelj Mustač i sur. (2019) i 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon tri minute se doda 300 μL 20%-tne otopine Na_2CO_3 i 1180 μL destilirane vode. Na kraju se mikrokiveta začepi pomoću parafilma te se sadržaj se pažljivo promiješa. Tako pripremljena reakcija mora još odstajati 2 h u mraku, na sobnoj temperaturi, nakon čega se na spektrofotometru odredi apsorbancija na valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog dijagrama:

Ferulinska kiselina (FER) je otopljena u metanolu u pet različitih koncentracija prema kojima je izrađen baždarni dijagram (Slika 8). Ukupni fenoli (TPC) ispitivanog uzorka određuju se iz jednadžbe baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standardne otopine ferulinske kiseline (mg mL^{-1}). Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom provedeno je u tri paralelne probe ($n=3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama u μmol ekvivalenta ferulinske kiseline (FER) na 100 g suhe tvari uzorka.



Slika 8. Baždarna krivulja za određivanje ukupnih slobodnih fenolnih spojeva

Jednadžba baždarnog pravca:

$$y = 0,8786x + 0,1243$$

$$R = 0,999$$

pri čemu je:

x – koncentracija ukupnih fenola (mg mL^{-1})

y – izmjerena vrijednost apsorbancije pri 765 nm

3.2.8. Određivanje fitinske kiseline (fitata) i ukupnog fosfora

Postupak određivanja fitinske kiseline (fitata) i ukupnog fosfora proveden je enzimskom metodom koju je razvio Megazyme (K-PHYT 05/19). Fitinska kiselina (mio-inozitol-1,2,3,4,5,6-heksakisofat; IP_6) pod utjecajem specifične fitaze, enzima za fitinsku kiselinu, hidrolizira na niže oblike mio-inozitol fosfata (IP_5 , IP_4 , IP_3 , IP_2) pritom oslobađajući anorganski oblik fosfora (P_i). Naknadni tretman alkalnom fosfatazom osigurava oslobađanje konačnog fosfata iz najnižeg oblika mio-inozitol fosfata (IP_1) koji je relativno otporan na djelovanje fitaze. Otpušteni anorganski oblik fosfora reagira s amonijevim molibdatom, nastaje molibdofosforna kiselina koja pod kiselim uvjetima reducira u molibden plavo. Količina nastalog molibden plavog proporcionalna je količini prisutnog anorganskog fosfora u uzorku čija se količina određuje spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 655 nm. Anorganski fosfor se kvantificira kao fosfor iz fitinske kiseline pomoću kalibracijske krivulje generirane korištenjem standarda s poznatom koncentracijom fosfora (Megazyme, 2019).

Aparatura i pribor:

- 1) Laboratorijska čaša od 100 mL
- 2) Laboratorijska žlica
- 3) Parafilm
- 4) Analitička vaga, osjetljivosti $\pm 0,0001$ g (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 5) Pipeta 1000 – 5000 μL
- 6) Mikropipeta 100 – 1000 μL
- 7) Mikroeprevete 1,5 mL

- 8) Magnetska miješalica (IKA® RT5, Staufen im Breisgau, Njemačka)
- 9) Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)
- 10) Vortex miješalica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)
- 11) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Reagensi:

- 1) Kit (Megazyme, K-PHYT 05/19)
 - boca 1 – pufer pH 5,5
 - boca 2 – suspenzija enzima fitaze
 - boca 3 – pufer pH 10,4 s $MgCl_2$, $ZnSO_4$
 - boca 4 – suspenzija enzima alkalne fosfataze
 - boca 5 – standardna otopina fosfora (50 $\mu g/mL$)
 - boca 6 – kontrolno zobeno brašno
- 2) Askorbinska kiselina (10 % w/v)
- 3) 1 M otopina H_2SO_4
- 4) Amonijev molibdat (5 % w/v)
- 5) Trikloroctena kiselina (50 % w/v)
- 6) 0,66 M otopina HCl
- 7) 0,75 M otopina NaOH
- 8) Destilirana voda

Postupak:

Ekstrakcija: Metoda započinje kiselinskom ekstrakcijom fitata iz uzorka. U staklenu čašu se izvaže $1 \pm 0,0001$ g uzorka, doda se 20 mL 0,66 M klorovodične kiseline, čaša se pokrije parafilmom i ostavi se na magnetskoj miješalici minimalno 3 h (preporuka ostaviti preko noći) na sobnoj temperaturi. Otpipetira se 1 mL tako ekstrahiranog uzorka u mikroeprevete od 1,5 mL koje se potom stave na centrifugu na 13 000 rpm-a, 10 min. U čistu mikroeprevetu (1,5 mL) se prebaci 0,5 mL dobivenog supernatanta kojeg je potrebno odmah neutralizirati dodatkom 0,5 mL 0,75M natrijevog hidroksida.

Defosforilacija: Neutralizirani uzorak se koristi u daljnjem postupku određivanja slobodnog i ukupnog fosfora. Prilikom određivanja slobodnog fosfora, u čiste mikroeprevete od 1,5 mL otpipetira se 0,62 mL destilirane vode, 0,2 mL otopine 1 (pufer), 0,05 mL

ekstrakta uzorka, dok se za određivanje ukupnog fosfora otpipetira 0,60 mL destilirane vode, 0,2 mL otopine 1 (pufer), 0,05 mL ekstrakta uzorka i najvažnije 0,02 mL suspenzije 2 (enzim fitaza). Tako pripremljene otopine se homogeniziraju na vorteks miješalicu i stave se na inkubaciju u vodenu kupelj temperature 40 °C u trajanju od 10 min. Sljedeća reakcija započinje dodatkom 0,02 mL destilirane vode i 0,2 mL otopine 3 (pufer) za slobodni fosfor, dok se za određivanje ukupnog fosfora dodaje 0,2 mL otopine 3 (pufer) i 0,02 mL suspenzije 4 (enzim alkalna fosfataza (ALP)). Otopine se ponovno homogeniziraju na vorteksu i stave u vodenu kupelj na inkubaciju u trajanju od 15 minuta pri temperaturi od 40 °C. Nakon isteka vremena reakcije se zaustavljaju dodatkom 0,3 mL trikloroctene kiseline te se mikroepruvete ponovno stave na centrifugu ($13\ 000\ \text{rpm}$, 10 min).

Kolorimetrijsko određivanje fosfora: U nove mikroepruvete se pažljivo otpipetira 1 mL supernatanta i 0,5 mL prethodno pripremljenog reagensa za obojenje, izmiješa na vorteksu i stavi u vodenu kupelj na inkubaciju u trajanju od 1 h pri temperaturi od 40 °C. Nakon isteka vremena, mikroepruvete se ponovno miješaju na vorteksu i 1 mL se prebaci u kivete gdje se unutar 3 h mora očitati apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 655 nm.

3.2.9. Određivanje aktivnosti fitaze

Postupak određivanja aktivnosti fitaze proveden je enzimskom metodom koju je razvio Megazyme, Irska, pomoću K-PHYTASE 09/21 seta. Metoda se temelji na hidrolizi fitinske kiseline pomoću enzime fitaze čime se oslobađa anorganski fosfat. Količina fosfata se kvantificira u drugoj reakciji koja se temelji na razgradnji MESG-a posredstvom enzima PNP-aze u prisutnosti slobodnog anorganskog fosfata. Ova reakcija uzrokuje pomak maksimuma apsorbancije MESG supstrata s 330 nm do 360 nm. Stopa otpuštanja fosfata izravno se odnosi na brzinu hidrolize fitinske kiseline pomoću fitaze i stoga se može koristiti za određivanje aktivnosti fitaze (Megazyme, 2021).

Aparatura i pribor:

- 1) Staklene epruvete 18 mL
- 2) Plastične mikroepruvete 1,5 mL
- 3) Laboratorijska žlica
- 4) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 5) Pipeta 1000 – 5000 μL

- 6) Mikropipete, 10 – 100 μL i 100 – 1000 μL
- 7) pH metar (JENWAY 3510, UK)
- 8) Vodena kupelj s tresilicom (SBS40, Stuart, UK)
- 9) Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)
- 10) Centrifuga Rotina 35 (Hettich, Njemačka)
- 11) Vortex miješalica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)
- 12) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Reagensi:

- 1) Kit (Megazyme, K-PHYTASE 09/21)
 - boca 1 – fitinska kiselina
 - boca 2 – stop reagens
 - boca 3 – pufer pH 7,75
 - boca 4 – otopina MESG
 - boca 5 – otopina PNP-aze
 - boca 6 – standardna otopina fitaze
- 2) Polisorbat 20 (10 % w/v)
- 3) Octena kiselina
- 4) 5 M otopina NaOH
- 5) Destilirana voda

Postupak:

Ekstrakcija: Najprije je potrebno provesti ekstrakciju uzorka. U epruvetu se odvaže $1 \pm 0,0001$ g samljevenog uzorka (veličina čestica do 0,5 mm), doda se 5 mL pufera za ekstrakciju te se uzorci intenzivno vorteksiraju 15 min na sobnoj temperaturi. Tako homogenizirani uzorak se centrifugira 10 min jačinom od 3000 g, a supernatant je potrebno dodatno odsoliti smolom za odsoljavanje,

Reakcija enzim – supstrat: U epruvetu se otpipetira 0,2 mL otopine fitinske kiseline (boca 1) te se stavi na inkubaciju u vodenu kupelj zagrijanu na 40 °C s ekstrahiranim uzorcima u zasebnim epruvetama. Nakon 5 minuta u svaku otopinom fitinske kiseline doda se 0,2 mL ekstrahiranog uzorka, takva reakcijska smjesa se intenzivno vorteksira nekoliko sekundi i ostavi 3 h u vodenoj kupelji na 40 °C. Nakon 20 min, reakcija se prekida dodatkom

stop reagensa (boca 2), ponovno se reakcijska smjesa vrlo intenzivno vorteksira. Od takve reakcijske smjese se uzme 0,1 mL alikvota za sljedeći korak. Također, za svaki uzorak se radi slijepa proba tako da se nakon inkubacije otopine fitinske kiseline doda najprije stop reagens, dobro vorteksira, nakon čega se doda ekstrakt uzorka.

Detekcija fosfata: U kivete se otpipetira 0,6 mL destilirane vode, 0,1 mL uzorka iz prethodnog koraka, 0,2 mL pufera (boca 3) te 0,1 mL MESG-a (boca 4). Za svaki uzorak potrebno je napraviti isto sa slijepom probom; umjesto 0,1 mL uzorka, pipetira se 0,1 mL slijepe probe iz prethodnog koraka. Tako pripremljena reakcijska smjesa se promućka te se očita apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 360 nm. Nakon 3 min potrebno je započeti sljedeću reakciju dodatkom 0,01 mL PNPaze (boca 5) u kivete s uzorcima i u slijepe probe nakon čega se kivete promućkaju te se nakon 20 min ponovno očita apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 360 nm.

3.2.10. Određivanje aktivnosti β -glukanaze

Postupak određivanja aktivnosti β -glukanaze proveden je enzimskom metodom koju je razvio Megazyme, Irska, pomoću K-MBG4 08/18 seta uz modifikaciju postupka ekstrakcije. Endo – 1,3-1,4 – β -glukanaza je enzim odgovoran za razgradnju β -glukana koji se nalaze u staničnim stijenkama žitarica. Odgovoran je za hidrolizu β -(1,4)-glikozidnih veza koje nose β -(1,3)-vezan glukozilni ostatak na nereduktivnoj strani. U ovoj reakciji kao supstrat β -glukanazi koristi se BCNPBG4 te se mjeri brzina otpuštanja CNP-a koja je izravno povezana s brzinom hidrolize BCNPBG4. Reakcija se zaustavlja stop reagensom (otopina tris pufera) čime se razvija boja koja se spektrofotometrijski mjeri na valnoj duljini od 400 nm.

Aparatura i pribor:

- 1) Staklene epruvete 18 mL
- 2) Plastične mikroeprevete 1,5 mL
- 3) Laboratorijska žlica
- 4) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 5) Pipeta 1000 – 5000 μ L
- 6) Mikropipete, 10 – 100 μ L i 100 – 1000 μ L
- 7) pH metar (JENWAY 3510, UK)
- 8) Vodena kupelj s tresilicom (SBS40, Stuart, UK)

- 9) Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)
- 10) Vortex miješalica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)
- 11) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Reagensi:

- 1) Kit (Megazyme, K-MGBL 03/11)
 - boca 1 – 4,6-O-benziliden-2-kloro-4-nitrofenil- β -(3- β -D-celotriozil-glukoza) (BCNPBG4)
 - boca 2 – sladno brašno sa standardiziranom aktivnošću β -glukanaze
- 2) 100 mM otopina natrijev acetatnog pufera pH 4,5 (pufer za ekstrakciju)
- 3) Tris pufer pH 10 (2% w/v)

Postupak:

Najprije je potrebno provesti ekstrakciju uzorka. U epruvete se odvažuje 0,5 g uzorka, doda se 8 mL pufera za ekstrakciju i 15 minuta se uzorak intenzivno vorteksira na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci se centrifugiraju 50 min pri 3000 g. Nakon provedene centrifuge supernatanti uzoraka se koriste u daljnjem postupku.

Za analizu aktivnosti β -glukanaze, u epruvetu se otpipetira 0,1 mL otopine BCNPBG4 te se stavi na inkubaciju u vodenu kupelj zagrijanu na 30 °C s ekstrahiranim uzorcima u zasebnim epruvetama. Nakon 3 minute u svaku epruvetu s BCNPBG4 doda se 0,5 mL ekstrahiranog uzorka, takva reakcijska smjesa se intenzivno vorteksira nekoliko sekundi i ostavi 20 min u vodenoj kupelji na 30 °C. Nakon 20 min, reakcija se prekida dodatkom 0,9 mL stop reagensa (tris pufer), ponovno se reakcijska smjesa vrlo intenzivno vorteksira te se vadi van iz vodene kupelji. Također, za svaki uzorak se radi slijepa proba tako da se nakon inkubacije BCNPBG4 doda najprije stop reagens, dobro se vorteksira, nakon čega se doda ekstrakt uzorka. Otopine uzoraka i slijepih proba otpipetiraju se u kivete kojima se spektrofotometrijski odredi apsorbancija na 400 nm.

3.2.11. Izrada tankog kruha

Pečenje tankog kruha provedeno je prema recepturi za jednoslojni tanak kruh koji prolazi kroz proces fermentacije s kvascem. Pripremljen je tanak kruh s 85 % brašna tip 850 te 15 % brašna tip 550 bez dodanih posija kao kontrola (TK-K), te tanak kruh s dodanih 10 %

netretiranih zobnih posija na masu brašna (TK-ZP) kao i tanak kruh s 10 % netretiranih ječmenih posija na masu brašna (TK-JP). Za određivanje količine vode koju je potrebno staviti u zamjes koristio se farinograf (Brabender, Njemačka). Za kontrolni kruh i za kruh s dodanim ječmenim posijama bilo je potrebno staviti 60 % vode na masu brašna, a za tanak kruh s dodanim zobnim posijama 61 % vode na masu brašna kako bi se postigla konzistencija od 500 BU. Ostali sastojci i dodane količine sastojaka prikazani su u tablici 3. Svaka vrsta tankog kruha pripremljena je u 5 paralela.

Aparatura i pribor:

- 1) Farinograf (Brabender, Njemačka)
- 2) Mikser (Diosna, Njemačka)
- 3) Peć (Werner&Pfleiderer GmbH, Njemačka)
- 4) Laboratorijska vaga (Kern, Njemačka)
- 5) Laboratorijska žlica
- 6) Posude za vaganje
- 7) Valjak

Tablica 3. Receptura tankog kruha

Sastojci	TK-K	TK-ZP	TK-JP
Brašno tip 850 (g)	627,72	587,90	591,30
Brašno tip 550 (g)	110,76	103,75	104,35
Zobene posije (g)	/	69,16	/
Ječmene posije (g)	/	/	69,57
Voda (g)	443,04	421,90	417,39
Kamena sol (g)	11,04	10,37	10,43
Instant kvasac (g)	7,44	6,92	6,96

Prije početka miješanja potrebno je provjeriti temperature sastojaka, odnosno temperature zraka, brašna i vode zajedno moraju biti 50 °C. Nakon toga se voda, brašno i kvasac stave u mikser i započne se s miješanjem. Prvo se 2 minute miješa sporijom brzinom te se 10 sekundi prije kraja se doda sol, potom slijedi 7 minuta miješanja većom brzinom. Na kraju miješanja tijesto 15 minuta fermentira u masi, zatim se podijeli na pet jednakih komada

od 185 g te se ponovno ostavi na fermentaciji na 25 °C pri uvjetima relativne vlažnosti od 80 % otprilike sat vremena, odnosno dok se volumen ne udvostruči. Nakon fermentacije, komadi tijesta se valjaju te se probuše rupice kako ne bi došlo do odvajanja slojeva i nastanka džepova zraka. Tanki kruh se peče na temperaturi od 260 °C 2 minute s jedne i 2 minute s druge strane.

3.2.12. Određivanje fizikalnih svojstava tankog kruha

Sva mjerenja su provedena na pet komada svake vrste tankog kruha, a konačni rezultat prikazan je kao srednja vrijednost mjerenog parametra s pripadajućim standardnim devijacijama.

3.2.12.1. Mjerenje boje

Određivanje boje pečenog tankog kruha provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom pri čemu su dobivene L^* , a^* i b^* vrijednosti, a nelinearni odnosi za L^* , a^* i b^* vrijednosti imitiraju logaritamski odgovor ljudskog oka. Naime, ljudsko oko ima receptore za kratke (S), srednje (M) i duge (L) valne duljine koji su poznati kao plavi, zeleni i crveni receptori. Sukladno tome, L^* vrijednost je osvjetljenje ili svjetlosna komponenta, koja ima vrijednosti u rasponu 1 – 100, dok su a^* (od zelene do crvene) i b^* (od plave do žute) dvije kromatske vrijednosti u rasponu od - 120 do 120 (Gökmen i Sügüt, 2007).

Aparatura i pribor:

- 1) Kolorimetar (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan)

Postupak:

U uzorcima pečenog tankog kruha sa i bez dodanih zobnih i ječmenih posija izmjerena je boja na četiri mjesta s obje strane od čega je izračunata srednja vrijednost radi jednostavnijeg prikazivanja rezultata, te pripadajuća standardna devijacija. Područje mjerenja podešeno je na 400 do 700 nm, što odgovara vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra.

3.2.12.2. Mjerenje promjera, mase i volumena

Aparatura i pribor:

- 1) Ravnalo
- 2) Kaliper
- 3) Vaga (Kern, Njemačka)

- 4) Menzura
- 5) Posuda za mjerenje volumena
- 6) Sjemenke uljane repice

Postupak:

Na pet komada svake vrste tankog kruha izmjerena je promjer pomoću ravnala u dva smjera te debljina na četiri različita mjesta od čega je uzeta srednja vrijednost i pripadajuće standardne devijacije. Dobivene vrijednosti debljine i promjera koriste se kako bi se izrazio oblik prema jednadžbi:

$$Oblik = \frac{d}{h} \quad [5]$$

gdje je:

d – promjer (cm)

h – debljina (cm)

Mjerena je masa tijesta prije pečenja te masa ohlađenog tankog kruha 1 h nakon pečenja. Dobivene vrijednosti su korištene za izračun gubitka mase pečenjem (BL – engl. *baking loss*) prema jednadžbi:

$$BL (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad [6]$$

gdje je:

m_1 – masa prije pečenja (g)

m_2 – masa poslije pečenja (g)

Volumen je izmjerena po principu Arhimedova zakona prema standardnoj metodi AACC 10-05.01; u praznu posudu se konstantnim protokom ispuste sjemenke uljane repice, posuda se popuni cijelim svojim volumenom te se izravna površina na vrhu kako bi se odstranio višak sjemenki. Nakon toga, sjemenke se uklone iz posude, u posudu se postavi kruh te se ponovno konstantnim protokom posuda napuni sjemenkama. Ponovno se izravna površina na vrhu te se odstranjeni višak prebaci u menzuru gdje se očita volumen koji odgovara volumenu kruha. Također je izmjerena masa ohlađenog tankog kruha 1 h nakon pečenja. Dobivene vrijednosti volumena i mase korištene su za izračun specifičnog volumena prema jednadžbi:

$$V_{sp}(\text{mL g}^{-1}) = \frac{V}{m} \quad [7]$$

gdje je:

V – volumen tankog kruha (mL)

m – masa tankog kruha (g)

3.2.12.3. Mjerenje teksture

Aparatura i pribor:

- 1) Teksturometar (Llyod Instruments)

Postupak:

Na teksturometru je provedena analiza profila teksture (TPA – engl. *Texture Profile Analysis*) kojom se provodi dvostruka kompresija tankog kruha 1 h nakon pečenja. Pečeni tanki kruh se postavi na podlogu iznad koje je sonda promjera 5,5 cm. Sonda pritišće uzorak do 50 % visine tankog kruha brzinom od 2 mm s^{-1} dva puta s razmakom od 30 s između svake kompresije. Izračunava se tvrdoća (N), kohezivnost, žvakljivost (Nmm) i rezilijencija. Tvrdoća predstavlja silu koja je potrebna da se postigne određena deformacija, kohezivnost opisuje koliko dobro proizvod prijanja sam za sebe pod tlačnim ili vlačnim naprezanjem, primjerice kruh je kohezivan kad mu se mazanjem hladnog maslaca ne narušava tekstura. Žvakljivost se može definirati kao energija koja je potrebna za žvakanje čvrste hrane do razine povoljne za gutanje, a rezilijencija se može opisati kao otpornost, odnosno koliko se dobro kruh "bori" da povrati svoju izvornu visinu (Texture Technologies, 2022).

3.2.13. Obrada podataka

Za izračun podataka u tablicama i grafovima korišten je Microsoft Office Excel 365. Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka korištena je analiza varijance (ANOVA), s Tukey post-hoc testom pomoću programa Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrijednost $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na fizikalno – kemijska svojstva 15 %-tne suspenzije zobnih i ječmenih posija ovisno o utrošku specifične energije ultrazvuka (100 J mL^{-1} i 250 J mL^{-1}) te radnom ciklusu, odnosno primjeni kontinuirane obrade i pulsirajuće obrade u trajanju od 5 sekundi s 10 sekundi pauze između obrade. Tijekom ultrazvučne obrade posija praćena je promjena temperature, a u tablici 4 prikazana je maksimalna temperatura dostignuta tijekom ultrazvučne obrade, te vrijeme trajanja tretmana. Određen je udio vode za sve uzorke koji se koristio u izračunima. Određen je kapacitet zadržavanja vode prikazan na slici 10 te sposobnost bubrenja u vodi na slici 11. Nakon ekstrakcije slobodnih spojeva, određena je koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (TPC; Slika 12) i antioksidacijski kapacitet FRAP metodom (Slika 13). Određena je koncentracija fitata (Slika 14) te aktivnost enzima fitaze (Slika 15) i β -glukanaze (Slika 16). Također, određena su fizikalna svojstva jednoslojnih tankih kruhova s dodanim netretiranim zobnim posijama (10 % na masu brašna) te netretiranim ječmenim posijama (10 % na masu brašna) i to boja, gubitak mase prilikom pečenja, omjer širenja, specifični volumen u tablici 5 te tekstura prikazana u tablici 6.

4.1. ULTRAZVUČNA OBRADA POSIJA

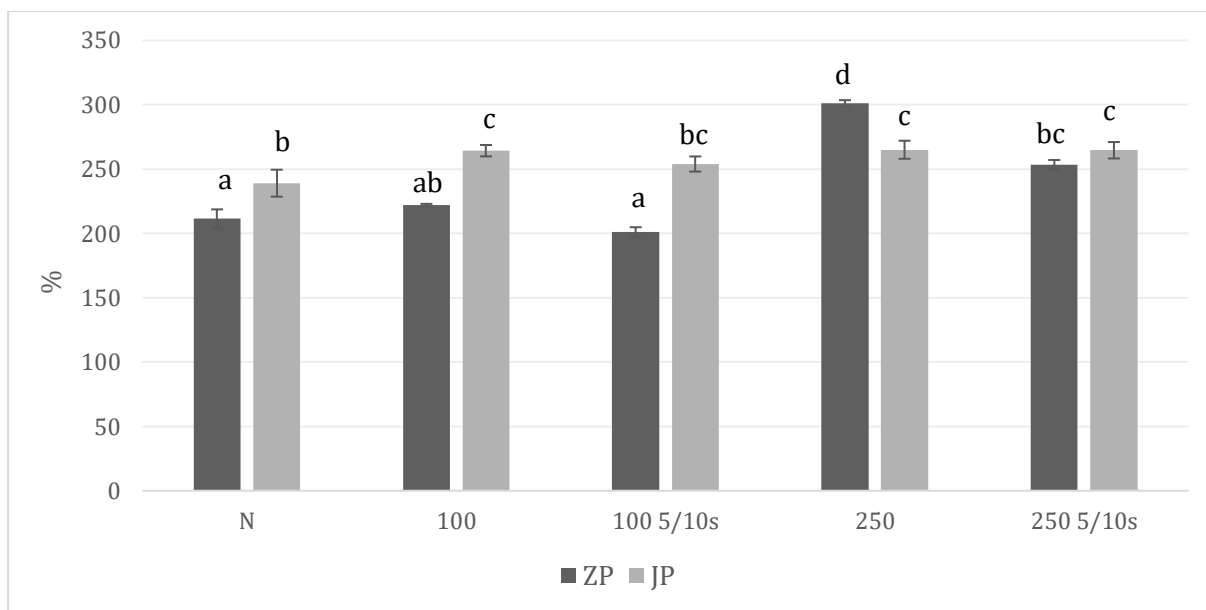
U tablici 4 su prikazane vrijednosti temperatura 15 %-tnih suspenzija zobnih i ječmenih posija na početku i na kraju obrade ultrazvukom visokog intenziteta konstantne snage, frekvencije i amplitude (400 W, 24 kHz, 100 %) te vrijeme trajanja pojedinog tretmana ovisno o utrošku energije (100 J mL^{-1} i 250 J mL^{-1}) i načinu obrade (kontinuirani i pulsirajući tretman). Vidljivo je kako kod kontinuiranog tretmana primjena veće energije od 250 J mL^{-1} uzrokuje porast temperature za oko $42 \text{ }^\circ\text{C}$, znatno više nego primjenom 100 J mL^{-1} gdje temperatura u prosjeku poraste za $17 \text{ }^\circ\text{C}$. Također, pulsirajući tretman za uzorke s većim utroškom energije u prosjeku smanji porast temperature za $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 4. Vrijeme trajanja tretmana ultrazvukom visokog intenziteta i maksimalna vrijednost temperature 15 %-tnih suspenzija zobnih i ječmenih posija

Oznaka uzorka	Vrijeme tretmana (min)	Početna vrijednost temperature ($^\circ\text{C}$)	Konačna vrijednost temperature ($^\circ\text{C}$)
ZP100	2,78	21,5	38,5
ZP100 5/10s	7,54	24,5	41
ZP250	7,50	23	65
ZP250 5/10s	20,14	25	60
JP100	2,76	22,5	40
JP100 5/10s	8,16	23	40
JP250	7,85	21,5	65
JP250 5/10s	21,16	23,5	59,5

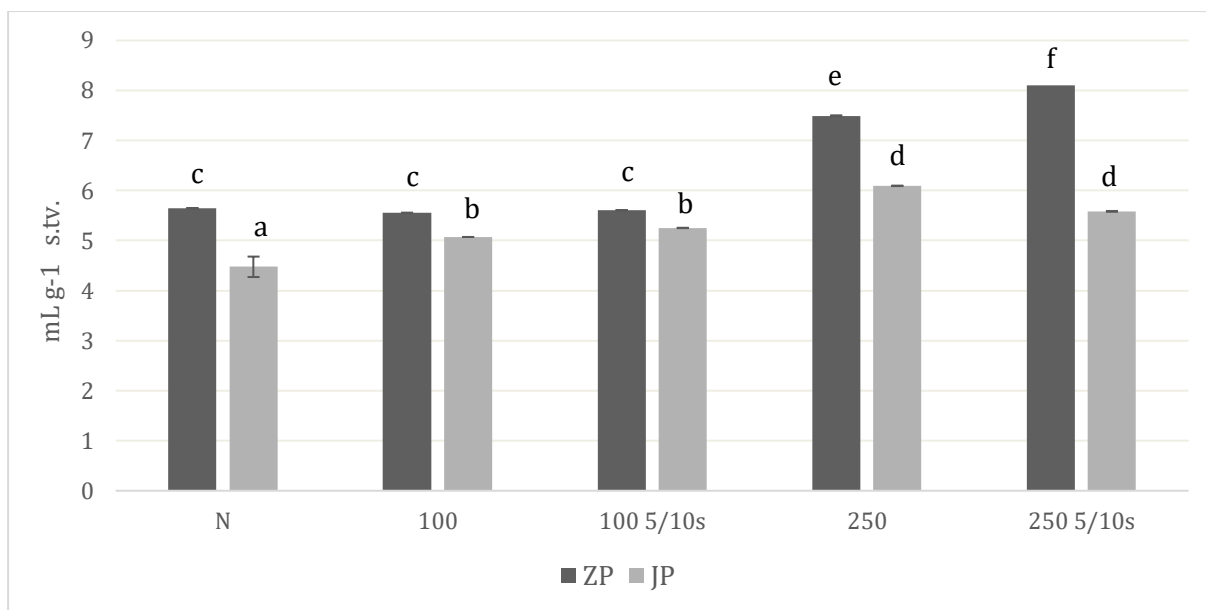
4.2. KAPACITET ZADRŽAVANJA VODE I BUBRENJE U VODI

Uzorcima posija određen je kapacitet zadržavanja vode koji je definiran kao voda koja ostaje vezana za hidrirana vlakna nakon primjene vanjske sile (tlaka ili centrifuge) te sposobnost bubrenja u vodi. Navedeni postupci su zbog mogućnosti usporedbe provedeni na nativnim i tretiranim uzorcima zobnih i ječmenih posija.



Slika 10. Kapacitet zadržavanja vode (%) u uzorcima zobenih i ječmenih posija pri različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (100, 250 – utrošak energije po volumenu uzorka; 5/10s – pulsirajući tretman) u odnosu na nativni uzorak (N). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Na slici 10 prikazane su vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode zobenih i ječmenih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na netretirane uzorke. Nativne ječmene posije imale su veći kapacitet zadržavanja vode od zobenih posija. Nakon ultrazvučne obrade kapacitet zadržavanja vode raste ovisno o vrsti posija i primijenjenoj energiji. Do značajnog porasta kapaciteta vezanja vode zobenih posija dolazi tek kod obrade ultrazvukom pri energiji od 250 J mL^{-1} , dok kod ječmenih posija kapacitet raste već kod primjene energije od 100 J mL^{-1} bez pauze, slično kao i kod 250 J mL^{-1} sa i bez pauze. Ti rezultati su u skladu s prethodno provedenim istraživanjima ultrazvučne obrade posija prosa gdje je također došlo do povećanja kapaciteta zadržavanja vode (Wei i sur. 2022; Čukelj Mustač i sur. 2019). Do povećanja kapaciteta vezanja vode tijekom ultrazvučnog tretmana dolazi zbog narušavanja mrežaste strukture prehrambenih vlakana. Naime, mehanički udari izazvani implozijom kavitacijskih mjehurića uzrokuju oštećenje stanica, shodno tome dolazi do povećanja specifične površine, hidrofilne grupe budu izloženije što u konačnici uzrokuje povećanje vezanja vode na prehrambena vlakna (Nui i sur., 2020).



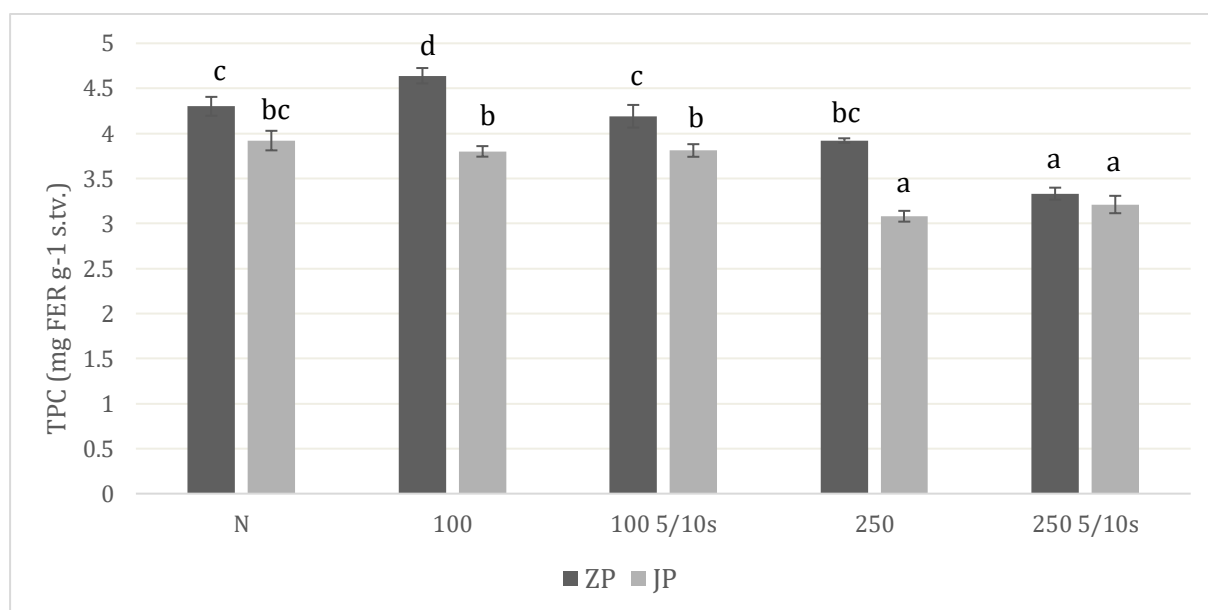
Slika 11. Bubrenje u vodi (mL g⁻¹ s.tv.) u uzorcima zobenih i ječmenih posija pri različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (100, 250 – utrošak energije po volumenu uzorka; 5/10s – pulsirajući tretman) u odnosu na nativni uzorak (N). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Iz slike 11 u kojoj su prikazane vrijednosti bubrenja zobenih i ječmenih posije vidljivo je da nativne zobene posije više bubre u vodi od ječmenih. Povećanje sposobnosti bubrenja slijedilo je sličan trend kao i povećanje sposobnosti zadržavanja vode i ovisilo je o vrsti posija i primijenjenoj energiji. Sposobnost bubrenja se povećala u svim uzorcima nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na netretirani nativni uzorak, osim za uzorke ZP100 i ZP100 5/10s. Najveće povećanje vrijednosti bubrenja u odnosu na kontrolni uzorak pokazale su zobene posije tretirane energijom od 250 J mL⁻¹ s pauzom, dok je za ječmene posije to uzorak s jednim utroškom energije, ali bez pauze. Takvi rezultati povećanja vrijednosti bubrenja u vodi su u skladu s prethodnim istraživanjem koje su proveli Habuš i sur. (2020a) gdje su se pšenične posije tretirale ultrazvukom. Pojačano bubrenje posija u vodi može biti posljedica porasta temperature do koje dolazi tijekom tretmana ultrazvukom. Prema Elleuch i sur. (2011) porast temperature rezultira povećanjem hidratacijskih svojstava prehrambenih vlakana. Takvo povećanje vezanja vode i bubrenja nije poželjno za posije koje su namijenjene pekarskim proizvodima jer se time otežava izrada zamjesa te se u konačnici mijenjaju karakteristike pečenog proizvoda (Čukelj Mustač i sur., 2019), međutim prehrambena vlakna ispoljavaju bolja funkcionalna svojstva nakon konzumacije ako mogu

bolje zadržavati vodu ili bubriti jer time imaju veću sposobnost smanjenja razine kolesterola i glukoze u krvi (Wei i sur., 2022; Elleuch i sur., 2011).

4.3. UDIO UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

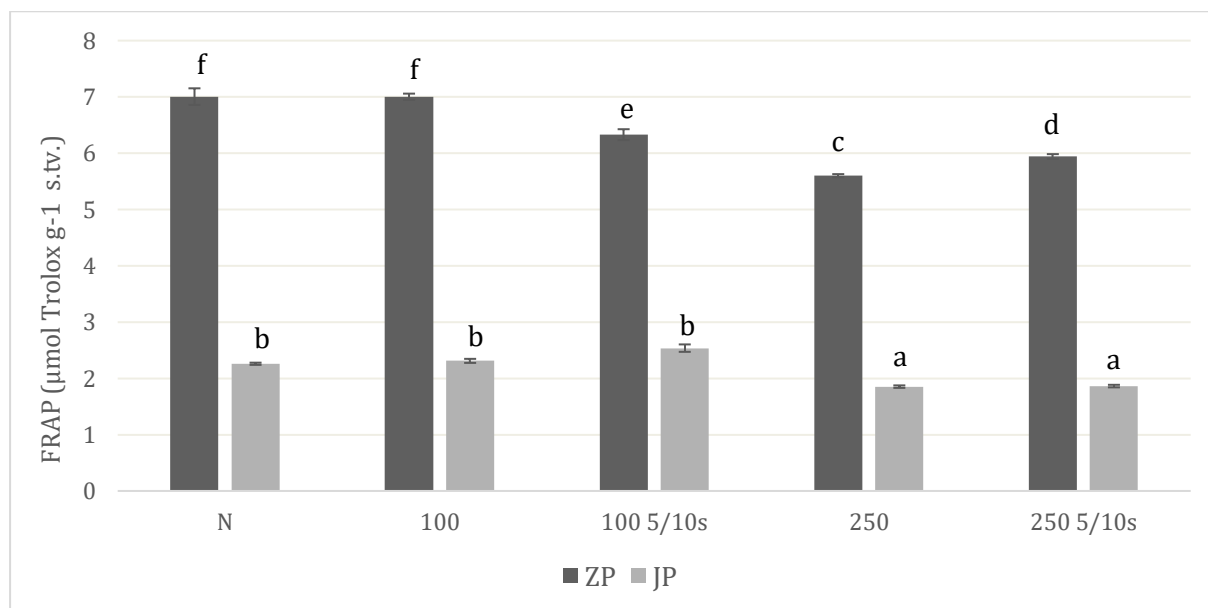
Na slici 12 prikazan je udio ukupnih polifenola (TPC) u zobnim i ječmenim posijama tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana određen Folin-Ciocalteu metodom, a na slici 13 njihova antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom te su uspoređeni s nativnim zobnim i ječmenim posijama.



Slika 12. Udjel ukupnih polifenola ($\mu\text{mol FER g}^{-1}$ s.tv.) u uzorcima zobnih i ječmenih posija pri različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (100, 250 – utrošak energije po volumenu uzorka; 5/10s – pulsirajući tretman) u odnosu na native posije (N). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Iz slike 12 vidljivo je kako je koncentracija ukupnih polifenola bila slična u uzorcima nativnih zobnih i ječmenih posija. Nakon tretmana ultrazvukom specifičnom energijom od 100 J mL^{-1} koncentracija polifenola u posijama je ostala nepromijenjena osim za uzorak ZP100 gdje je koncentracija porasla u usporedbi s netretiranim uzorkom. Porast koncentracije ukupnih fenola od 8 % u tom uzorku se može objasniti olakšanom ekstrakcijom do koje dolazi primjenom ultrazvuka. Naime, ako se primjene optimalni uvjeti ultrazvučne obrade poput koncentracije, temperature, vremena obrade, snage ultrazvuka i sl., može doći do olakšane ekstrakcije i posljedično povećanja koncentracije ukupnih fenola (Tabaraki i

Nateghi, 2011; Wang i sur., 2008). Nakon ultrazvučne obrade energijom od 250 J mL^{-1} koncentracija polifenola se smanjuje za oko 20 % u odnosu na native uzorke, osim za uzorak ZP250 koji se statistički značajno ne mijenja. Vjerojatno je zbog previsoke temperature i vremenski predugog tretmana koji su razorili molekularnu strukturu polifenola njihova koncentracija manja u odnosu na netretirani uzorak. Slično smanjenje koncentracije polifenola u uzrocima posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta zabilježeno je i u istraživanju koje su proveli Habuš i sur. (2021a), te Niu i sur. (2014).

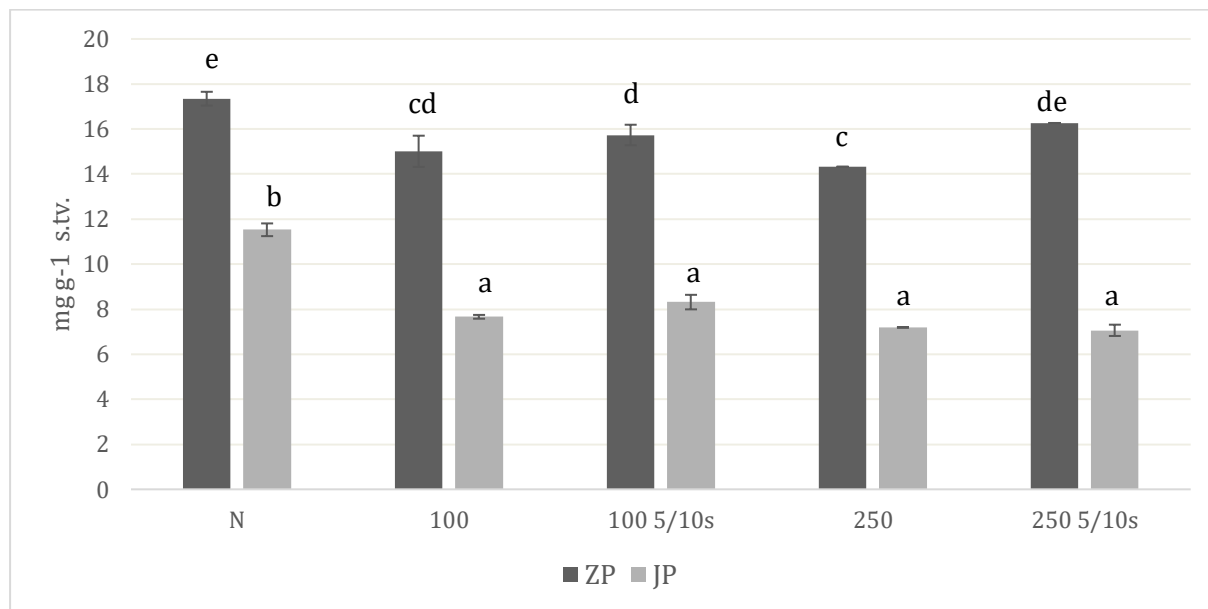


Slika 13. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.}$) određena FRAP metodom u uzorcima zobnih i ječmenih posija pri različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (100, 250 – utrošak energije po volumenu uzorka, 5/10s – pulsirajući tretman) u odnosu na native posije (N). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Iz slike 13 vidljivo je kako zobne posije pokazuju oko 3 puta veću antioksidacijsku aktivnost od ječmenih posija iako koncentracija ukupnih fenola nije bila bitno različita (slika 12). To se može prepisati avenantramidima, skupini fenolnih alkaloida koji su prisutni isključivo u zobi, a pokazuju izuzetno visoku antioksidacijsku aktivnost, čak 10 – 30 puta veću nego drugi fenolni spojevi (Dimberg i sur., 1992). Poput ukupnih polifenola, antioksidacijska aktivnost se također smanjuje primjenom ultrazvuka visokog intenziteta specifične energije 250 J mL^{-1} , ali i kod ZP100. Pad antioksidacijske aktivnosti posija uslijed ultrazvučne obrade zabilježili su Habuš i sur. (2020a) u svom istraživanju gdje se pratio utjecaj ultrazvuka na pšenične posije.

4.4. KONCENTRACIJA FITATA

Na slici 14 prikazana je koncentracija fitata u zobenim i ječmenim posijama pri različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u usporedbi s nativnim zobenim i ječmenim posijama.



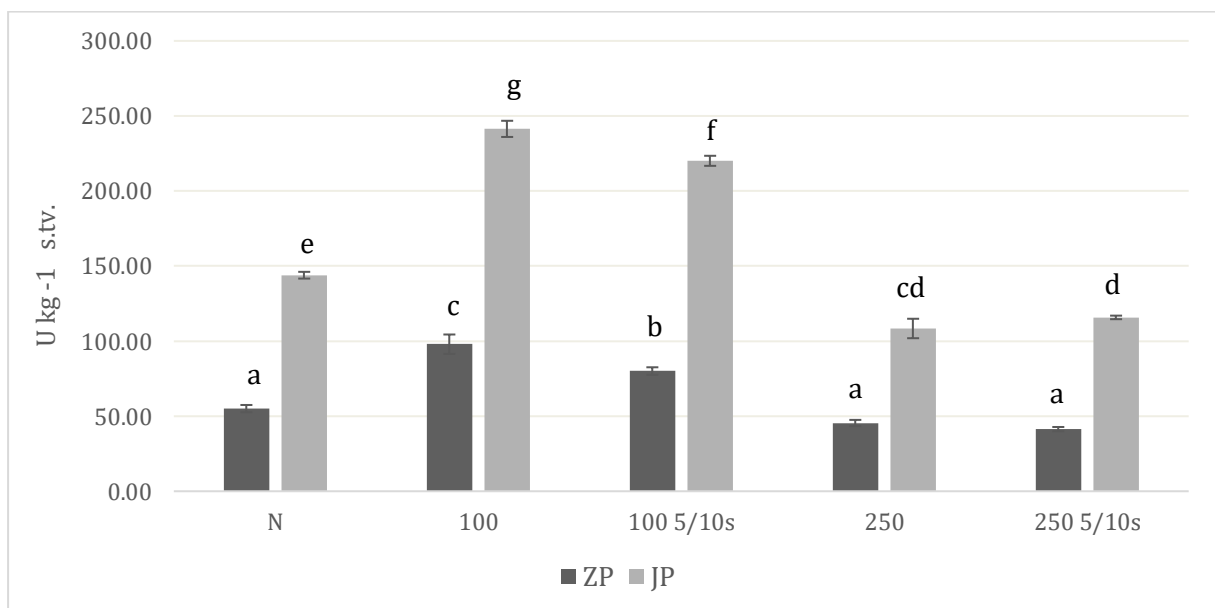
Slika 14. Koncentracija fitata (mg g^{-1} s.tv.) u uzorcima zobenih i ječmenih posija pri različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (100, 250 – utrošak energije po volumenu uzorka, 5/10s – pulsirajući tretman) u odnosu na nativni uzorak (N). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Iz slike 14 vidljivo je kako native zobene posije imaju veću koncentraciju fitata od ječmenih te kako ultrazvučna obrada utječe na smanjenje njihove koncentracije ovisno o tipu posija. Od zobenih posije uzorak ZP250 pokazuje najnižu koncentraciju fitata, a kod ječmenih posija koncentracija fitata u odnosu na netretirani uzorak se smanjuje već kod uzorka JP100 te dalje statistički nema značajnije promjene. Smanjenje koncentracije fitata u posijama pod utjecajem ultrazvuka zabilježili su i Mohammadi i sur. (2020) koji su istraživali utjecaj ultrazvuka na rižine posije. Također Ertas (2013) u svom radu koji istražuje različite načine smanjenja koncentracija fitata u sjemenkama mahunarki i žitarica te bilježi kako, uz mikrovalni tretman, i ultrazvuk s primijenjenim različitim temperaturama utječe na smanjenje fitata. Štoviše, ultrazvučni tretman pri temperaturi od $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ izazvao je veće smanjenje koncentracije fitata u usporedbi s ultrazvučnim tretmanom pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. U ovom radu su različiti utrošci ultrazvučne energije rezultirali i različitom temperaturom tretmana; najveći utrošak

energije od 250 J mL^{-1} kontinuiranom obradom uzrokovao je najveće povećanje temperature do čak $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Koncentracija fitata je i za zobene i ječmene posije najniža upravo u tim uzorcima (ZP250 i JP250). Osim tretmana ultrazvukom, bitan faktor prilikom smanjenja koncentracije fitata je i proces namakanja; naime fitinska kiselina je topiva u vodi radi čega ju je moguće tako ukloniti iz uzorka (Egli i sur., 2002). U ovom radu su uzorci namočeni u vodi u obliku 15 %-tne suspenzije, a trajanje namakanja ovisilo je o tipu tretmana i utrošenoj energiji. Za uzorke ZP100 i JP100 tretman je trajao skoro 3 minute, uzorci ZP100 5/10s, JP100 5/10s, ZP250 te JP250 su tretirani oko 8 minuta dok je na uzorcima ZP250 5/10s i JP250 5/10s primijenjen najdulji tretman od preko 20 minuta. Prema rezultatima vidljivo je kako su dostignuta temperatura i utrošena energije imali veći utjecaj na smanjenje koncentracije fitata u tretiranim uzorcima zobenih i ječmenih posija od vremena namakanja. Također, sukladno navodima u literaturi (Reddy i Sathe, 2001), rezultati ovog istraživanja pokazuju kako zobene posije sadrže veću koncentraciju fitata od ječmenih posija.

4.5. AKTIVNOST FITAZE

Na slici 15 prikazana je aktivnost fitaze u zobenim i ječmenim posijama tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana, kao i na nativnom uzorku zobenih i ječmenih posija. Fitaza je enzim koji sudjeluje u hidrolizi soli fitinske kiseline pritom oslobađajući anorganski fosfat. Time se također povećava biodostupnost minerala vezanih na fitinsku kiselinu stoga je aktivacija fitaze u posijama poželjna.

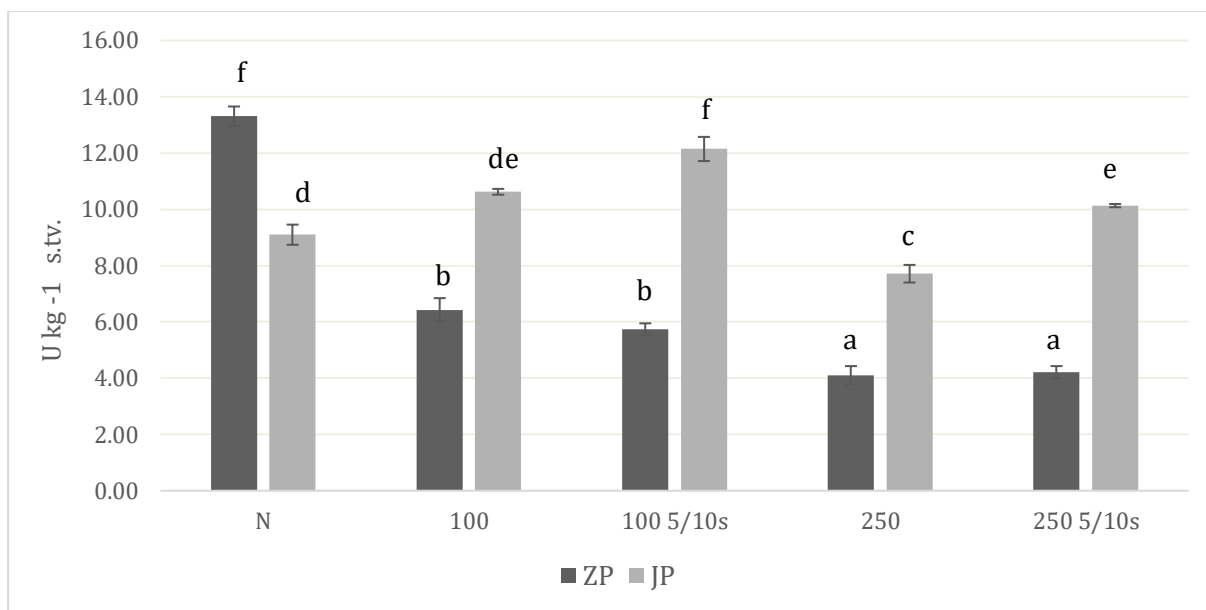


Slika 15. Aktivnost fitaze ($\text{U kg}^{-1} \text{ s.tv.}$) u uzorcima zobenih i ječmenih posija pri različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (100, 250 – utrošak energije po volumenu uzorka, 5/10s – pulsirajući tretman) u odnosu na nativni uzorak (N). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Iz slike 15 vidljivo je prije svega kako je enzimska aktivnost fitaze u netretiranom i svim tretiranim uzorcima veća u ječmenim u odnosu na zobene posije. Također, najveći porast aktivnost fitaze od čak 40 % zabilježen je u uzorcima zobenih i ječmenih posija s utroškom energije od 100 J mL^{-1} . Pulsirajući tretman (ZP100 5/10s i JP100 5/10s) rezultira manjim povećanjem aktivnosti u odnosu na kontinuirani tretman, otprilike 32 %. Primjenom ultrazvuka veće energije (250 J mL^{-1}) aktivnost fitaze u ječmenim posijama se smanjuje, a u zobenim posijama vraća na jednaku razinu kao i kod nativnih posija. Može se zaključiti kako se aktivnost fitaze može povećati ultrazvučnom obradom pri utrošku energije od svega 100 J mL^{-1} , a način obrade je također utjecao na povećanje aktivnosti; naime, kontinuiranim tretmanom koji traje kraće od pulsirajućeg tretmana fitaza se više aktivirala.

4.5. AKTIVNOST β -GLUKANAZE

Na slici 16 prikazana je aktivnost β -glukanaze u zobenim i ječmenim posijama tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana, kao i na nativnom uzorku zobenih i ječmenih posija. β -glukanaza je enzim koji hidrolitički cijepa glikozidne u molekuli β -glukana čime se molekulska masa β -glukana smanjuje. β -glukani male molekulske mase ne ispoljavaju toliko pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje stoga je cilj inaktivirati aktivnost β -glukanaze kako bi struktura β -glukana ostala što više sačuvana.

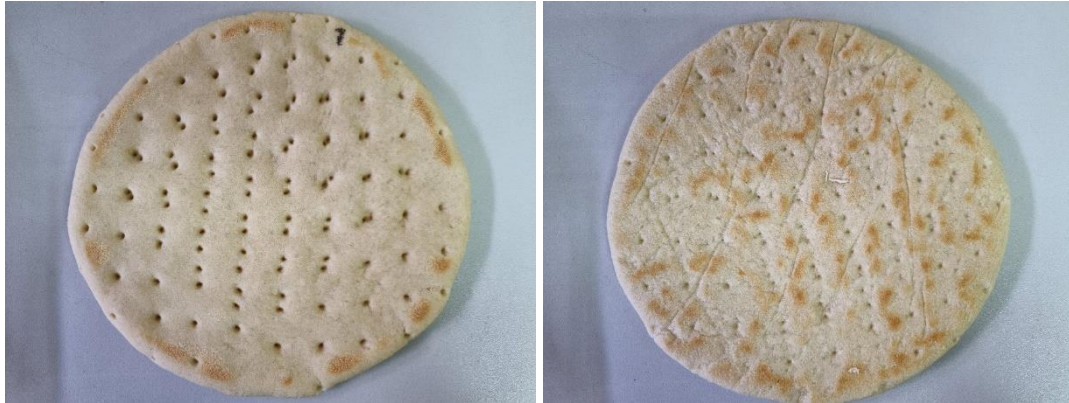


Slika 16. Aktivnost β -glukanaze ($\text{U kg}^{-1} \text{ s.tv.}$) u uzorcima zobenih i ječmenih posija pri različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (100, 250 – utrošak energije po volumenu uzorka, 5/10s – pulsirajući tretman) u odnosu na nativni uzorak (N). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

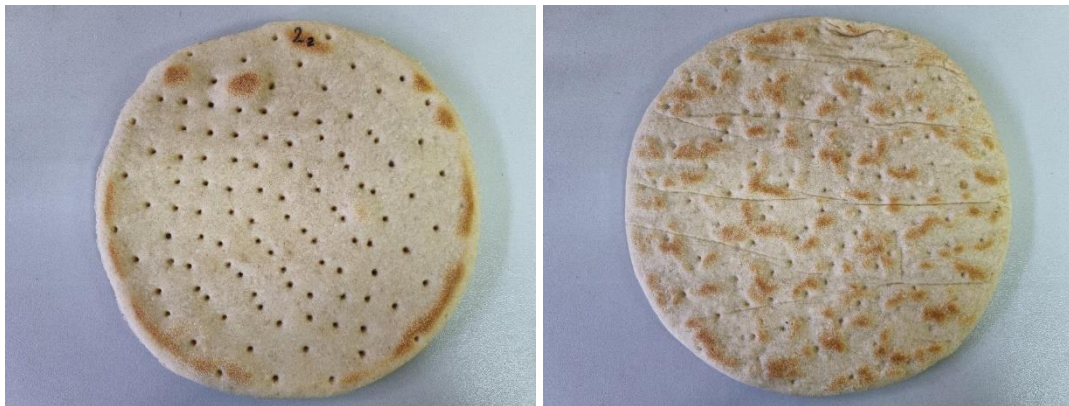
Kod netretiranih uzoraka zobene posije pokazuju veću enzimsku aktivnost β -glukanaze u odnosu na ječmene posije, međutim situacija je obrnuta za sve tretirane uzorke gdje ječmene posije pokazuju veću enzimsku aktivnost β -glukanaze u odnosu na zobene posije. Dakle tretman ultrazvukom visokog intenziteta ima različit utjecaj na enzimsku aktivnost β -glukanaze ovisno o tipu posija; zobenim posijama aktivnost se smanjuje već pri utrošku energije od 100 J mL^{-1} , a još manju aktivnost imaju posije obrađene s 250 J mL^{-1} . Ovisno o načinu rada ultrazvuka nema statistički značajne razlike. Ječmenim posijama aktivnost β -glukanaze uglavnom raste te kod uzorka JP100 5/10s postiže najveću aktivnost. Jedino kod uzorka JP250 zabilježen je pad i ujedno najniža aktivnost β -glukanaze za ječmene posije. Prema rezultatima se vidi kako jednaki uvjeti ultrazvuka drugačije utječu na aktivnost istog enzima ovisno o tipu posija, stoga se može zaključiti kako različita koncentracija enzima, ali i medij u kojem se enzim nalazi također utječu na koji će način ultrazvuk djelovati na enzimsku aktivnost (Jadhav i Gogate, 2014). Cilj ovog istraživanja bio je umanjiti aktivnost β -glukanaze kako bi β -glukanima molekulska masa ostala što više nepromijenjena, a to se postiglo za zobene posije već pri najmanjem utrošku energije od 100 J mL^{-1} , ali još i više kod energije od 250 J mL^{-1} gdje je aktivnost pala za čak 70 %. Za ječmene posije bilo je nužno utrošiti znatno više energije, tj. 250 J mL^{-1} , kako bi se aktivnost smanjila za svega 15 %.

4.6. FIZIKALNA SVOJSTVA TANKOG KRUHA

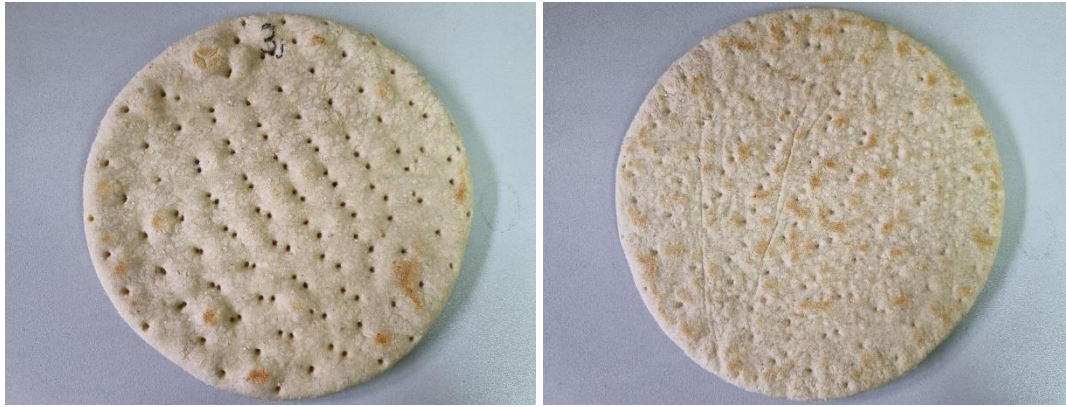
Na slici 17 prikazan je pečeni tanki kruh bez dodanih posija (TK-K), na slici 18 prikazan je pečeni tanki kruh s dodanih 10 % zobnih posija (na masu brašna), a na slici 19 je prikazan pečeni tanki kruh s dodanih 10 % ječmenih posija (na masu brašna). Svaki tip tankog kruha pečen je u 5 paralela, a na slikama je prikazan jedan primjerak svake vrste s obje strane.



Slika 17. Pečeni tanki kruh bez dodanih posija (TK-K); prednja i stražnja strana



Slika 18. Pečeni tanki kruh s dodanih 10 % zobnih posija na masu brašna; prednja i stražnja strana



Slika 19. Pečeni tanki kruh s dodanih 10 % ječmenih posija na masu brašna; prednja i stražnja strana

4.6.1. Boja, oblik, gubitak mase pečenjem i volumen tankog kruha

Prema rezultatima izmjerenih parametara boje (L^* , a^* i b^*) tankih kruhova sa i bez dodanih zobnih i ječmenih posija (Tablica 5) može se zaključiti kako nema značajne razlike između uzoraka. Veća L^* vrijednost ukazuje na svjetliju boju, a b^* vrijednost na žuću boju; međutim, iako uzorci s dodanim posijama (TK-ZP i TK-JP) u prosjeku pokazuju niže vrijednosti, ta vrijednost nije značajna. To je u skladu s fotografijama pečenih tankih kruhova prikazanih na slikama 17, 18 i 19 na kojima se također ne vidi razlika u bojama kore.

Prema rezultatima izmjerenih oblika, gubitaka pečenjem i specifičnih volumena tankih kruhova sa i bez dodanih zobnih i ječmenih posija (Tablica 5) može se zaključiti kako nema velikih razlika. Vrijednost oblika tankog kruha bez dodanih posija nešto je manja od vrijednosti oblika tankog kruha s dodanim posijama, međutim ta razlika nije značajna. Gubitak pečenjem nešto je niži kod tankog kruha s dodanim ječmenim posijama (TK-JP) što se podudara s vrijednostima kapaciteta vezanja vode prikazanih na slici 10 koji je kod netretiranih ječmenih posija (JPN) veći nego kod netretiranih zobnih posija (ZPN). Specifični volumen tankih kruhova s dodanim posijama (TK-ZP i TK-JP) u prosjeku su nešto veći od specifičnog volumena tankog kruha bez dodanih posija (TK-K).

Tablica 5. Parametri boje, oblika, gubitka pečenjem i specifičnog volumena tankog kruha sa i bez zobenih i ječmenih posija (TK – tanki kruh; K – kontrola; ZP – zobene posije; JP – ječmene posije)

Uzorak	L*	a*	b*	Oblik (promjer/ visina)	Gubitak pečenjem (%)	Specifični volumen (mL g ⁻¹)
TK-K	47,06 ± 2,18	0,85 ± 0,42	7,48 ± 1,26	19,67 ± 2,02	14,68 ± 1,10	2,47 ± 0,14
TK-ZP	44,96 ± 1,24	0,75 ± 0,23	6,20 ± 0,81	20,85 ± 2,45	13,69 ± 0,56	2,60 ± 0,10
TK-JP	46,73 ± 1,6	0,90 ± 0,47	7,15 ± 1,04	20,70 ± 0,79	12,32 ± 0,38	2,60 ± 0,07

4.6.2. Tekstura tankog kruha

U tablici 6 prikazani su rezultati tvrdoće, kohezivnosti, žvackljivosti i rezilijencije tankog kruha sa i bez zobenih i ječmenih posija, a prema rezultatima se može zaključiti kako dodatkom posija tvrdoća i žvackljivost tankog kruha rastu i to više dodatkom zobenih nego ječmenih posija, dok kohezivnost i rezilijencija ostaju nepromijenjene.

Tablica 6. Parametri teksture tankog kruha sa i bez zobenih i ječmenih posija (TK – tanki kruh; K – kontrola; ZP – zobene posije; JP – ječmene posije)

Uzorak	Tvrdoća (N)	Kohezivnost	Žvackljivost (Nmm)	Rezilijencija
TK-K	91,53 ± 5,55	0,75 ± 0,03	1200,14 ± 92,86	0,74 ± 0,04
TK-ZP	149,75 ± 7,29	0,74 ± 0,04	1661,23 ± 48,40	0,74 ± 0,05
TK-JP	106,09 ± 5,49	0,76 ± 0,03	1402,12 ± 108,09	0,75 ± 0,04

5. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima ovog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Nativne ječmene posije imaju veći kapacitet zadržavanja vode od nativnih zobnih posija koje više bubre u vodi. Iako zobene posije imaju svega 9 % veću koncentraciju fenolnih spojeva, pokazuju čak 3 puta veći antioksidacijski kapacitet. Koncentracija fitata i aktivnost β -glukanaze također je veća u zobnim posijama, dok je aktivnost fitaze čak 2,5 puta veća u ječmenim posijama.
2. Kapaciteti zadržavanja vode i bubrenja u vodi povećali su se nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na nativne posije. Najveća vrijednost kapaciteta zadržavanja vode postignuta je uz najveći utrošak energije od 250 J mL^{-1} što se može pripisati promjeni u konformaciji prehrambenih vlakana zbog implozije kavitacijskih mjehurića, čime se posljedično povećava specifična površina.
3. Ultrazvučni tretman visokog intenziteta utječe na smanjenje ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti vjerojatno zbog znatnog porasta temperature tijekom tretmana koja narušava strukturu termolabilnih polifenolnih spojeva što je bilo najizraženije kod specifične energije od 250 J mL^{-1} gdje je temperatura porasla za čak $40 \text{ }^\circ\text{C}$.
4. Koncentracija fitata i aktivnost fitaze najviše ovise o vrsti posija. Enzimska aktivnost fitaze raste za 40 % na uzorcima gdje je primijenjena ultrazvučna energija od 100 J mL^{-1} nakon čega porastom utroška energije od 250 J mL^{-1} aktivnost pada ispod aktivnosti nativnih posija. Najnižu vrijednost fitata postigli su uzorci obrađeni ultrazvukom najveće energije od 250 J mL^{-1} ujedno i najduljeg trajanja.
5. Enzimska aktivnost β -glukanaze nakon ultrazvučnog tretmana ovisi o tipu posija. Za zobene posije aktivnost pada u svim uzorcima, a najniža vrijednost se postiže kod uzorka obrađenog kontinuiranim tretmanom utroška energije od 250 J mL^{-1} . Ječmenim posijama se aktivnost β -glukanaze povećava kod pulsirajućeg tretmana nižeg utroška energije od 100 J mL^{-1} , a kontinuirani tretman i daljnje povećanje utroška energije uzrokuju smanjenje aktivnost.
6. Dodatak zobnih i ječmenih posija nema veliki utjecaj na boju, oblik i specifični volumen pečenog tankog kruha kao ni na gubitak mase pečenjem. No dodatak posija, osobito zobnih, negativno utječe na povećanje tvrdoće i žvkljivosti kruha.

7. Ultrazvučni tretman specifične energije od svega 100 J mL^{-1} je dovoljan za značajno smanjenje koncentracije fitata te je zbog najmanjeg smanjenja polifenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti prikladan za obradu zobnih i ječmenih posija ovisno o njihovoj namjeni. No za veću deaktivaciju β -glukanaze potrebno je primijeniti ultrazvučnu obradu veće energije.

Daljnja istraživanja će pokazati utjecaj ultrazvučno obrađenih posija na fizikalna i senzorska svojstva tankog kruha.

6. LITERATURA

AACC (1998) AACC Method (10-05. 01): Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement. American Association of Cereal Chemists, St. Paul.

Agbor GA, Vinso, JA, Donnelly PE (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Sci Food Tech* **8**, 147-156. <http://dx.doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>

Alan P, Ofelia R, Patricia T, and Maribel RR (2012) Cereal bran and wholegrain as a source of dietary fibre: technological and health aspects. *Int J Food Sci* **63**, 882-892. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.676030>

Al dmoor H (2012) Flat bread: Ingredients and fortification. *Qual Assur Saf Crops Foods* **4**, 2-8. <https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2011.00121.x>

Almeida EL, Chang YK, Steel CJ (2010) Effect of adding different dietary fiber sources on farinographic parameters of wheat flour. *Cereal Chem* **87**, 566-573. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-05-10-0063>

Anderson JW (1986) Fiber and health: An overview. *Am J Gastroentero* **81**, 892-897. <http://dx.doi.org/10.1097/00017285-198611000-00004>

Andersson AAM, Armo E, Grangeon E, Fredriksson H, Andersson R, Aman P (2004) Molecular weight and structure units of (1-3, 1-4)-beta-glucans in dough and bread made from hull-less barley milling fractions. *J Cereal Sci* **40**, 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.07.001>

Bader Ul Ain H, Saeed F, Khan MA, Niaz B, Rohi M, Nasir M A, Tufail T, Anbreen F, Anjum FM (2019) Modification of barley dietary fiber through thermal treatments. *Food Sci Nutr* **7**, 1816-1820. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1026>

Bai J, Ren Y, Li Y, Fan M, Qian H, Wang L, Wu G, Zhang H, Qi X, Xu M, Rao Z (2019) Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. *Trends Food Sci Technol* **88**, 57-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.023>

Barber TM, Kabisch S, Pfeiffer AFH, Weickert MO (2020) The Health Benefits of Dietary Fibre. *Nutrients*, **12**, 3209. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12103209>

Bartnik M, Szafranska I (1987) Changes in phytate content and phytase activity during the germination of some cereals. *J Cer Sci* **5**, 23-28. [http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210\(87\)80005-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210(87)80005-X)

Belščak A, Komes D, Horžić D, Ganić KK, Karlović D (2009) Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res* **42**, 707-716. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.018>

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Bermink MR (1994) Fiber analysis. U: Nielson SS. (Ured.) Introduction to the Chemical Analysis of Foods. Jones and Bartlett Publishers, Inc, Boston, str 169–180.

Bestzyme (2021) Beta Glucanase <<https://www.bestzyme.com/products/beta-glucanase.html>> pristupljeno 20. lipnja 2022.

Bielecki S, Galas E (1991) Microbial β -glucanases different from cellulases. *Crit Rev Biotechnol* **10**, 275-304. <http://dx.doi.org/10.3109/07388559109038212>

Chavan P, Sharma P, Sharma SR, Mittal TC, Jaiswal AK (2022) Application of High-Intensity Ultrasound to Improve Food Processing Efficiency: A Review. *Foods* **11**, 1-18. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11010122>

Chen G, Li Y, Li X, Zhou D, Wang Y, Wen X, Wang C, Liu X, Feng Y, Li B, Li N (2021) Functional foods and intestinal homeostasis: The perspective of in vivo evidence. *Trends Food Sci Technol* **111**, 475-482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.075>

Chinma CE, Ramakrishnan Y, Ilowefah M, Hanis-Syazwani M, Muhammad K (2015) Properties of Cereal Brans: A Review. *Cereal Chem* **92**, 1-7. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-10-13-0221-RW>

Cleary LJ, Andersson R, Brennan CS (2007) The behavior and susceptibility to degradation of high and low molecular weight barley β -glucan in wheat bread during baking and in vitro digestion. *Food Chem* **102**, 889-897. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.027>

Coda R, Katina K, Rizzello CG (2015) Bran bioprocessing for enhanced functional properties. *Current Opinion in Food Science* **1**, 50-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2014.11.007>

Codex Alimentarius Commission (2009) Report of the 30th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO), Italija.

Cui SW, Roberts K (2009) Dietary fiber: Fulfilling the Promise of Added-Value Formulations. U: Kasapis S, Norton IT, Ubbink JB (Ured.) Modern biopolymer science: bridging the divide between fundamental treatise and industrial application. Academic Press: Elsevier, London, str. 399-449.

Čukelj Mustač N, Voučko B, Novotni D, Drakula S, Gudelj A, Dujmić F, Čurić D (2019) Optimization of High Intensity Ultrasound Treatment of Proso Millet Bran to Improve Physical and Nutritional Quality. *Food Technol Biotech* **57**, 183-190. <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.6100>

Dimberg LH, Theander O, Lingnert H (1992) Avenanthramides-a group of phenolic antioxidants in oats. *Cereal Chem* **70**, 637-641.

Duan X, Zhou J, Qiao S, Wei H (2011) Application of low intensity ultrasound to enhance the activity of anammox microbial consortium for nitrogen removal. *Bioresour Technol* **102**, 4290-4293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.050>

Egli I, Davidsson L, Juillerat MA, Barclay D, Hurrell RF (2002) The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. *J Food Sci* **67**, 3484-3488. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09609.x>

Elleuch M, Bedigian D, Roiseux O, Besbes S, Blecker C (2011) Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem* **124**, 411-421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.077>

Ercan SS, Soysal C (2011) Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase. *Ultrason Sonochem* **18**, 689-695. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.09.014>

Ertuş N (2013) Dephytinization processes of some legume seeds and cereal grains with ultrasound and microwave applications. *Legume Res* **36**, 414-421.

Fincher GB, Stone BA (1986) Cell walls and their components in cereal grain technology. *Adv Cereal Sci Technol* **8**, 207-295.

Fredlund K, Asp NG, Larsson M, Marklinder I, Sandberg AS (1997) Phytate reduction in whole grains of wheat, rye, barley and oats after hydrothermal treatment. *J Cereal Sci* **25**, 83-91. <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.1996.0070>

Fretzdorff B, Brummer JM (1992) Reduction of Phytic Acid During Breadmaking of Whole-meal Breads. *Cereal Chem* **69**, 266-270.

Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, i sur. (2014) The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* **5**, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4611>

Guzmán C, Posadas-Romano G, Hernández-Espinosa N, Morales-Dorantes A, Peña RJ (2015) A new standard water absorption criteria based on solvent retention capacity (SRC) to determine dough mixing properties, viscoelasticity, and bread-making quality. *J Cereal Sci* **66**, 59-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2015.10.009>

Gökmen V, Sığit I (2007) Computer-Vision Based Analysis of Colour as a Tool for Food Process Control. U: Pletney VN (ured.) Focus on Food Engineering Research and Development, Nova Publishers, str. 17-27.

Habuš M, Novotni D, Gregov M, Štifter S, Čukelj Mustač N, Voučko B, Čurić D (2021a) Influence of particle size reduction and high-intensity ultrasound on polyphenol oxidase, phenolics, and technological properties of wheat bran. *J Food Process Preserv* **45**, 15204. <http://dx.doi.org/10.1111/jfpp.15204>

Habuš M, Novotni D, Gregov M, Mustač NČ, Voučko B, Čurić D (2021b) High-intensity ultrasound treatment for prolongation of wheat bran oxidative stability. *Food Sci Technol* **151**, 112110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112110>

Habuš M, Golubić P, Vukušić Pavičić T, Čukelj Mustač N, Voučko B, Herceg Z, Novotni D (2021c) Influence of flour type, dough acidity, printing temperature and bran pre-

processing on browning and 3D printing performance of snacks. *Food Bioprocess Technol* **14**, 2365-2379. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-021-02732-w>

Hoj PB, Hartman DJ, Morrice NA, Doan DN, Fincher GB (1989) Purification of (1-3)- β -glucan Endohydrolase Isoenzyme II from Germinated Barley and Determination of Its Primary Structure from a cDNA Clone. *Plant Mol Biol* **13**, 31-42. doi: 10.1007/BF00027333

Huang G, Chen S, Dai C, Ling S, Wenli S, Yingxiu T, i sur. (2017) Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrason Sonochem* **37**, 144-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.018>

Irakli M, Lazaridou A, Mylonas I, Biliaderis CG (2020) Bioactive Components and Antioxidant Activity Distribution in Pearling Fractions of Different Greek Barley Cultivars. *Foods* **9**, 783. <http://dx.doi.org/10.3390/foods9060783>

Islam MN, Zhang M, Adhikari B (2014) The inactivation of enzymes by ultrasound - a review of potential mechanisms. *Food Rev Int* **30**, 1-21. <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2013.853772>

Jadhav SH, Gogate PR (2014) Intensification in the activity of lipase enzyme using ultrasonic irradiation and stability studies. *Ind Eng Chem Res* **53**, 1377-1385. <http://dx.doi.org/10.1021/ie403419e>

Johansson L (2006) Structural analyses of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)--D-glucan of oats and barley. Academic Dissertation, Department of Applied Chemistry and Microbiology (diplomski rad), University of Helsinki, Helsinki.

Kivisto B, Andersson H, Cederblad G, Sandberg AS, Sandstrom B (1987) Extrusion Cooking of a High-Fibre Cereal Product: 2. Effects on Apparent Absorption of Zinc, Iron, Calcium, Magnesium and Phosphorus in Humans. *Br J Nutr* **55**, 255-260. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19860032>

Kuijpers WA, van Eck D, Kemmere MF, Keurentjes JTF (2002) Cavitation-induced reactions in high-pressure carbon dioxide. *Sci* **298**, 1969-1971. doi: 10.1126/science.1078022

Lebesi DM, Tzia C (2011) Effect of the addition of different dietary fiber and edible cereal bran sources on the baking and sensory characteristics of cupcakes. *Food Bioproc Technol* **4**, 710-722. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-009-0181-3>

Lebesi DM, Tzia C (2012) Use of endoxylanase treated cereal brans for development of dietary fiber enriched cakes. *Innov Food Sci Emerg Technol* **13**, 207-214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2011.08.001>

Makki K, Deehan EC, Walter J, Backhed F (2018) The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe* **23**, 705-715. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>

Mälkki Y, Virtanen E (2001) Gastrointestinal Effects of Oat Bran and Oat Gum – A Review. *Food Sci Technol* **34**, 337-347. <http://dx.doi.org/10.1006/fstl.2001.0795>

Mälkki Y (2001) Oat fiber. U: Cho SS, Dreher M (ured.) Handbook of dietary fiber. Marcel Dekker Inc, New York, str. 497-518.

Mason TJ (1998) Power ultrasound in food processing – the way forward. U: Povey MJW, Mason TJ (Ured.) Ultrasound in Food Processing. Blackie Academic & Professional, London.

Megazyme (2019) Malt β -glucanase / lichenase assay procedure. Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland.

Megazyme (2021) Phytase assay procedure. Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland.

Megazyme (2019) Phytic acid (phytate) / total phosphorus measured as phosphorus released by phytase and alkaline phosphatase assay procedure. Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland.

Miller SS, Fulcher RG (2011) Microstructure and Chemistry of the Oat Kernel. U: Webster FH, Wood PJ (ured.) Oats: Chemistry and Technology, drugo izdanje, American Association of Cereal Chemists, Inc (AACC), St Paul, str. 77–94

Moriartey S, Temelli F, Vasanthan T (2010) Effect of formulation and processing treatments on viscosity and solubility of extractable barley β -glucan in bread dough evaluated

under in vitro conditions. *Cereal Chem* **87**, 65-72. <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM-87-1-0065>

Nadar SS, Rathod VK (2017) Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini - review. *World J Microbiol Biotechnol* **33**, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-017-2322-6>

Niu M, Hou GG, Li X, Wang L, Chen Z (2014). Inhibitory effects of ultrasound combined with ascorbic acid or glutathione on enzymatic darkening of whole-wheat raw noodles. *Food Sci Technol* **59**, 901-907.

Noort MWJ, Van Haaster D, Hemery Y, Schols HA, Hamer RJ (2010) The effect of particle size of wheat bran fractions on bread quality – Evidence for fibre-protein interactions. *J Cereal Sci* **52**, 59-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2010.03.003>

Oakenfull D, (1998) Polysaccharide molecular structures. U: Walter RH, (Ured.) Polysaccharide Association Structures in Food. Marcel Decker Inc, New York.

Oatway L, Vasanthan T, Helm JH (2001) Phytic acid. *Food Rev Int* **17**, 419-431. <http://dx.doi.org/10.1081/FRI-100108531>

Ou B, Huang D, Hampsch - Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J Agr Food Chem* **50**, 3122-3128. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0116606>

Okazaki Y, Isobe T, Iwata Y, Matsukawa T, Matsuda F, Miyagawa H, i sur. (2004) Metabolism of avenanthramide phytoalexins in oats. *Plant J* **39**, 560-572. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02163.x>

Patel S (2012) Cereal bran: the next super food with significant antioxidant and anticancer potential. *Mediterr J Nutr Metab* **5**, 91-104. <http://dx.doi.org/10.3233/s12349-012-0091-1>

Perez-Quirce S, Ronda F, Melendre C, Lazaridou A, Biliaderis C (2016) Inactivation of Endogenous Rice Flour β -Glucanase by Microwave Radiation and Impact on Physico-chemical Properties of the Treated Flour. *Food Bioprocess Tech* **9**, 1562–1573. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1741-y>

Poutanen K (1997) Enzymes: An important Review tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends Food Sci Technol* **8**, 300-306. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01063-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01063-7)

Phillips GO, Cui SW (2011) An Introduction: Evolution and Finalisation of the Regulatory Definition of Dietary Fibre. *Food Hydrocoll* **25**, 139-43. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.011>

Pravilnik o metodama fizikalno - kemijske analize za žita i mlinske proizvode (2011) *Narodne novine* **28**, Zagreb.

Prückler M, Siebenhandl-Ehn S, Apprich S, Höltinger S, Haas C., Schmid E, i sur. (2014) Wheat bran-based biorefinery 1: composition of wheat bran and strategies of functionalization. *Food Sci Technol* **5**, 211-221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.004>

Qarooni J, Ponte J, Posner S (1992) Flat bread of the world. *Cereal Foods World* **37**, 863-865.

Raghavendra SN, Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Tharanathan RN (2004) Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *Eur Food Res Technol* **218**, 563-567. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-004-0889-2>

Rao SS, Yu S, Fedewa A (2015) Systematic review: Dietary fibre and FODMAP-restricted diet in the management of constipation and irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* **41**, 1256-1270. <http://dx.doi.org/10.1111/apt.13167>

Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK (1989) Phytates in Cereals and Legumes. CRC Press, Boca Raton.

Reddy NR, Sathe SK (2001) Food Phytates. CRC Press, New York.

Rieder A, Ballance S, Knutsen SH (2015) Viscosity based quantification of endogenous β -glucanase activity in flour. *Carbohydr Polym* **115**, 104-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.075>

Rickard S E, Thompson LU (1997) Interactions and Biological Effects of Phytic Acid. U: Shahidi F (Ured.) Antinutrients and Phytochemicals in Food. American Chemical Society: Washington, DC, str. 294-312.

Roth- Maier DA, Kettler S I, Kirchgessner M (2002) Availability of vitamin B-6 from different food sources. *Int J Food Sci Nutr* **53**, 171-179. <http://dx.doi.org/10.1080/09637480220132184>

Seibel W (1975) Kleie für menschliche Ernährung. *Die Mühle und Mischfuttertechnik* **112**, 669-970.

Shamsuddin AM (1995) Inositol Phosphates Have Novel Anticancer Function. *J Nutr* **125**, 725-732. doi: 10.1093/jn/125.3_Suppl.725S

Sharma SC (1981) Gums and hydrocolloids in water emulsion. *Food Tech* **35**, 59-67.

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Sci Dir* **16**, 144 – 158.

Sullivan P, Arendt E, Gallagher E (2013) The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods. *Trends Food Sci Technol* **29**, 124-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2012.10.005>

Tabaraki R, Nateghi A (2011) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrason Sonochem* **18**, 1279-1286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.004>

Texture Technologies (2022) Overview of TPA. <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis> pristupljeno 15. kolovoza 2022.

Turk M, Carlsson NG, Sandberg AS (1996) Reduction in the Levels of Phytate During Wholemeal Bread Making; Effect of Yeast and Wheat Phytases. *J Cereal Sci* **23**, 257-264. <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.1996.0026>

USDA (2019) Oat bran, raw. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. FoodData Central <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168872/nutrients> pristupljeno 15. lipnja 2022.

USDA (2019) Barley, hulled. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. FoodData Central <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170283/nutrients> pristupljeno 15. lipnja 2022.

Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J, Melby C L (2002) Antioxidant properties of cereal products. *J Food Sci* **67**, 2600-2603. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08784.x>

Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Li X (2008) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem* **106**, 804-810. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.06.062

Wardlaw GM, Insel PM (1997) *Perspectives in Nutrition*, 3.izd., Mosby-Year Book, Inc, St. Louis.

Wei C, Ge Y, Liu D, Zhao S, Wei M, Jiliu J, i sur. (2022) Effects of High-Temperature, High-Pressure, and Ultrasonic Treatment on the Physicochemical Properties and Structure of Soluble Dietary Fibers of Millet Bran. *Frontiers in Nutrition* **8**, 820715. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2021.820715>

Weickert MO, Pfeiffer AF (2008) Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr* **138**, 439-442. <http://dx.doi.org/10.1093/jn/138.3.439>

Welch RW (2011) Nutrient Composition and Nutritional Quality of Oats and Comparisons with Other Cereals. U: Webster HF, Wood PJ (ured.) *Oats Chemistry and Technology*. Drugo izdanje, AACC International, Inc, Minesota, str. 95-108.

Wood PJ, Beer MU, Butler G (2000) Evaluation of role of concentration and molecular weight of oat beta-glucan in determining effect of viscosity on plasma glucose and insulin following an oral glucose load. *Br J Nutr* **84**, 19-23. <https://doi.org/10.1017/S0007114500001185>

Wood PJ (2011) Oat β - Glucan: Properties and Function. U: Webster HF, Wood PJ (ured.) *Oats Chemistry and Technology*. Drugo izdanje, AACC International, Inc, Minesota, str. 219-254.

Zitterman A (2003) Bran. U: Caballero B, Trugo LC, Finglas PM (Ured.) *Encyclopedia of food science and nutrition*. Academic Press, Elsevier, Amsterdam, str. 1844-1850.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis