

Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na fizikalna svojstva, aktivnost polifenol oksidaze i bioaktivni potencijal pšeničnih posija

Šišić, Gabrijela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:755418>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2019.

Gabrijela Šišić
1083/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA
VISOKOG INTENZITETA NA
FIZIKALNA SVOJSTVA,
AKTIVNOST POLIFENOL
OKSIDAZE I BIOAKTIVNI
POTENCIJAL PŠENIČNIH POSIJA**

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 Matee Habuš, mag. ing.

Diplomski rad izrađen je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost: Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (IP-2016-06-3789).

Zahvala

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Novotni na izrazitoj susretljivosti, usmjeravanju i stručnim savjetima prilikom izrade ovoga rada.

Također se zahvaljujem Matei Habuš, mag. ing. na strpljenju i pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci, strpljenju i bodrenju tijekom čitavog 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

UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA FIZIKALNA SVOJSTVA, AKTIVNOST POLIFENOL OKSIDAZE I BIOAKTIVNI POTENCIJAL PŠENIČNIH POSIJA

Gabrijela Šišić, 1083/PI

Sažetak: U svrhu poboljšanja tehnoloških karakteristika pšeničnih posija i utjecaja na senzorsku kvalitetu hrane istražuje se primjena novih metoda obrade hrane, među kojima je i ultrazvuk. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj različitih uvjeta tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na fizikalno-kemijske karakteristike i bioaktivni profil pšeničnih posija (polifenolni spojevi i antioksidacijski kapacitet). Tretman je proveden izravnim uranjanjem ultrazvučne sonde (promjera 22 mm, 400 W, 24 kHz) u uzorke pri različitim amplitudama (60 – 100 %) i vremenu tretiranja (5 – 15 min). Ultrazvuk visokog intenziteta utjecao je na povećanje vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode i bubrenja te na značajno ($p < 0,05$) smanjenje aktivnosti polifenol oksidaze. No, ultrazvučni tretman utjecao je i na smanjenje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti, pri čemu je najmanje smanjenje pokazao uzorak tretiran 10 minuta 80 %-tnom amplitudom.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, polifenoli, polifenol oksidaza, pšenične posije, ultrazvuk visokog intenziteta

Rad sadrži: 62 stranica, 12 slika, 5 tablica, 135 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: Matea Habuš, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Nikolina Čukelj* (predsjednik)
2. Izv.prof.dr.sc. *Dubravka Novotni* (mentor)
3. Doc.dr.sc. *Tomislava Vukušić Pavičić* (član)
4. Doc.dr.sc. *Filip Dujmić* (zamjena)

Datum obrane: 11. prosinca 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GraduateThesis

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

THE INFLUENCE OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND TREATMENT ON PHYSICAL PROPERTIES, POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY AND BIOACTIVE POTENTIAL OF WHEAT BRAN

Gabrijela Šišić, 1083/PI

Abstract: *In order to improve the technological properties of wheat bran and their effect on sensory quality of food, the application of new methods of food processing is being explored, including ultrasound. The aim of this study is to investigate the influence of different conditions of high intensity ultrasound treatment on the physical-chemical properties and bioactive profile of wheat bran. The treatment was performed by direct immersion of an ultrasonic probe (400 W, 24 kHz) into the samples at different amplitudes (60 – 100 %) and treatment time (5 – 15 min). The treated samples and the non-ultrasound control sample determined the physico-chemical characteristics and examined the bioactive profile (polyphenolic compounds and antioxidant capacity) by spectrophotometric methods. High-intensity ultrasound had an impact on increasing the water retention capacity and swelling, and significant ($p < 0.05$) decrease in polyphenol oxidase activity. However, ultrasound treatment also resulted in a decrease of the total polyphenols content and antioxidant activity. The best bioactive profile among the treated samples is the sample treated for 10 minutes with 80% amplitude.*

Keywords: *antioxidant activity, high intensity ultrasound, polyphenols, polyphenol oxidase, wheat bran*

Thesis contains: 62 pages, 12 figures, 5 tables, 135 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Dubravka Novotni, Associate professor*

Technical support and assistance: *Matea Habuš, MSc*

Reviewers:

1. PhD. *Nikolina Čukelj*, Assistant professor
2. PhD. *Dubravka Novotni*, Associate professor
3. PhD. *Tomislava Vukušić Pavičić*, Assistant professor
4. PhD. *Filip Dujmić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 11 December 2019

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Pšenične posije.....	3
2.2. Nutritivna vrijednost i sastav pšeničnih posija.....	4
2.2.1. Prehrambena vlakna	5
2.2.1.1. Arabinoksilani	6
2.2.2. Bioaktivne komponente i antioksidansi u pšeničnim posijama	7
2.2.2.1. Fenolne kiseline	7
2.3. Enzimi.....	8
2.4. Potencijalna primjena pšeničnih posija u prehrambenoj industriji	9
2.5. Ultrazvuk	11
2.5.1. Primjena i mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJAL	16
3.2. METODE RADA	16
3.2.1. Određivanje udjela topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana (prema metodi AOAC 2011.25).....	16
3.2.1.1. Određivanje netopljivih prehrambenih vlakana	18
3.2.1.2. Određivanje topljivih prehrambenih vlakana	18
3.2.1.3. Određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS).....	19
3.2.1.4. Određivanje količine pepela.....	20
3.2.1.5. Određivanje sadržaja dušika (proteina) po Kjeldahl-u	20
3.2.2. Tretiranje uzoraka ultrazvukom visokog intenziteta	23
3.2.2.1. Liofilizacija	24
3.2.3. Određivanje udjela vode.....	25
3.2.4. Ekstrakcija slobodnih spojeva	26
3.2.5. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	26
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	28
3.2.6.1. FRAP metoda.....	28
3.2.6.2. DPPH metoda.....	30
3.2.7. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode	32
3.2.8. Bubrenje u vodi	33
3.2.9. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze	34
3.2.10. Određivanje parametara boje.....	35
3.2.11. Statistička analiza	35
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1. Udjel prehrambenih vlakana	37
4.2. Promjena temperature tijekom ultrazvučnog tretmana	38
4.3. Bubrenje u vodi i kapacitet zadržavanja vode.....	39
4.4. Boja posija	41
4.5. Aktivnost polifenol oksidaze	42

4.6. Udjel ukupnih polifenola (TPC) i antioksidacijski kapacitet u uzorcima pšeničnih posija.....	43
5. ZAKLJUČCI.....	48
6. LITERATURA.....	49

1. UVOD

Posljednjih desetljeća sve se više javlja interes potrošača za funkcionalnim prehrambenim proizvodima koji osim zadovoljavanja osnovnih nutritivnih potreba imaju i pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka. Razvojem asortimana funkcionalnih prehrambenih proizvoda u posljednje vrijeme sve je popularnije iskorištavanje nusproizvoda, koji predstavljaju važan izvor makronutrijenata i bioaktivnih komponenti, u proizvodnji hrane. Konvencionalna prerada žitarica rezultira značajnom količinom nusproizvoda, a jedan od njih su i pšenične posije, odnosno nusprodukti proizvodnje rafiniranog pšeničnog brašna.

Pšenične posije čine 25 % mase zrna pšenice (Neves i sur., 2006) te sadrže značajne količine prehrambenih vlakana, bogat su izvor minerala, vitamina i bioaktivnih spojeva poput lignana, polifenola i fitosterola, koji doprinose zdravlju probavnog sustava i održavanju zdrave tjelesne mase. Pomažu u prevenciji pojave raka debelog crijeva i prostate te bolesti srčano-krvožilnog sustava. Međutim, trenutno se samo 10% proizvedenih pšeničnih posija koristi u prehrambenoj industriji, dok se preostalih 90% koristi kao hrana za životinje ili kao otpad (Onipe i sur., 2015). Njihova ograničena primjena u prehrambenoj industriji je najvećim dijelom uzrokovana njihovim negativnim utjecajem na tehnološke karakteristike i senzorsku kvalitetu pekarskih i brašneno-konditorskih proizvoda. Međutim, kod pšeničnih posija i dalje postoje nepoznanice vezane uz tehnološku funkcionalnost i fizikalno-kemijska svojstva. Osim toga, fizikalno-kemijska svojstva pšeničnih posija također će utjecati na biorasploživost bioaktivnih spojeva te na njihova hranjiva i fiziološka svojstva (Rosa-Sibakov i sur., 2015). Znanstvenici su do sada već procijenjivali različite tretmane posija u pokušaju modifikacije njihovih svojstava. Većina ovih tretmana je mehaničke, (hidro)termalne, kemijske ili enzimske prirode (Hemdane i sur., 2016).

Jedan od takvih tretmana je i ultrazvuk visokog intenziteta koji se koristi u različitim procesima te se smatra potencijalnim tehnološkim postupkom netoplinke obrade hrane. Zbog brojnih prednosti, poput ekonomske i ekološke prihvatljivosti, uštede energije, moguće poboljšane biorasploživosti mikronutrijenata pri čemu se zadržavaju njihova izvorna svojstva, ultrazvuk je u sve većoj mjeri predmet istraživanja brojnih znanstvenika.

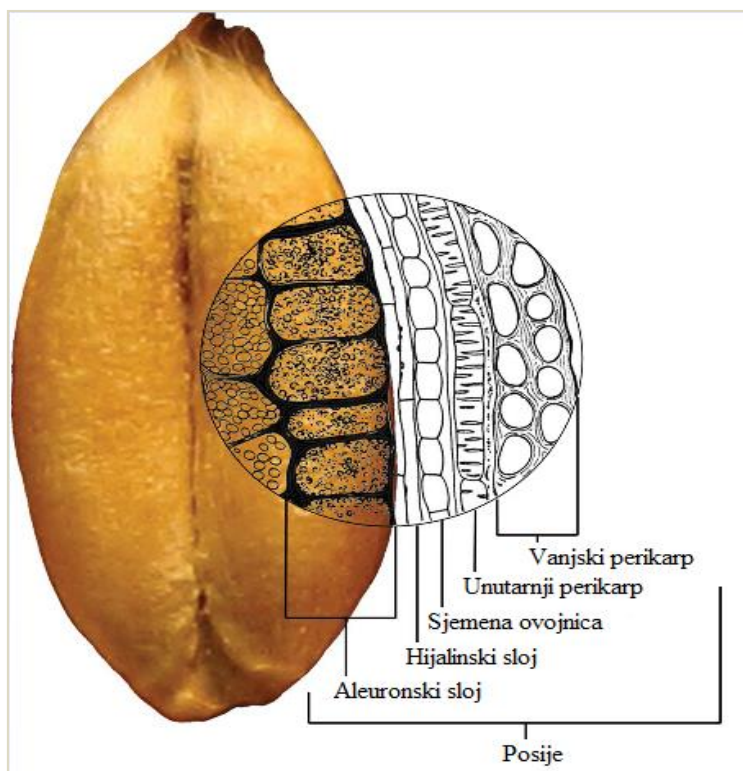
Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj različitih uvjeta tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na funkcionalnost pšeničnih posija. Najprije se odredio udjel topljivih i netopljivih vlakana u pšeničnim posijama. Zatim su uzorci pšeničnih posija obrađeni ultrazvukom visokog

intenziteta pri čemu su mijenjane amplitude i vrijeme trajanja tretmana. Tretiranim uzorcima odredila se boja i aktivnost polifenol oksidaze, kapacitet zadržavanja vode i sposobnost bubrenja u vodi. U ekstraktu tretiranih uzoraka pšeničnih posija također se odredio udjel ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet DPPH i FRAP metodama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Pšenične posije

Pšenične posije čine vanjski dio zrna pšenice. Sastoje se od više slojeva koji čine 25 % mase zrna. Od unutrašnjosti prema van slojevi pšeničnih posija su: aleuronski sloj, hijalinski sloj, sjemena ovojnica, unutarnji i vanjski perikarp. Aleuronski sloj čini oko 50 % mase posija i sastoji se od gustih staničnih stijenki koje nisu lignizirane te sadrži bioaktivne unutarstanične komponente, fitinsku kiselinu, antioksidante, vitamine, minerale te proteine (Javed i sur., 2012). Hijalinski sloj građen je od arabinoksilana sa visokim udjelom monomera, a malim udjelom dimera ferulinske kiseline, što upućuje na slabo umreženu strukturu (Barron i sur., 2007). Sjemena ovojnica je hidrofobno tkivo bogato ligninom i lipidnim bioaktivnim molekulama poput alkilresorcinola (Landberg i sur., 2008). Vanjski i unutarnji perikarp bogati su netopljivim vlaknima kao što je celuloza, ksilani i lignini, te fenolnim kiselinama i drugim bioaktivnim komponentama (Sapirstein, 2016).



Slika 1. Građa pšeničnih posija (Mateo Anson i sur., 2012)

2.2. Nutritivna vrijednost i sastav pšeničnih posija

Pšenične posije sadrže oko 53 % prehrambenih vlakana od kojih su najzastupljeniji ksilani, lignin, celuloza, galaktan i fruktani. Ostale komponente pšeničnih posija su vitamini, minerali i bioaktivni spojevi poput alkilresorcinola, ferulinske kiseline, flavonoida, karotenoida, lignana i sterola (Apprich i sur., 2013; Andersson i sur., 2014). Minerali u pšeničnim posijama su: željezo (Fe), cink (Zn), mangan (Mn), magnezij (Mg) i fosfor (P). Oko 80 % fosfora se skladišti u zrelih sjemenkama žitarica u obliku fitata koji tvore komplekse s drugim mineralima kao što su Fe, Zn i Mg te tako složena struktura smanjuje bioraspoloživost ovih minerala. U dosadašnjim istraživanjima dokazalo se da se fitinska kiselina u pšeničnim posijama uspješno može smanjiti: hidrotermalnim tretmanom, smanjenjem veličine, enzimskim tretmanom, sladovanjem, namakanjem i fermentacijom (Aivaz i Mosharraf, 2013; Coda i sur., 2014). Djelovanje endogene fitaze u zrnu i egzogene fitaze iz fermentacije kvasca i kiselog tijesta također može osloboditi minerale složene u obliku fitinske kiseline (Brouns i sur., 2012).

Tablica 1. Sastav pšeničnih posija

SASTOJAK/KOMPONENTA	% SUHE TVARI	REFERENCA
Prehrambena vlakna	33,4 - 63,0	Curti i sur., 2013
Vlaga	8,1 - 12,7	Curti i sur., 2013
Pepeo	3,9 - 8,1	Curti i sur., 2013
Proteini	9,6 - 18,6	Curti i sur., 2013; Yan i sur., 2015
Ukupni ugljikohidrati	60,0 - 75,0	Javed i sur., 2012
Škrob	9,1 - 38,9	Curti i sur., 2013; Yan i sur., 2015
FITONUTRIJENTI	µg g⁻¹	
Alkilresorcinol	489 - 1429	Luthria i sur., 2015
Fitosteroli	344 - 2050	Fardet, 2010
Ferulinska kiselina	1376 - 1918	Kim i sur., 2006; Brouns i sur., 2012

Povezani fenolni spoj	4,73 - 2020	Kim i sur., 2006; Brewer i sur., 2014
Flavonoidi	3000 - 4300	Fardet, 2010; Brewer i sur., 2014
MIKRONUTRIJENTI	mg (100 g)⁻¹	
Fosfor	900 - 1500	Fardet, 2010; Brouns i sur., 2012
Magnezij	530 - 1030	Brouns i sur., 2012
Cink	8,3 - 14,0	Brouns i sur., 2012
Željezo	1,9 - 34,0	Fardet, 2010; Brouns i sur., 2012
Mangan	0,9 - 10,1	Fardet, 2010; Brouns i sur., 2012
Vitamin E	0,13 - 9,5	Fardet, 2010
Tiamin (B1)	0,51 - 1,6	Fardet, 2010
Riboflavin (B2)	0,2 - 0,8	Fardet, 2010; Brouns i sur., 2012

2.2.1. Prehrambena vlakna

Hrana od cjelovitih žitarica je bogata prehrambenim vlaknima, složenim spojevima sastavljenim od celuloze, hemiceluloze i polimera pentozana baziranih na ksilozi i arabinozi koje su vezane na proteine (Apprich i sur., 2013). Prehrambena vlakna mogu se definirati kao ostaci jestivih polisaharida biljnih stanica, lignina i drugih tvari neprobavljivih za enzime gornjeg dijela gastrointestinalnog trakta. To su neprobavljivi ugljikohidrati biljnog podrijetla s heterogenom kemijskom strukturom otporni na učinke probavnih enzima u ljudskom crijevu (Almeida i sur., 2013). Pšenične posije imaju visoki sadržaj prehrambenih vlakana koji se kreće u udjelu od 33 % do 63 % te se mogu klasificirati kao topljiva i netopljiva prehrambena vlakna ovisno o njihovoj topljivosti u vodi. Topljiva prehrambena vlakna u pšeničnim posijama prisutna su u udjelu manjem od 5 % ukupnih prehrambenih vlakana, a sastoje se od glukana i ksilana (Brouns i sur., 2012). Međutim, nedavno je razvijen proces ekstrudiranja s ciljem povećanja udjela topljivih prehrambenih vlakana (Yan i sur., 2015). U tom istraživanju udjel topljivih prehrambenih vlakana se značajno povećao za 70 %, a time se poboljšao i kapacitet zadržavanja ulja, kapacitet zadržavanja vode te kapacitet bubrenja topljivih prehrambenih vlakana. Zahvaljujući tome pšenične posije bi se mogle početi primjenjivati u proizvodnji hrane u kojoj je važna apsorbicija ulja, kao kod hrane od prženih žitarica, te velika sposobnost bubrenja.

Prehrambena vlakna pozitivno utječu na zdravlje čovjeka smanjenjem kolesterola u plazmi, laksativnim djelovanjem i smanjenjem glukoze u krvi (Patel, 2015). Također, prehrambena vlakna pomažu u održavanju zdravlja crijeva, regulacije apetita i dugotrajne sitosti, što je potvrđeno u istraživanju Kristensen i suradnika (2010) gdje su ispitanici koji su konzumirali kruh od cjelovitog zrna pšenice bili duže vrijeme siti u odnosu na ispitanike koji su konzumirali rafinirani pšenični kruh. Osjećaj punoće ili sitosti može se pripisati povećanoj viskoznosti i niskoj gustoći energije (Ötles i Ozgoz, 2014), a razlozi za to su velika apsorpcija vode viskoznih prehrambenih vlakana, skraćeno vrijeme prolaska kroz crijevo, povećana viskoznost probavnog sustava u tankom crijevu, povećana količina stolice i proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina u debelom crijevu zbog fermentacije vlakana (Almeida i sur., 2013).

Jedan od najbogatijih izvora prehrambenih vlakana su polisaharidi bez škroba, a glavni predstavnici su: arabinoksilani, celulozai beta-glukan koji predstavljaju 70%, 24% i 6% neškrobnih polisaharida posija (Maes i Delcour, 2002).

2.2.1.1. Arabinoksilani

Arabinoksilani su vlakna građena od polimera ksiloze koji čini kostur na koji se vežu arabinozni ostaci α -1,2 i α -1,3 glikozidnim vezama, a u svom sastavu također sadrži i važnu bioaktivnu komponentu – ferulinsku kiselinu koja je kovalentno vezana na arabinozne ostatke. Sadržaj arabinoksilana u pšeničnim posijama kreće se između 5,0 i 26,9 g na 100 g pšeničnih posija (Fardet, 2010). U istraživanju Maki i suradnika (2012) arabinoksilani su se primjenjivali u žitaricama za doručak u dozi između 2,2 i 4,8 g g⁻¹ u vremenskom razdoblju od 3 tjedna, pri čemu je došlo do rasta poželjnih bakterija *Bifidobacterium* u crijevima, što ukazuje na njihovu prebiotičku ulogu u crijevima, a samim time i pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka. Vrlo važnu strukturnu ulogu u stabilizaciji arabinoksilanskih polisaharida u posijama imaju diferulati ili dimeri dehidroferulinske kiseline na način da tvore umreženu strukturu i tako su odgovorni za netopljivost vlakana. Ferulinska kiselina koja je kovalentno vezana na arabinoksilane pokazuje antioksidacijski potencijal koji se sastoji od uklanjanja slobodnih radikala, od kojih su najčešće reaktivne kisikove vrste ROS (Reactive Oxygen Species) koje uzrokuju mnoge upalne efekte i oštećuju stanične proteine, lipide i nukleinske kiseline (Sapirstein, 2016).

2.2.2. Bioaktivne komponente i antioksidansi u pšeničnim posijama

Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u žitaricama su: flavonoidi, fenolne kiseline, tokoferoli, lignani, fitosteroli i karotenoidi (Belobrajdic i Bird, 2013). To su nehranjivi sastojci hrane te su obično prisutni u malim koncentracijama. Bioaktivni spojevi prisutni u pšeničnim posijama imaju mnoga antioksidacijska i antiupalna svojstva te se njihovo djelovanje najčešće povezuje s utjecajem na ljudsko zdravlje (Anson i sur., 2012). Na antioksidacijsku aktivnost, koncentraciju i svojstva spojeva, poput fenolnih kiselina, karotenoida i tokoferola koji se nalaze u pšeničnim posijama znatan utjecaj ima raznolikost pšenice te uvjeti uzgoja (Menga i sur., 2010; Shewry i sur., 2010), iako se čini da frakcije pšeničnih posija konstantno zadržavaju svoje kapacitete uklanjanja radikala i keliranja. Dosadašnja istraživanja pokazala su da aleuronski sloj ima najveći antioksidacijski kapacitet među pšeničnim frakcijama, a u najvećoj mjeri (do 60 %) antioksidacijskom kapacitetu aleuronskog sloja pridonosi ferulinska kiselina (Mateo Anson i sur., 2008; Vaher i sur., 2010). Pretpostavlja se da antioksidansi, koji se nalaze u frakcijama pšeničnih posija, mogu modulirati stanični oksidacijski status i zaštititi biološki važne molekule poput DNA, proteina i membranskih lipida od oksidacijskog oštećenja te posljedično tome imaju ulogu u smanjenju rizika od kroničnih bolesti, poput kardiovaskularnih bolesti i raka (Zhou i sur., 2004). Također, pokazalo se da fenolni antioksidansi inhibiraju LDL oksidaciju, vezanjem s apolipoproteinom-B (Yu i sur., 2005; Liyana-Pathirana i Shahidi, 2007). Alkilresorcinol, također antioksidans pronađen u pšeničnim posijama, inhibira vezanje trombocita na fibrinogen, stimulira proizvodnju tromboksana i inhibira stvaranje triglicerida, pri čemu fenolni spojevi imaju potencijalnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Ross i sur., 2004). Također, u istraživanju Wang i suradnika (2009) pokazalo se da fenolni spojevi pšeničnih posija, poput feruloil oligosaharida, štite od oksidacijskih oštećenja izazvanih slobodnim radikalima u ljudskim eritrocitima.

2.2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su među najzastupljenijim i sveprisutnijim metabolitima žitarica koje imaju antioksidacijsko djelovanje i time utječu na ljudsko zdravlje (Li i sur., 2008). U pšeničnim posijama su uglavnom smještene u aleuronskom sloju i dijele se u dvije skupine: hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline. U skupinu hidroksibenzojevih kiselina ulaze vanilinska, sinerginska i D-hidroksibenzojeva kiselina, a obično grade složene

komponente kao što su lignini i tanini. Skupinu hidroksicimetnih kiselina, koja se nalazi u većoj koncentraciji u pšeničnim posijama u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline, čine *p*-kumarinska i ferulinska kiselina. Ferulinska kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u pšenici, a čini više od 90% ukupnih fenolnih kiselina u pšeničnim posijama i pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostalim fenolnim kiselinama, poput kafeinske, klorogenske, cimetne, galne, protokatehinske, sinirginske, ružmarinske i vanilinske kiseline (Sevgi i sur., 2015).

Antioksidacijska svojstva fenolnih kiselina uglavnom se pripisuju davanju elektrona i prijenosu atoma vodika slobodnim radikalima (Sevgi i sur., 2015). Istraživanje Rukkumani i suradnika (2004) pokazalo je da ferulinska kiselina *in vivo* učinkovito uklanja slobodne radikale i sprječava oksidacijski stres povezan s alkoholom i polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA) koje izazivaju toksičnost. Također, određenu zaštitu protiv peroksidacije lipida pruža skupina karboksilne kiseline uz susjednu nezasićenu dvostruku kovalentnu vezu, koja omogućuje dodatna mjesta vezanja slobodnim radikalima (Itagaki i sur., 2009). U prethodnim istraživanjima pokazalo se da fenolne kiseline, a posebno hidroksicimetne, poput ferulinske, kafeinske i *p*-kumarinske kiseline, smanjuju oksidaciju lipoproteina niske gustoće i potencijalno štite tijelo od ateroskleroze (Meyer i sur., 1998; Yu i sur., 2005). Slobodni oblici ferulinske kiseline efikasno se apsorbiraju u crijevima (Bourne i sur., 2000). Metaboliti ferulinske kiseline pronađeni u urinu i plazmi nakon konzumacije žitarica za doručak pokazali su da se apsorpcija ferulinske kiseline iz žitarica odvija uglavnom u tankom crijevu i uglavnom se odnosi na topljive oblike (Kern i sur., 2003). Neki autori smatraju da kompleksnost strukture vezanih fenolnih spojeva može objasniti njihovu zdravstvenu vrijednost, budući da do debelog crijeva dolaze uglavnom u neprobavljenom obliku, i time pokazuju svoje jedinstveno antioksidacijsko i protuupalno djelovanje te doprinose smanjenju rizika od kolorektalnog karcinoma (Vitaglione i sur., 2008; Andreasen i sur., 2001).

2.3. Enzimi

Pšenica sadrži različite enzime iz raznih enzimskih skupina od kojih je većina koncentrirana u posijama pšeničnog zrna te oni određuju njihovu funkcionalnost (Every i sur., 2006). Enzimi koji se najčešće povezuju s pšeničnim posijama su polifenol oksidaze koji uzrokuju potamnjivanje pšeničnih proizvoda zbog sposobnosti oksidacije endogenih fenolnih spojeva. Stvarne količine polifenol oksidaza koje se nalaze u pšeničnim posijama mogu uzrokovati gubitak organoleptičkih svojstava i nutritivne vrijednosti proizvoda od cjelovitog

zrna pšenice (Soysal i Söylemez, 2004). Nadalje, ove oksidaze koriste molekularni kisik, stoga je njihova aktivnost u tijestu vremenski prilično ograničena (Joye i sur., 2012). Jasno je da se tijekom izrade kruha odvijaju složeni biokemijski procesi u prisustvu enzima iz posija. Iako posebno odabrane amilaze, ksilanaze, peptidaze i lipaze mogu imati pozitivne učinke u malim koncentracijama, uobičajeno će pokazivati štetne učinke, posebno ako su nekontrolirani uvjeti i ako su prisutni u visokim koncentracijama. Za razliku od toga, oksidoreduktaze, poput lipooksigenaze i peroksidaze, rezultiraju pozitivnim učincima na glutensku mrežu, a samim time i na volumen kruha, no mogu loše utjecati na okus i boju. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdila stvarna važnost enzima iz pšeničnih posija prilikom izrade kruha, budući da je dosada proveden ograničen broj radova na temelju kojih bi se mogao izvući točan zaključak.

Razina enzima prisutnih u posijama ovisi o raznim parametrima, kao što su način mljevenja, sorta i fiziološki stadij jezgre (Every i sur., 2002; Dornez i sur., 2006a). Na primjer, klijanjem zrna pšenice znatno će se povećati sama sinteza enzima, a time i njihova aktivnost u posijama. Nadalje, iako je većina enzima u pšenici endogenog podrijetla, u pšeničnim posijama su prisutni i enzimi egzogenog podrijetla. Endoksilanaze pronađene u ili na pšeničnim posijama sastoje se od velike većine mikrobnih endoksilanaza i malog broja endogenih endoksilanaza (Dornez i sur., 2006b). Međutim, aktivnost takvih mikrobnih enzima iz pšenice tijekom izrade kruha može biti ograničena zbog prisutnosti inhibitora (Dornez i sur., 2008). Enzimi iz posija općenito ne mogu pokazati optimalnu aktivnost tijekom izrade kruha zbog loše dostupnosti supstrata u tijestu te neoptimalne temperature i pH vrijednosti. Stoga, ukupna enzimaska aktivnost pšeničnih posija i njezin rezultirajući utjecaj na postupak izrade kruha mogu se značajno razlikovati među različitim uzorcima posija, što je vrlo teško predvidjeti.

2.4. Potencijalna primjena pšeničnih posija u prehrambenoj industriji

Zbog povećanja svjetske populacije i naglog rasta cijena pšenice, riže i kukuruza, razvoj novih prehrambenih proizvoda od cjelovitih žitarica, brašna od više vrsta žitarica i integralnog brašna sve više privlači pažnju znanstvenika diljem svijeta. Takvi proizvodi imaju povećanu nutritivnu vrijednost, odnosno veći sadržaj fenolnih kiselina i antioksidacijski kapacitet, a samim time i pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje u usporedbi s proizvodima od rafiniranog brašna ili brašna od jedne vrste žitarica (Noorfarahzilal i sur., 2014). Integralno brašno sadrži posije koje su bogate mineralima, bjelančevinama i određenim bioaktivnim sastojcima poput

ferulinske kiseline koji štite ljudski organizam od pretilosti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije i određenih karcinoma (Fardet, 2010; Lillioja i sur., 2013; Andersson i sur., 2014). Posije, nusprodukti u tehnologiji žitarica, smatraju se funkcionalnim prehrambenim sastojcima jer su jeftin i obilan izvor prehrambenih vlakana, minerala, vitamina, fenolnih kiselina i fitosterola, a primjenjuju se kao dodatak u pripremi različitih vrsta hrane (Rose i sur., 2010; Onipe i sur., 2015).

Pšenične posije mogu se dodavati u proizvode od žitarica na dva načina. Brašno se ili nadopunjuje posijama ili se posije miješaju zajedno s klicama i brašnom u njihovom prirodnom omjeru prisutnom u zrnu pšenice, čime se dobiva brašno od "cjelovitih žitarica". Što se tiče same primjene posija u proizvodnji hrane, dosada su se posije različitih pšeničnih sorti ugrađivale u pšenično brašno u udjelima od 0 %, 12,5 %, 25% i 37,5 % u pripremi ekstrudiranih grickalica. Ugradnja ljubičastih i crvenih pšeničnih posija povećalo je kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) u snack proizvodima zbog čega su predložene kao funkcionalni sastojak hrane (Fleischman i sur., 2016). Također, tjestenina obogaćena ekstraktima antioksidanasa dobivenih iz durum pšeničnih posija te njena konzumacija pokazala je antioksidacijsko djelovanje na ljudima (Laus i sur., 2017). Brojna istraživanja pokazala su štetan utjecaj pšeničnih posija u proizvodnji kruha i kakvoću kruha u smislu funkcionalnih i senzorskih svojstava (Campbell i sur., 2008; Seyeri Gelinis 2009). Uglavnom, dodavanje posija u brašno rezultira neželjenim utjecajima na svojstva tijesta, volumen kruha, boju, teksturu i okus. Takvi štetni učinci su izraženiji s povećanjem razine zamjene pšeničnog brašna posijama (Zhang i Moore 1999) (Slika 2). U istraživanju Schmiele i suradnika (2012) dobiveno je smanjenje specifičnog volumena s $4,4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ na $1,8 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ukoliko se do 40 % pšeničnog brašna zamijeni pšeničnim posijama. Također, primjetili su i značajno povećanje čvrstoće i tvrdo ćete tamniju boju sredine kruha prilikom dodavanja pšeničnih posija ili integralnog brašna u većim koncentracijama, što se može povezati s manjim specifičnim volumenom kruha. Međutim, Salmenkallio-Marttila i suradnici (2001) proučavali su utjecaj fermentacije posija na proizvodnju kruha i otkrili da duga fermentacija (16 h) kvascem i bakterijama mliječnih kiselina povećava specifični volumen kruha i poboljšava čvrstoću sredine te rok trajanja kruha s 20% dodanih posija. Da bi se dodatno poboljšala tehnološka i funkcionalna svojstva hrane proizvedene od cjelovitog zrna pšenice, mogu se dodavati fitaze tijekom postupka izrade kruha, što rezultira poboljšanim specifičnim volumenom kruha i mekoćom sredine te većom bioraspoloživosti minerala (Larrea i sur., 2005; Haros i sur., 2001).



Slika 2. Učinak dodavanja različitih količina posija na volumen kruha: kruh bez dodatka posija i kruh s 5%, 10%, 15% i 20% pšeničnih posija (s lijeva na desno) (Hemdane i sur., 2015)

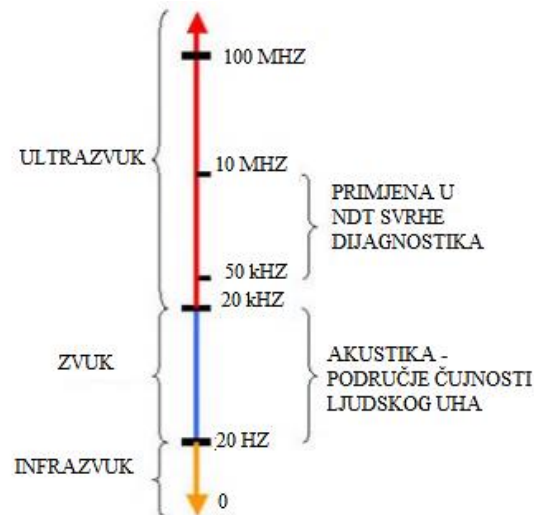
Iako proizvodnja prehrambenih proizvoda od višezrnatih i cjelovitih žitarica ima pozitivan utjecaj na zdravlje te promiče upotrebu nusprodukata u tehnologiji žitarica, negativne promjene u tehnološkim karakteristikama i prihvatljivosti potrošača takvih proizvoda ključan su izazov s kojim se suočavaju tehnolozi prilikom njihove primjene u prehrambenoj industriji.

2.5. Ultrazvuk

Ultrazvuk se temelji na mehaničkim valovima frekvencije iznad 16 kHz te ga ljudsko uho ne može čuti. Ti valovi putuju kroz veći dio materijala ili na njegovu površinu brzinom koja je karakteristična za prirodu vala i materijal kroz koji se šire (Povey i McClements, 1988; Knorr i sur., 2004). S obzirom na različite frekvencije, oni imaju različitu primjenu i razinu snage.

Donedavno je većina primjena ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji uključivala nerazorne analize koje se posebno odnose na procjenu kvalitete te takve ultrazvučne valove niskog intenziteta karakterizira visoka frekvencija (1-10 MHz) i mala razina snage (manje od 1 W cm⁻²). Oni ne uzrokuju fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koje prolaze i mogu se primijeniti u analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane te za površinsko čišćenje hrane, utjecaj na enzime, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, kristalizaciju, emulgiranje, filtraciju, procese sušenja i smrzavanja, kao i za omekšavanje mesa. Nasuprot tome, ultrazvučne valove visokog intenziteta karakterizira niska frekvencija (20 do 100 kHz) te visoka razina snage (10 do 1000 W cm⁻²). Takvi valovi, zbog velike snage kojom

djeluju na materijal, uzrokuju fizička oštećenja tkiva kao i određene kemijske reakcije. Ultrazvuk visokog intenziteta, tijekom prolaska kroz materijal, uzrokuje ubrzavanje kemijskih reakcija, povećavanje brzine difuzije, dispergiranje agregata, ali i uništenje enzima i mikroorganizama (Herceg i sur., 2009a).



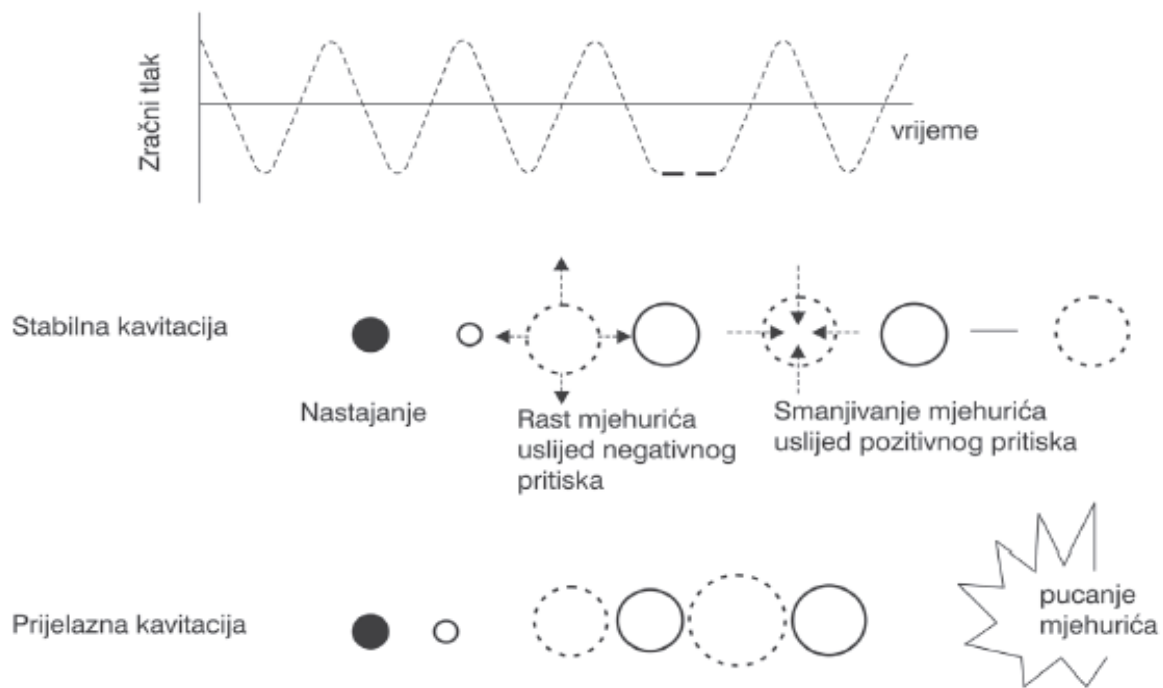
Slika 3. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Mihaljević, 2007)

2.5.1. Primjena i mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta

Komponente ultrazvučnog generacijskog sustava visokog intenziteta su: generator snage, pretvarač i odašiljač (Abesinghe i sur., 2019). Ultrazvučni valovi stvaraju se pomoću pretvarača koji tvore pouzdano i stabilno ultrazvučno polje koristeći električnu energiju koju proizvodi generator snage. Ta energija pretvara se u mehaničku energiju u obliku ultrazvučnih vibracija koje se na prehrambeni proizvod primjenjuju izravno pomoću sondi ili neizravno pomoću ultrazvučnih kupelji (Arvanitoyannis i sur., 2017). Uobičajeno se upotrebljavaju tri tipa pretvarača - s tekućinom, magnetostriktivni i piezoelektrični pretvarač koji se ujedno i najčešće koristi. Specifičan tip ultrazvučnog pretvarača se sastoji od dva diska piezoelektrične keramike složene poput sendviča između dva identična metalna bloka. Dva diska se polariziraju u suprotnim smjerovima i razdvajaju elektrodom spojenom na izvor snage (Režek Jambrak i sur., 2010; Drmić i Režek Jambrak, 2010). Odašiljač je odgovoran za ispuštanje vala iz pretvarača u medij. Uređaji za ultrazvuk visokog intenziteta koji se koriste u laboratorijskim razmjerima klasificirani su kao izravni tipovi s ultrazvučnim sondama, za koje je karakteristično izravno rasipanje akustične energije iz pretvarača u uzorak. Takav sustav ima klin u pretvaraču,

odgovoran za pojačavanje signala te slanje signala u uzorak. Neizravne tipove, sa ultrazvučnim kupeljima, karakterizira neizravno rasipanje akustične energije iz pretvarača u uzorak, koristeći tekućinu za spajanje, a to je najčešće voda (Abesinghe i sur., 2019).

Primjena ultrazvuka stvara zvučne valove, koji uzrokuju kompresiju i razrjeđivanje čestica u mediju te kolaps mjehurića, što izaziva kavitaciju (Zhang i sur., 2019). Odnosno, kod određenog intenziteta ultrazvuka dolazi do trenutka kada međumolekularne sile pucaju, gubi se kohezivnost medija i dolazi do stvaranja mikroskopskih šupljina. Tu šupljinu nazivamo kavitacijskim mjehurićem, a sam proces akustičnom kavitacijom. Sposobnost ultrazvuka da uzrokuje kavitaciju ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvencija i intenzitet), svojstvima proizvoda (viskoznost i površinska napetost) i uvjetima okoline (temperatura i tlak) (Soria i Villamiel, 2010). Temperatura i tlak se povećavaju unutar implodirajućih mjehurića, generirajući valove visokog smicanja i turbulencije u zoni kavitacije (Arvanitoyannis i sur., 2017). Zbog oscilacije tlaka u mediju, mjehurići osciliraju te u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje u fazi kompresije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kada veličina mjehurića dosegne kritičnu vrijednost, oni se raspadaju tijekom ciklusa kompresije i stvara se prolazna vruća točka. Raspadom kavitacijskih mjehurića stvaraju se ekstremni lokalni uvjeti koji uključuju povećanje temperature i tlaka čije se vrijednosti procjenjuju na 5000 - 5050 K i 50 - 5000 atm. Takva pojava naziva se prijelazna kavitacija (Slika 4). Osim prijelazne, postoji i stabilna kavitacija koja označava samo promjene u obliku ili veličini mjehurića, dok ne nastupi implozija mjehurića. Ovi uvjeti značajno ubrzavaju kemijsku reaktivnost medija te kombinacija takvih događanja izaziva fizikalne i kemijske promjene u proizvodima (Režek Jambrak i sur., 2010). Zbog fenomena kavitacije tretman ultrazvukom visokog intenziteta primjenjuje se u brojnim procesima u prehrambenoj industriji (Pingret i sur., 2013), kao što su razgradnja čestica, promjena strukture spojeva, ubrzavanje prijenosa mase ili za uništavanje staničnih membrana, homogenizaciju, sterilizaciju, emulgiranje, disperziju, stvaranje aerosola, odmašćivanje, ekstrakciju (npr. bjelančevine), kristalizaciju, smrzavanje, otplinjavanje, filtraciju, sušenje, reakcije oksidacije / redukcije, inaktivaciju enzima (Mason i Paniwnyk, 1996; Knorr i sur., 2004.; Dolatowski i sur., 2007; Torley i Bhandari, 2007; Vilkhui i sur., 2008).



Slika 4. Princip stabilne i prijelazne kavitacije (Kuijpers i sur., 2002; Herceg i sur., 2009a)

Ultrazvuk visokog intenziteta primjenjuje se u procesima proizvodnje, konzerviranja i sigurnosti hrane, budući da njegovom primjenom dolazi do fizičkih, mehaničkih, kemijskih ili biokemijskih promjena (Awad i sur., 2012). Većina istraživanja temelji se na frekvencijskom području od 20 kHz do 40 kHz, što se objašnjava najučinkovitijim djelovanjem u smislu djelovanja kavitacija. Ultrazvuk visokog intenziteta s frekvencijom između 20 kHz i 40 kHz i intenzitetom snage većim od 10 Wcm^{-2} široko se primjenjuje u mljekarskoj industriji, posebice u tehnologiji jogurta i sladoleda (Ashokkumar, 2015). Također koristi se kao procesna tehnika mikrobne inaktivacije zbog svojih prednosti, kao što su minimalizacija gubitaka hranjivih tvari i okusa te značajna ušteda energije u usporedbi s uobičajenom toplinskom obradom. Mikrobna inaktivacija ultrazvučnim tretmanom uglavnom je posljedica akustične kavitacije i njezinih fizičkih, mehaničkih i kemijskih učinaka koji inaktiviraju bakterije i bakterijske nakupine na način da oštećuju bakterijske stanice, što dovodi do njihove smrti (Awad i sur., 2012; Huang i sur., 2017). Glavni mehanizmi koji osiguravaju staničnu smrt proizlaze iz stanjivanja staničnih membrana, lomljenja i rezanja staničnih stijenki, stvaranja slobodnih radikala i lokaliziranog zagrijavanja koji oštećuje stanične strukturne i funkcionalne komponente poput DNA (Beatty i Walsh, 2016; Cameron i sur., 2009; Chandrapala i Leong, 2015). Međutim, zbog stvaranja ekstremno visoke lokalizirane temperature i pritiska, mogu se formirati slobodni radikali, koji izazvaju različite kemijske učinke. Kod vode, koja služi kao otapalo u preradi hrane, uvjeti kavitacije mogu razbiti O-H vezu, što dovodi do stvaranja H i OH radikala i drugih

rekombiniranih produkata, kao što je vodikov peroksid. Primjenom u prehrambenoj industriji ti radikali mogu izazvati oksidaciju lipida i time uzrokovati gumeni okus i aromu zbog različitih hlapljivih organskih spojeva dobivenih lipidnom oksidacijom. Nadalje, ove neželjene reakcije mogu se smanjiti primjenom ultrazvuka visokog intenziteta frekvencije 20 kHz, gdje je količina slobodnih radikala beznačajna (Chandrapala i Leong, 2015; Riener i sur., 2009; Shershenkov i Suchkova, 2015).

Jedna od važnijih primjena ultrazvuka prilikom obrade hrane je mogućnost inhibicije enzima. Još 1937. godine Chambers je objavio da se izolirani pepsin inaktivira primjenom zvuka vjerojatno kao posljedica kavitacije. Peroksidaza, enzim koji se nalazi u većini namirnica biljnog porijekla, posebice se povezuje sa pospješivanjem gubitka okusa i posmeđivanja. Aktivnost peroksidaze se postupno smanji za 90 % ako se tretira ultrazvukom kroz period od 3 sata (Povey i Mason, 1995). Ipak, utjecaj djelovanja ultrazvuka na enzime ne može se generalizirati. Dok se oksidaze uspješno inaktiviraju djelovanjem ultrazvuka utjecaj djelovanja ultrazvuka na katalaze ima učinka samo pri malim koncentracijama, dok su reduktaze i amilaze visoko otporne na utjecaj ultrazvuka.

U tehnologiji žitarica tretman ultrazvukom služi kao učinkovita metoda modifikacije škroba, pokazuje razne prednosti u području kvalitete i veće selektivnosti, zatim ograničene primjene kemikalija i kraće vrijeme obrade te se stoga smatra ekološkom metodom obrade. Može se koristiti na nativnim škrobnim granulama suspendiranima u otopini kao i na želatiniziranom škrobu (Zuo i sur., 2009). Ultrazvukom se uglavnom uništava amorfno područje granula škroba, jer njihov oblik i veličina ostaju nepromijenjeni, ali njihova površina postaje porozna i poboljšavaju se fizikalno-kemijska svojstva poput promjene snage bubrenja, topljivosti i parametara lijepljenja (Sujka i Jamroz, 2013). U obradi i konzerviranju hrane ultrazvuk također pokazuje korisne učinke kao što su veći prinos proizvoda, smanjeni troškovi rada i održavanja s poboljšanim karakteristikama kvalitete, uništavanje patogena itd. (Patist i Bates, 2008).

Trenutno se ultrazvuk visokog intenziteta najčešće koristi za čišćenje, odzračivanje tekućina, homogenizaciju tekućina, sušenje, ekstrakciju, destilaciju i uklanjanje nepoželjnih mikroorganizama. Smatra se potencijalnim tehnološkim postupkom netoplinske obrade hrane, budući da može uzrokovati eliminaciju enzima i mikroorganizama te poboljšati stvaranje emulzija i disperzija ili promociju određenih kemijskih reakcija (Herceg i sur., 2009b). Međutim, ovaj tretman ne samo da poboljšava kvalitetu i sigurnost hrane, već pruža i mogućnosti razvoja novih prehrambenih proizvoda s jedinstvenim svojstvima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

U ovom radu kao uzorak koristile su se pšenične posije iz proizvodnog pogona PJ Mlin Farina tvrtke Granolio d.d. (Hrvatska) sa svrhom određivanja utjecaja različitih tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na njihova fizikalno-kemijska svojstva, aktivnost polifenol oksidaze, udjel ukupnih polifenola te antioksidacijsku aktivnost. U posijama je određen udjel prehrambenih vlakana i raspodjela veličine čestica.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje udjela topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana (prema metodi AOAC 2011.25)

Reagensi:

- 1) 95 %-tni etanol (Kefo, Hrvatska)
- 2) 78 %-tni etanol
- 3) Aceton, pro analysi (Gram-mol, Hrvatska)
- 4) Enzimi (Megazyme International, Irska)
 - pankreasna α -amilaza (E-BLAAM); 3000 Ceralpha Units ml⁻¹
 - proteaza (E-BSPRT); 50 mg mL⁻¹; 350 Tyrosine Units ml⁻¹
 - amiloglukozidaza (E-AMGDF); 200 pNP β -maltoside Units ml⁻¹ (ili 3,300 Units ml⁻¹)
- 5) Destilirana voda
- 6) Celit (filtracijsko sredstvo, dijatomejska zemlja) (Megazyme, Irska)
- 7) 50 mM otopina natrij-maleatnog pufera; pH = 6,0 s 2 mM CaCl₂
- 8) Trizma Base (Sigma cat. no. T-1503); 0,75 M
- 9) 2 M otopina octene kiseline, (Priprema: iz ledene octene kiseline, 99,5 %, Macron)
- 10) D-sorbitol (interni standard), Megazyme kit
- 11) 6,0 M otopina NaOH
- 12) Otopina MES-TRIS pufera- svaki 0,05 M; pH = 8,2 pri 24 °C
- 13) 37 %-tna otopina HCl (Panreac Quimica SLU, Španjolska)

- 14) 0,561 M otopina HCl
- 15) 5 %-tna otopina NaOH
- 16) 5 %-tna otopina HCl

Aparatura i pribor:

- 1) Staklene čaše
- 2) Laboratorijske boce, 500 mL i 1 L
- 3) Stakleni filter lončići (50 mL, veličina pora 40 - 60 μm)

Priprema lončića za upotrebu: lončići se stave u mufolnu peć na 525 °C preko noći. Celite i pepeo se maknu koristeći vakuum. Lončići se stave u Labex, otopinu za pranje na sobnu temperaturu u trajanju od 1 h, a ispiru se vodovodnom i destiliranom vodom. Za zadnje ispiranje koristi se 15 mL acetona i lončići se ostave sušiti na zraku. U posušene lončiće doda se 1 g Celite i stavi sušiti na 130 °C u sušionik do konstantne mase. Lončići se hlade u eksikatoru oko 1 h, nakon toga se izvažu i zabilježi im se masa.

- 4) Boca za odsisavanje, 500 mL
- 5) Stakleni lijevak za filtraciju
- 6) Gumeni prsten
- 7) Izvor vakuuma
- 8) Vodena kupelj s tresilicom
- 9) Laboratorijska vaga
- 10) Staklena menzura, 50 i 500 mL
- 11) Sušionik
- 12) Štoperica
- 13) Eksikator
- 14) pH metar, JENWAY 3510 (UK)
- 15) mikropipete (50 - 200 μm i 5 ml) i nastavci, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- 16) magnetska miješalica (IKA® RT5, Staufen im Breisgau, Njemačka)
- 17) špatula
- 18) mufolna peć

Postupak rada:

Priprema uzoraka: Odvaže se $1,000 \pm 0,005$ g nesamljevenog uzorka ($>500 \mu\text{m}$) u duplikatu u 250 mL Duran boce s čepom. Uzorak se navlaži s 1 mL 95 %-tnog etanola. Doda se 40 mL

maleatnog pufera (pH=6) koji sadrži pankreasnu α – amilazu i aminoglukozidazu. Uzorci se inkubiraju u vodenoj kupelji s treslicom (nakošeni pod kutomod 45° , ali ne nužno) na 37°C točno 16 sati, pod brzinom trešnje 120 rpm. Nakon toga doda se 3,0 mL 0,75 M trizma bazične otopine (konačni pH=8,2). Boce smalo olabavljenim čepom se stave u (drugu) kupelj na $95 - 100^\circ\text{C}$ na 20 minuta, pri čemu se temperatura provjerava termometrom (temperatura u boci treba biti $> 90^\circ\text{C}$). Boce se povremeno protresu rukom. Uzorci se ohlade na 60°C , pri čemu se temperatura provjerava uranjanjem termometra. Zatim se doda 100 μL otopine proteaze i inkubira na 60°C 30 minuta, uz trešnju. Boce se izvade iz kupelji i odmah se doda 4,0 mL 2M octene kiseline (konačni pH 4,3) i 1 mL internog standarda (D – sorbitol, c = 100 mg mL⁻¹).

3.2.1.1. Određivanje netopljivih prehrambenih vlakana

Za netopljiva vlakna, prethodno osušen i izvagan lončić s celitom se namoči s otprilike 15 mL 78%-tnog etanola pomoću boce štrcaljke, zatim se poravna i posuši pod vakuumom da bude mat. Potom se otopina uzorka i enzima profiltrira te ispere (Duran boca i ostatak) sedam puta s po 5 mL destilirane vode zagrijane na 60°C . Sakupljenom filtratu podesi se volumen na 85 mL i sačuva se za određivanje topljivih vlakana. Ostatak na lončiću se isperesa po dvije porcije od 15 mL slijedećeg: 78 %-tni etanol, 95%-tni etanol i aceton. Filtrat od ispiranja se baca, a lončići se osuše na 105°C preko noći i nakon hlađenja izvažu. Masa taloga izračuna se na način da se oduzme masa lončića i celita od mase osušenog lončića i celita sa uzorkom. Za izračun netopljivih vlakana velike molekulske mase (IDF) potrebno je odrediti količinu pepela (metoda je opisana u poglavlju 3.2.2.) i količinu proteina (metoda je opisana u poglavlju 3.2.3.).

3.2.1.2. Određivanje topljivih prehrambenih vlakana

Za određivanje topljivih vlakana velike molekulske mase (SDFP) potrebno je zagrijati otprilike 70 mL filtrata na 60°C te dodati 340 mL (volumen izmjeren na sobnoj temperaturi) 95 %-tnog etanola zagrijanog na 60°C i dobro promiješati. Pripremljena otopina taloži se na sobnoj temperaturi 60 minuta. Nakon taloženja se uzorak filtrira pod vakuumom kroz prethodno osušene i izvagane lončice s celitom. Najprije se celit namoči s otprilike 15 mL 78 %-tnog etanola pomoću boce štrcaljke, poravna i posuši pod vakuumom da bude mat. Uzorak se profiltrira kroz lončić, s tim da se sadržaj boce kvantitativno prenese preko lončića s 78 %-tnim

etanolom (sedam puta po 5 mL). Ostatak na lončiću se ispere sa po dvije porcije od 15 mL slijedećeg: 78 %-tni etanol, 95 %-tni etanol i aceton te se osuši preko noći na 105 °C. Filtrat se sačuva za određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS). Nakon sušenja ohlađeni lončić s ostatkom se izvaže. U jednom ostatku se odredi udio proteina po Kjeldahlu ($f=6,25$), a u drugom paralelnom ostatku se odredi udjel pepela spaljivanjem na 525°C 5 h. Ostatak korigiran za udjel proteina i pepela predstavlja netopljiva i topljiva vlakna velike molekulske mase (HMWDF).

3.2.1.3. Određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS)

Za određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS) polovina oba filtrata prenese se u tikvicu za otparavanje od 500 mL (svaki zasebno) i otpari do suha na rotavaporu pod vakuumom na 60 °C. Tikvica se ispere s 5 mL deionizirane vode i okreće oko 2 min dok se sve ne otopi. Otopina se prenese u polipropilensku bočicu s čepom od 20 mL ako se za daljnju analizu ostavlja do drugog dana. Potom je uzorak potrebno deionizirati tako da se 2 mL otopine prenese na kolonu za deionizaciju s kationskim i anionskim (Amberlite i Ambersep) smolama dobro izmiješanim neposredno prije primjene. Na koloni se eluira brzinom 1 mL min⁻¹ (~1 kap u 3 sekunde). Protok se prilagodi laganim zakretanjem ventila kolone. Eluat se sakuplja u okruglu tikvicu od 250 mL za rotavapor (ili Falcon epruvetu od 50 mL smještenu u kadnicu manifolda). Kad uzorak uđe među smole, doda se 2 mL deionizirane vode na vrh kolone. Nakon što to prođe kroz kolonu, doda se još ~20 mL deionizirane vode na vrh kolone i eluira istom brzinom. Potom se eluat upari do suha na rotavaporu na 60°C. U tikvicu se doda 2 mL deionizirane vode i provrti 2 min kako bi se otopili šećeri. Otopina se pipetom prenese u polipropilensku posudu za čuvanje do analize. Potom se otopina preko šprice filtrira preko 0,45 µm filtera. Tako pripremljen uzorak se injektira u HPLC s RI detektorom. Mobilnu fazu čini otopina Na₂Ca-EDTA u vodi (50 mgL⁻¹), s protokom 0,5 mLmin⁻¹. Kolona se grije na temperaturu od 80°C. Vrijeme propuštanja uzorka kroz kolonu je 30 min. Za kvantifikaciju je potrebno kroz HPLC propustiti i otopine glukoze konc. 5, 10 i 20 mgmL⁻¹ (tri puta). Propuste se i interni standard (D-sorbitol, 0,1 mgmL⁻¹, tri puta) i standardi za utvrđivanje retencijskih vremena (maltoza i maltodekstrini) koji su sadržani u enzimskom setu. Odredi se vrijeme razgraničenja između maltoze (disaharid, DP 2) i oligosaharida (DP 3). Nakon toga se odredi površina svih pikova sa stupnjem polimerizacije većim od točke razgraničenja za DP2/DP3. Ukupan zbroj predstavlja SDFS.

3.2.1.4. Određivanje količine pepela

Metoda za određivanje pepela modificirana je i rađena prema protokolu opisanom u metodi za određivanje prehrambenih vlakana - AACC 32 - 05.01 metode za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana i AACC 32 - 21.01 metode za određivanje topljivih/netopljivih prehrambenih vlakana (Megazyme International Ireland, 2016).

Aparatura i pribor:

- 1) Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
- 2) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 3) Mufolna peć s regulatorom temperature
- 4) Laboratorijska kliješta

Postupak rada:

Lončići za određivanje prehrambenih vlakana se stave u hladnu mufolnu peć te spaljuju 5 sati nakon postizanja odgovarajuće temperature na 525 °C +/- 20 °C. Izgaranje se smatra završenim kad je ohlađeni uzorak bijele boje. Kad se izgaranje završi, posuda se hladi u eksikatoru do sobne temperature. Nakon hlađenja, uzorak se brzo izvaže. Količina pepela iskazuje se prema postocima mase prema suhoj tvari i izračunava prema formuli:

$$\text{Količina pepela(\%)} = m_1 * \frac{100}{m_0} * \frac{100}{100 - v}$$

gdje su:

m_0 = masa ispitanog uzorka [g]

m_1 = masa ostatka [g]

v = količina vode u ispitanom uzorku [%]

3.2.1.5. Određivanje sadržaja dušika (proteina) po Kjeldahl-u

Sadržaj proteina određuje se prema normi HRN ISO 1871 : 1999 (ISO 1871 : 1975 (E)) ICC 105 / 2 i metodi AACC 46 - 12.

Reagensi:

- 1) Konc. H₂SO₄, (Carlo Erba Reagents, Francuska)
- 2) 40% NaOH (T.T.T. d.o.o., Hrvatska)
- 3) 4% H₃BO₃ (Gram-mol, Hrvatska)
- 4) Katalizator: Kjeldahl-ove tablete (bez žive i selena) (Merck KGaA, Njemačka)
- 5) HCl, 0,1 N titrival

- određivanje faktora otopine (F) HCl ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) s Na₂CO₃
 - Na₂CO₃ se osuši na 250 °C i ohladi se u eksikatoru
 - odvažuje se 0,15 - 0,2 g Na₂CO₃ na desetinu miligrama
 - otopi se u 100 ml vode
 - titrira se kiselinom ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) uz metil-crvenilo do promjene boje iz žute u crvenu
 - kuhanjem se istjera CO₂ i ponovno se titrira do crvene boje
- Faktor otopine se odredi prema formuli:

$$F = \frac{2 \cdot 1000 \cdot m(\text{Na}_2\text{CO}_3)}{V(\text{HCl}) \cdot 106,004 \cdot 0,1}$$

- 6) obojeni indikator (kada se upotrebljava ručna ili kolorimetrijska titracija)
 - 1 % metil-crvenilo - otopi se 100 mg u 100 ml 95 % alkohola
 - 1 % bromkrezol-zeleno - otopi se 100 mg u 100 ml 95 % alkohola
- 7) Destilirana voda

Aparatura i pribor:

- 1) laboratorijska vaga
- 2) uređaj za mineralizaciju
- 3) Kjeldahl-ove kivete za mineralizaciju sa stalkom
- 4) Učinkoviti sustav za odvod pare: aspirator ili pročistač plina ili tekuća voda
- 5) Uređaj za destilaciju
- 6) Posudice za vaganje

- 7) 25 mL birete (graduacija = 0,1 mL)
- 8) 250 mL Erlenmayerove tikvice
- 9) 10 mL dispenzeta za konc. H₂SO₄
- 10) 25 mL dispenzeta za bornu kiselinu

Postupak rada:

U Tecator kivete metodom dvostrukog vaganja stavi se uzorak vlakna. U svaku kivetu se doda 1 tableta Kjeldahl katalizatora i 12 ml koncentrirane sulfatne kiseline te se lagano miješa dok se uzorak potpuno navlaži kiselinom. Nakon toga se stalak s epruvetama stavi u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i uključi se sistem za odvod pare. Mineralizacija je završena nakon otprilike 60 minuta, a tekućina u epruvetama je bistra i svjetlo-zelene boje. Epruvete se sa stalkom izvade iz digestijske jedinice i ostave hladiti zajedno s poklopcem do sobne temperature. Nakon hlađenja se u svaku epruvetu stavi 80 ml destilirane vode.

Za vrijeme trajanja mineralizacije za svaki uzorak pripremi se jedna Erlenmayer tikvica od 250 mL te se u njih stavi 25 mL borne kiseline i 3 kapi indikatora.

Uključi se aparat za destilaciju, pusti se voda da se napuni generator pare (ventil ispuštanja vode mora biti zatvoren) te se na postolje predviđeno za prihvatnu tikvicu stavi prazna tikvica, a na mjesto predviđeno za Kjeldhalovu kivetu stavi se prazna kiveta. Pokrene se generator pare. Nakon što se u prihvatnu tikvicu skupi kondenzat, otvore se zaštitna vratašca te se prihvatna tikvica zamijeni tikvicom u koju je stavljeno 25 ml borne kiseline (destilacijska cjevčica mora biti uronjena u otopinu), a Kjeldhalova kiveta se zamijeni kivetom u koju je stavljen spaljeni uzorak i 80 ml destilirane vode te se ponovno zatvore vratašca. Dozira se 50 ml 40 %-tnog NaOH u Kjeldhalovu kivetu i pokrene se destilacija koja se odvija oko 4 minute (do volumena 125 ml). Dobiveni destilat je zelene boje (ukazuje na prisustvo amonijaka) te mora biti hladan jer u protivnom dolazi do gubitka amonijaka. Nakon završetka destilacije, Kjeldhalova kiveta se isprazni u izljev uz puštanje hladne vode, a destilat se titrira kloridnom kiselinom te se zabilježi utrošak.

Slijedi titracija koja se vrši pomoću birete koja je napunjena 0,1 N HCl-om te se titrira izravno u prihvatnu tikvicu. Titracija je završena kada se boja otopine promijeni u blijedo ružičastu (Novak, 2017).

Masa proteina izračunava se na slijedeći način:

$$\%N = \frac{\{(a-b) \cdot N_{\text{kis.}} \cdot f_{\text{kis.}} \cdot 1,4007\}}{m \text{ uzorak}}$$

gdje su:

a = volumen HCl utrošen za titraciju uzorka [mL]

b = volumen HCl utrošen za titraciju slijepa probe [mL]

N = molaritet kiseline

f = faktor kiseline

m = masa uzorka (talog u lončiću nakon sušenja) [g]

$$\% \text{ bjelančevina} = \%N * F$$

gdje je:

F = faktor za preračunavanje dušika u bjelančevine (6,25)

3.2.2. Tretiranje uzoraka ultrazvukom visokog intenziteta

Aparatura i pribor:

- 1) laboratorijska vaga
- 2) UVI procesor dr. Hielscher GmbH, Ultraschallprozessor UP 400s (Njemačka)
- 3) staklena čaša od 250 mL
- 4) menzura
- 5) stakleni štapić
- 6) plastične posude (urinarke)
- 7) pH metar
- 8) termometar

Postupak rada:

Pripremi se 15 %-tna suspenzija pšeničnih posija na način da se u staklenu čašu od 250 mL odvaži 15 g nesamljevenog uzorka pšeničnih posija te se doda 100 mL destilirane vode. Pripremljena suspenzija se dobro promiješa staklenim štapićem. Prije svakog tretmana ultrazvukom uzorcima se mjeri temperatura i pH.

Uzorci se tretiraju ultrazvukom visokog intenziteta na uređaju dr. Hielscher GmbH, Ultraschallprozessor UP 400s (Njemačka) sondom promjera 22 mm. Snaga ultrazvuka iznosi

je 400 W i frekvencija 24 kHz. Uzorak 15%-tne suspenzije pšeničnih posija postavlja se na postolje u izoliranoj komori tako da je sonda ultrazvuka uronjena u uzorak 1 cm. Na generatoru zvuka namještene su postavke tretmana, amplituda zvučnog vala i način rada (cycle, ciklus), te je uključen generator zvuka. Pripremljene 15%-tne suspenzije pšeničnih posija tretirane su pri različitim amplitudama zvučnog vala i to pri 100%, 60% i 80% amplitude uz puni (jedinični) ciklus i tretirane su u različitim vremenskim intervalima od 5 min, 10 min i 15 min. Različiti uvjeti tretmana uzoraka ultrazvukom visokog intenziteta prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti tretmana ultrazvukom visokog intenziteta

Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme (min)
1.	100	15
2.	100	5
3.	60	15
4.	60	5
5.	80	10

Radi bolje procjene utjecaja ultrazvuka visokog intenziteta na sastav pšeničnih posija i njihovu antioksidacijsku aktivnost pripremljen je i kontrolni uzorak 15 %-tne suspenzije pšeničnih posija kod kojeg nije proveden tretman ultrazvukom visokog intenziteta. Svi ostali postupci na tom uzorku provedeni su kao i kod ostalih uzoraka koji su tretirani ultrazvukom visokog intenziteta.

3.2.2.1. Liofilizacija

Nakon UVI tretmana svaki uzorak je dekantiran u plastične posudice u debljini sloja od 1-2 cm te smrznut na -20 °C do početka liofilizacije. Uzorci se prije liofilizacije dodatno smrzavaju na -80 °C tijekom 24 h. Sam proces liofilizacije traje 43 h odnosno dok temperatura uzorka ne postigne sobnu temperaturu. Osušeni uzorak se homogenizira i koristi za ekstrakciju. Nakon liofilizacije provodi se homogenizacija uzoraka koju je potrebno dobro provesti, a

provodi se na način da se najprije uzorci jako dobro izmiješaju sa staklenim štapićem unutar jedne plastične posudice kako bi se ponovno postiglo prvobitno stanje uzoraka, a zatim se pomiješaju isti uzorci iz različitih plastičnih posudica u jednu veću plastičnu posudu. Osušanim uzorcima se zatim određuje udjel vode.

3.2.3. Određivanje udjela vode

Količina vode u pšeničnim posijama određuje se metodom koja je određena Pravilnikom o metodama fizikalno-kemijske analize za žita i mlinske proizvode 28 / 11. Podatak količine vode u uzorcima je iskorišten za izračun dobivenih rezultata na masu suhe tvari pšeničnih posija.

Aparatura i pribor:

- 1) Metalna zdjelica
- 2) Sušionik ST-01/02, Instrumentaria
- 3) Eksikator sa silicagelom i indikatorom zasićenosti
- 4) Laboratorijska žlica
- 5) Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,001 g

Postupak rada:

U prethodno osušenu i izvaganu metalnu zdjelicu izvaže se $2 \pm 0,0005$ g uzorka. Za određivanje količine vode u uzorcima pšeničnih posija otvorena zdjelica s uzorkom i poklopcem se stavi u sušionik zagrijan na $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 90 minuta. Nakon sušenja zdjelica se izvadi iz sušionika, pokrije poklopcem te se stavi hladiti u eksikator, a nakon hlađenja važe. Za svaki uzorak rade se dvije paralele, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Sušenje se ponavlja u trajanju od 30 minuta sve do konstantne mase. Količina vode u uzorku prikazuje se u postocima, a izračunava prema formuli:

$$\text{Udio vode (\%)} = \frac{(m_0 - m_1) * 100}{m_0}$$

gdje su:

m_0 = masa uzorka [g]

m_1 = masa uzorka nakon sušenja [g]

Dobiveni podaci o količini vode u uzorku koriste se za izračun udjela količine suhe tvari, koja se prikazuje u postocima, a izračunava se prema formuli:

$$\text{Suha tvar (\%)} = 100\% - \text{udio vode (\%)}$$

3.2.4. Ekstrakcija slobodnih spojeva

U plastične mikroeprevete za centrifugiranje volumena 2 mL izvaže se 250 mg uzorka i doda 1 mL 80 %-tnog etanola. Uzorci se homogeniziraju na tresilici u horizontalnom položaju 10 minuta te se stavljaju u ultrazvučnu kupelj na sobnu temperaturu 10 minuta. Po završetku ekstrakcije mikroeprevete se vade iz kupelji te stavljaju u mikrocentrifugu 15 minuta na 8000 o / min. Tako dobiveni supernatant dekantira se u nove epruvete volumena 2 mL i stavi na uparavanje pod dušikom uz grijanje do 40 °C. Ekstrakcija se ponovi još dva puta uz dodatak 1 mL 80 %-tnog etanola. Supernatanti se nakon svakog centrifugiranja spajaju i stavljaju na uparavanje pod dušikom. Upareni uzorci se spremaju u zamrzivač na temperaturu od - 20 °C do analize. Za analizu se dodaje 200 µL metanola te homogenizira na vorteks tresilici.

3.2.5. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Reagensi:

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

Aparatura i pribor:

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

Postupak rada:

U kivete za spektrofotometrijsko mjerenje otpipetira se 400 μL destilirane vode, 20 μL ekstrakta te 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute dodaju se 300 μL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te 1180 μL destilirane vode. Reakcijska smjesa u kivetama se dobro promiješa te se pripremljeni uzorci ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 20 μL uzorka sadrži isti volumen metanola. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 1,363x - 0,056$$

$$R^2 = 0,998$$

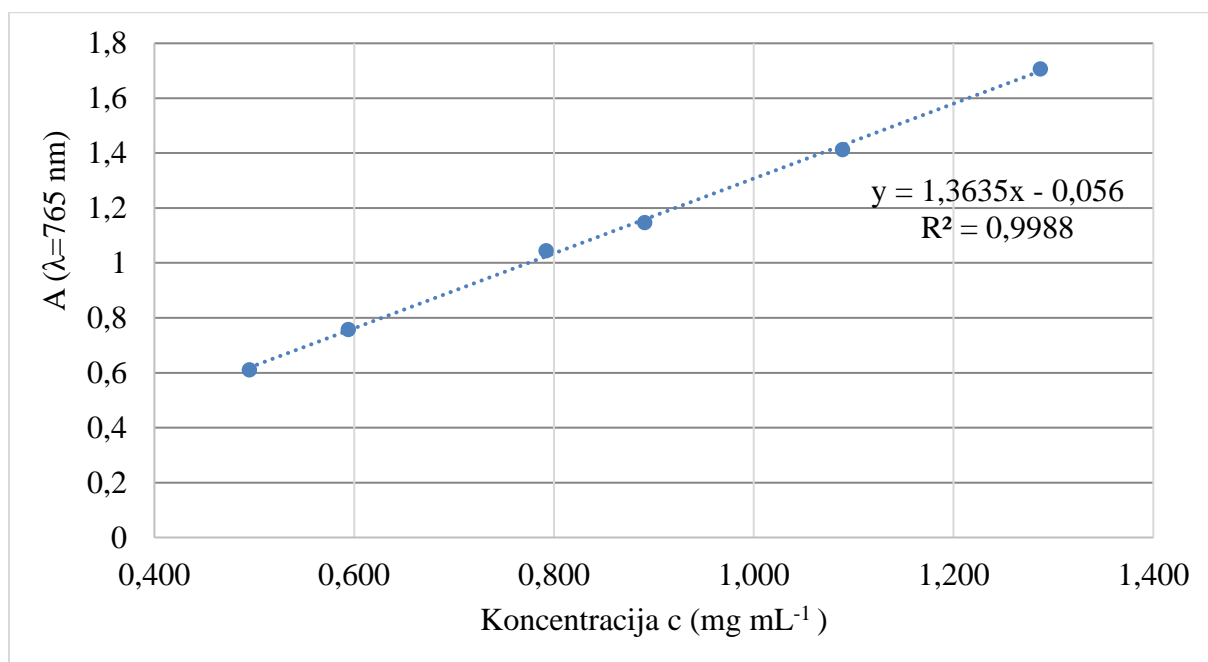
gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg L^{-1}), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u 3 paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg galne kiseline (GAL) g^{-1} s. tv. uzorka (Yu i sur., 2002). Za

izradu baždarnog pravca (Slika 5) pripremljena je otopina galne kiseline u metanolu u šest različitih koncentracija.



Slika 5. Baždarna krivulja za ukupne fenolne spojeve

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva provedeno je korištenjem DPPH (1,1 - difenil - 2 - pikrilhidrazil) i FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metode.

3.2.6.1. FRAP metoda

Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa Fe (III) - TPTZ u intenzivno plavi kompleks Fe (II) - TPTZ pri niskom pH. Reakcija se odvija u prisutnosti antioksidansa koji donira elektron te se spektrofotometrijski mjeri na valnoj duljini od 593 nm na kojoj kompleks pokazuje intenzivno obojenje (Benzie i Strain, 1996, Ou i sur., 2002). Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa.

Reagensi:

- 1) Trolox (6 - hidroksi - 2,5,7,8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2) 20 mM otopina $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (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

Aparatura i pribor:

- 1) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 2) Mikropipete volumena 10 - 100 μL i 100 - 1000 μL
- 3) Pipete (5 mL i 20 mL)
- 4) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Postupak rada:

Smjesa od 2,5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 mL TPTZ u 40 mM HCl i 25 mL 300 mM acetatnog pufera se neposredno prije upotrebe zagrije na temperaturu od 37 °C i pri toj temperaturi održava. Ova smjesa predstavlja FRAP reagens. U mikrokiveti se pomiješa 20 μL uzorka i 1 mL FRAP reagensa te se nakon 4 minute izmjeri apsorbancija pri 593 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 20 μL uzorka sadrži isti volumen metanola. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 2,996x + 0,013$$

$$R^2 = 0,995$$

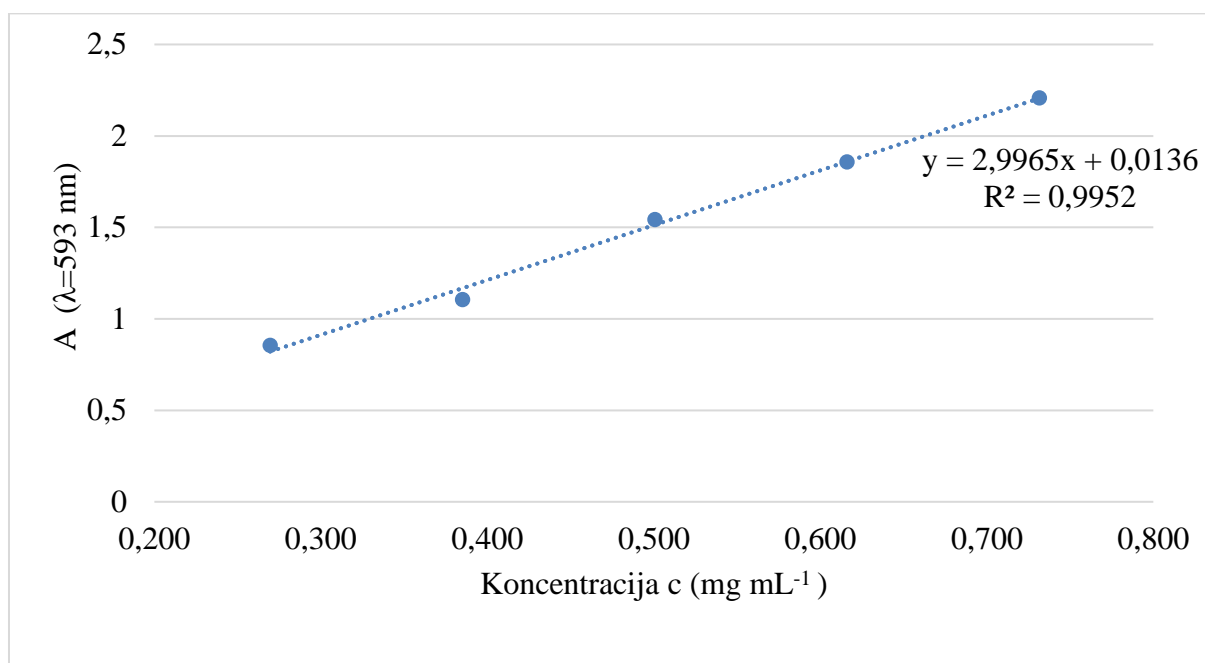
gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Troloxa, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg mL^{-1}), određuje se antioksidacijska aktivnost u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je u tri paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u $\mu\text{mol Troloxa g}^{-1}$ s. tv. uzorka.

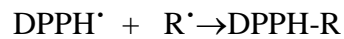
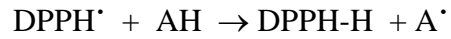
Za izradu baždarnog pravca (Slika 6) pripremljena je otopina Troloxa (6 – hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman - 2-karbonska kiselina) u metanolu u pet različitih koncentracija (Benzie i Strain, 1996; Čukelj i sur., 2015).



Slika 6. Baždarna krivulja za FRAP

3.2.6.2. DPPH metoda

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



Reagensi:

- 1) Trolox (6 - hidroksi - 2, 5, 7, 8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2) 0,06 mM otopina 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 3) Metanol (J.T. Baker, Nizozemska)

Aparatura i pribor:

- 1) Mikropipeta volumena 100 μL
- 2) Analitička vaga
- 3) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 4) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Postupak rada:

Pripremi se 0,06 mM otopina 2,2 - difenil - 2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U mikrokivetu za spektrofotometrijsko mjerenje se otpipetira 20 μL ekstrakta pšeničnih posija i doda 950 μL otopine DPPH te se dobro promiješa. Nakon 30 minuta stajanja u mraku mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema na način da se, umjesto uzorka, 950 μL otopine DPPH pomiješa s istom količinom metanola. Izračunom postotka redukcije dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 235x - 6,256$$

$$R^2 = 0,993$$

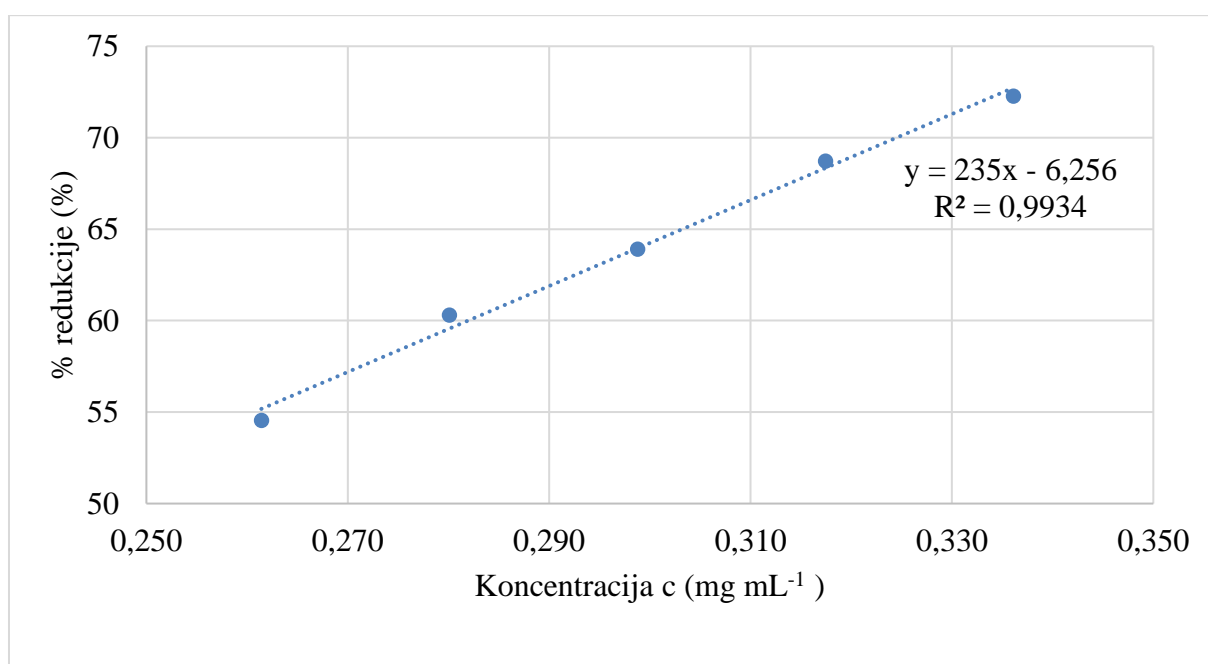
gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 517 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je u tri paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u $\mu\text{mol Troloxa g}^{-1}$ s. tv. uzorka.

Za izradu baždarnog pravca (Slika 7) pripravljena je otopina Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u metanolu u pet različitih koncentracija (Benzie i Strain, 1996; Čukelj i sur., 2015).



Slika 7. Baždarna krivulja za DPPH

3.2.7. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode

Kapacitet zadržavanja vode (eng. Water Retention Capacity, WRC) definiran je kao voda koja ostaje vezana za hidratizirana vlakna nakon primjene vanjske sile (tlaka ili centrifuge). Kapacitet zadržavanja vode određen je metodom opisanom u radu Raghvandra i sur. (2004).

Aparatura i pribor:

- 1) Plastična epruveta volumena 50 mL (Falcon)

- 2) Laboratorijska vaga
- 3) Stakleni sinter lončić G4 (Boral, Hrvatska)
- 4) Odsisna boca
- 5) Adapter za sinter lončić
- 6) Eksikator sa silikagelom
- 7) Centrifuga Rotina 35 (Hetich, Njemačka)
- 8) Sušionik ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvatska)

Postupak rada:

1 ± 0,0001 g uzorka izvaže se u plastičnu epruvetu volumena 50 mL. Zatim uzorku se doda 30 mL vode te se ostavi 18 h na sobnoj temperaturi. Nakon 18 h hidratacije uzorak se centrifugira pri 3000 × g tijekom 20 minuta i profiltrira uz vakuum kroz prethodno osušeni i izvagani stakleni sinter lončić G4. Hidratizirani ostatak na lončiću se potom izvaže i stavlja na sušenje na temperaturu 105 °C tijekom 2 sata. Nakon sušenja suhi ostatak na lončiću se izvaže, a kapacitet zadržavanja vode izračuna se prema jednadžbi:

$$\text{WRC (g g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{masa hidratiziranog uzorka} - \text{masa osušenog uzorka}}{\text{masa osušenog uzorka}}$$

Analiza kapaciteta zadržavanja vode provodi se u dvije paralele za svaki uzorak.

3.2.8. Bubrenje u vodi

Aparatura i pribor:

- 1) Menzura od 10 mL
- 2) staklena pipeta od 10 mL

Postupak rada:

U staklenu menzuru od 10 mL izvaže se po 200 mg svakog uzorka pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana te kontrolnog uzorka koji nije tretiran ultrazvukom visokog intenziteta. Zatim se otpipetira 10 mL vode u svaku menzuru te se ostavi stajati 18 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga očita se volumen taloga. Analiza bubrenja uzoraka provodi se u dvije paralele za svaki uzorak.

3.2.9. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze

Reagensi:

- 1) L-DOPA (L-dihidroksifenilalanin), 10 mM (Acros Organics, New Jersey, SAD)

Priprema: Otopljeno je 98,595 g L-DOPA reagensa u 50 mL 50 mM MOPS-a.

- 2) Tween-20 (Polioksietilensorbitanmonolaurat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 3) MOPS (3-(N-morfolino) propansulfonskakiselina), 50 mM, pH=6,5 (Acros Organics, New Jersey, SAD)

Priprema: Otopljeno je 1,031 g MOPS-a u 100 mL 1 M NaOH u laboratorijskoj čaši. pH vrijednost je regulirana polaganim dodavanjem destilirane vode i NaOH, a nakon postignute pH vrijednosti 6,5 sadržaj je kvantitativno prebačen u odmjernu tikvicu.

Aparatura i pribor:

- 1) Analitička vaga (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 2) Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)
- 3) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)
- 4) pH metar s termometrom (Testo 206, Testo SE & Co. KGaA, Lenzkirch, Njemačka)
- 5) Odmjerna tikvica 100 mL
- 6) Eppendorf epruvete
- 7) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje

Postupak rada:

U odmjernu tikvicu s L-DOPA i MOPS reagensom dodano je 0,02 % Tween-20. Otopina je promućkana i ostavljena 45 min kako bi se otopili kristali L-DOPA-e. U međuvremenu je izvagano 50 mg uzorka u mikroeprevete od 2 mL. Nakon što su se kristali otopili, u epruvete s uzorkom dodano je 1,5 mL pripremljene otopine. U slijepu probu dodano je samo 1,5 mL otopine, bez uzorka. Epruvete su stavljene na vortex mješalicu 55 min a nakon toga su centrifugirane na maksimalnoj brzini od 14000 o/min 5 min. Nakon centrifugiranja 1 mL

otopine je otpipetirano u mikrokivete. Na spektrofotometru je izmjerena apsorbancija pri 475 nm.

3.2.10. Određivanje parametara boje

Određivanje boje praškastih uzoraka provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan), pri čemu je dobivena reflektancija uzoraka u čitavom području vidljivog spektra te L^* , a^* i b^* vrijednosti. Nelinearni odnosi za L^* , a^* i b^* vrijednosti imaju zadatak imitirati logaritamski odgovor ljudskog oka. 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). Za potrebe analize, uzorci pšeničnih posija tretirani ultrazvukom pri različitim uvjetima tretmana te kontrolni uzorak preneseni su u odgovarajuću kivetu promjera 30 mm, tako da se u potpunosti prekrije dno posudice i formira homogeni sloj uzorka. Područje mjerenja podešeno je na 400 do 700 nm, što odgovara vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Kontrola mjerenja provedena je korištenjem računalne aplikacije SpectraMagic NX. Sva mjerenja izvršena su u SCI („Specular Component Included“) modu, koji predstavlja način mjerenja boje uzorka pri kojemu se uračunavaju sjene, tj. uzorak se prikazuje onako kako ga vidi ljudsko oko (Gökmen i Sügüt, 2007).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 3 mjerenja ($n=3$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.11. Statistička analiza

Statistička analiza provedena je pomoću programa Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Izračun podataka u tablicama i grafovi su napravljeni u programu Excel 2016. Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka korištena je analiza varijance (ANOVA), s Tukey post-hoc testom. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj različitih uvjeta tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na aktivnost polifenol oksidaze pšeničnih posija, udjel ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta pšeničnih posija.

U uzorku pšeničnih posija određen je udjel topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana prema metodi AOAC 2011.25 (tablica 3) i raspodjela veličine čestica metodom laserske difrakcije. Zatim su uzorci tretirani ultrazvukom visokog intenziteta (400 W, 24 kHz) pri čemu su se mijenjali uvjeti tretmana (amplituda i vrijeme) te je grafički prikazana promjena temperature ovisno o vremenu tretiranja za svaki uzorak (slika 8). Tretiranim uzorcima određen je kapacitet vezanja vode i bubrenje u vodi, a rezultati su prikazani u tablici 4. Parametri boje uzoraka tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta prikazani su u tablici 5. Uz boju, tretiranim uzorcima određena je i aktivnost polifenol oksidaze koja je prikazana na slici 9. U ekstraktu tretiranih uzoraka pšeničnih posija određenisu ukupni polifenoli (TPC) i prikazani na slici 10, te je određena antioksidacijska aktivnost primjenom DPPH (slika 11) i FRAP metode (slika 12).

4.1. Udjel prehrambenih vlakana

Udjel netopljivih te topljivih vlakna velike i male molekulske mase nesamljevenog uzorka pšeničnih posija određen metodom AOAC 2011.25 prikazan je u tablici 3. Prehrambena vlakna se mogu podijeliti prema svojoj topljivosti u vodi i molekulskoj masi na: netopljiva prehrambena vlakna, vlakna velike molekulske mase topljiva u vodi koja se talože u 78%-tnom vodenom etanolu te vlakna male molekulske mase topljiva u vodi koja ostaju topljiva i u 78 %-tnom vodenom etanolu.

Tablica 3. Sadržaj prehrambenih vlakana pšeničnih posija (% na suhu tvar)

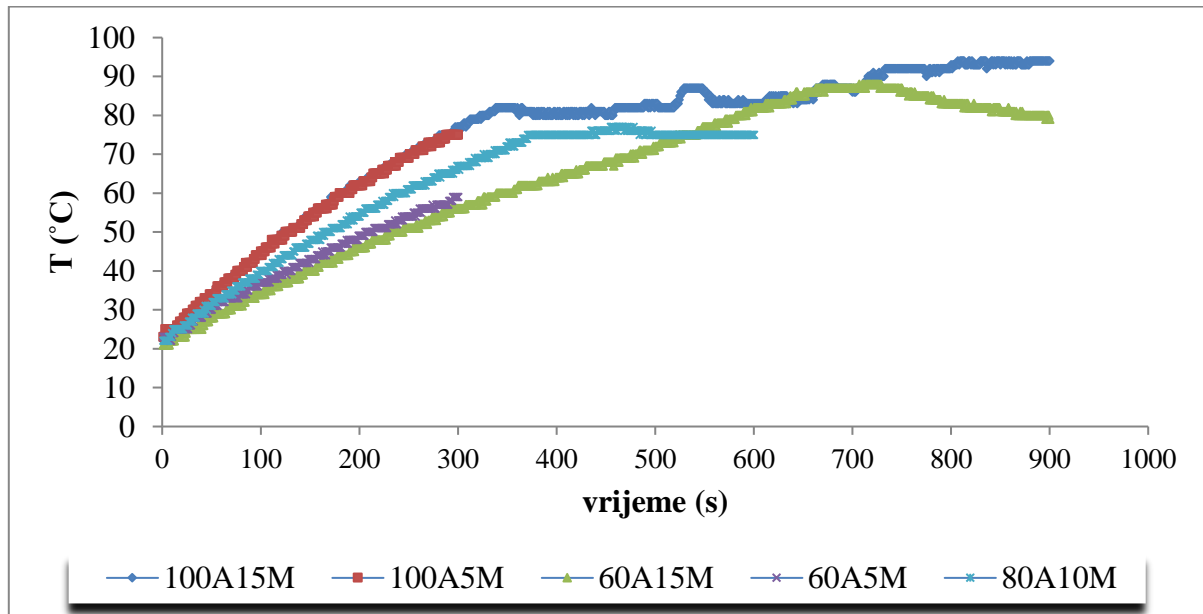
Uzorak	Vlakna		
	Netopljiva	Topljiva	Ukupna
Pšenične posije (500 µm)	30,87 ± 1,19	11,37 ± 0,45	42,24 ± 1,51

Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 3 može se vidjeti da udjel netopljivih prehrambenih vlakana u pšeničnim posijama iznosi oko 30 % suhe tvari što je znatno veći udjel u odnosu na ukupna topljiva vlakna (velike i male molekulske mase), čiji udjel u pšeničnim posijama iznosi 11,37 % suhe tvari uzorka. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Curti i suradnika (2013) u kojem se udjel prehrambenih vlakana u pšeničnim posijama kreće u rasponu od 33,4 do 63 % suhe tvari. Nadalje, rezultati udjela prehrambenih vlakana u pšeničnim posijama mogu se usporediti s rezultatima istraživanja Vitaglione i suradnika (2008) u kojem udjel ukupnih prehrambenih vlakana u pšeničnim posijama iznosi 36,5 - 52,4 g (100 g)⁻¹, udjel netopljivih vlakana 35 - 48,4 g (100 g)⁻¹, a udjel topljivih vlakana iznosi 1,5 - 4 g (100 g)⁻¹. Općenito, udjel topljivih vlakana u pšenici je značajno manji u odnosu na druge žitarice, poput ječma i zobi u kojima se udjeli topljivih vlakna kreću između 3 i 11 % te 3 i 7 % suhe tvari, dok u pšenici on iznosi manje od 1 % suhe tvari (Wood, 1997).

Sadržaj vlakana u cjelovitom zrnju pšenice kreće se u rasponu od 11,6 do 12,7 % suhe tvari (Carson i Edwards, 2009). Međutim, najveći sadržaj vlakana nalazi se u vanjskim slojevima zrna, odnosno u posijama.

4.2. Promjena temperature tijekom ultrazvučnog tretmana

Na slici 8 prikazane su promjene temperature 15 %-tnih vodenih suspenzija pšeničnih posija tretiranih različitim uvjetima tretmana ultrazvukom visokog intenziteta pri čemu su se mijenjali amplituda (100 %, 80 %, 60 %) i vrijeme tretmana (5 min, 10 min, 15 min). Tijekom ultrazvučnog tretmana uređaj svake milisekunde bilježi trenutnu temperaturu uzorka te se na temelju tih podataka prati promjena temperature uzoraka tijekom ultrazvučnog tretmana.



Slika 8. Promjene temperature (°C) suspenzije posija pri različitim uvjetima obrade ultrazvukom (A – postotak amplitude, M – minuta trajanja tretmana)

Rezultati (slika 8) pokazuju da je temperatura kod svih uzoraka na kraju tretmana veća u odnosu na početnu temperaturu što je i očekivano budući da prolaskom ultrazvuka visokog intenziteta kroz materijal, osim kavitacije dolazi i do zagrijavanja. Ultrazvuk se u tekućini širi uzrokujući kavitaciju mjehurića (stvaranje i kolaps mjehurića) zbog promjene tlaka. Takva pojava dovodi do povećanja tlaka i temperature koji su odgovorni za promjenu kemijskih i fizikalnih svojstava proizvoda (Dujmić i sur., 2013; Herceg i sur., 2010). Tijekom tretiranja uzorka 15 minuta 100 %-tnom amplitudom temperatura konstantno raste te dostiže svoj maksimum nakon čega oscilira, a zatim se ponovno ustali pred kraj tretmana. Petominutnim tretmanom 100 %-tnom amplitudom temperatura konstantno raste te na kraju tretmana postigne svoj maksimum. Za razliku od toga, tretmanom na nižoj amplitudi (60 %) dulje vrijeme (15 minuta) temperatura konstantno raste određeno vrijeme, odnosno prvih 700 sekundi, postigne

svoj maksimum, a zatim nakon toga počinje lagano padati. Ponovno se kraćim tretmanom na nižoj amplitudi (60A5M) postiže kontinuirano povećanje temperature. Tretiranjem uzorka 80 %-tnom amplitudom 10 minuta, prvih šest minuta temperatura kontinuirano raste, a zatim se ustali do kraja tretmana (slika 8). S obzirom na to da su se mijenjali amplituda i vrijeme obrade, iz dobivenih rezultata može se vidjeti da je najveća promjena temperature u odnosu na početnu temperaturu bila kod uzorka koji je tretiranom 100 %-tnom amplitudom 15 minuta, pri čemu se s početnih 22 °C temperatura povećala na 94 °C. Najmanja promjena temperature bila je kod uzorka koji je tretiran 5 minuta amplitudom 60 % te je nakon takvog tretmana temperatura porasla na 59 °C. Najbrža promjena temperature bila je nakon što je uzorak tretiran 5 minuta amplitudom 100 %, pri čemu se temperatura za kratko vrijeme povećala na 75 °C. Stoga, može se zaključiti da amplituda i vrijeme tretiranja utječu na povećanje temperature uzorka. Temperatura se povećava proporcionalno sa amplitudom i vremenom tretmana, odnosno što je veća amplituda i duže vrijeme tretiranja promjena temperature će biti veća. Također, iz grafičkog prikaza promjene temperature vidljivo je da su približno istu temperaturu (75 °C) postigli uzorci tretirani različitim uvjetima tretmana, a to su sljedeći uzorci: 100A5M, 60A15M, 80A10M (slika 8).

4.3. Bubrenje u vodi i kapacitet zadržavanja vode

Uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta određen je kapacitet zadržavanja vode, definiran kao voda koja ostaje vezana za hidratizirana vlakna nakon primjene vanjske sile (tlaka ili centrifuge), te je proveden proces bubrenja u vodi. Navedeni postupci su provedeni i na kontrolnom uzorku (NULA) koji nije tretiran ultrazvukom visokog intenziteta.

Tablica 4. Bubrenje u vodi i kapacitet zadržavanja vode pšeničnih posija pri različitim uvjetima obrade ultrazvukom visokog intenziteta (A – postotak amplitude, M – minuta trajanja tretmana)

Uzorak	Bubrenje [mL g ⁻¹ s.tv.]	Kapacitet zadržavanja vode [g g ⁻¹ s.tv.]
NULA	6,80 ± 0,75	3,82 ± 0,18
100A15M	8,20 ± 0,37	5,15 ± 0,44
100A5M	9,31 ± 1,48	7,58 ± 0,47
60A15M	8,17 ± 1,13	4,35 ± 0,36
60A5M	9,74 ± 1,12	8,75 ± 0,14
80A10M	7,68 ± 0,36	3,93 ± 0,48

Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 4 vidljivo je da su se vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode i bubrenja povećale nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na kontrolni uzorak, što i nije poželjno za posije namijenjene proizvodnji pekarskih proizvoda. Međutim, povećanje vrijednosti bubrenja i kapaciteta zadržavanja vode nakon ultrazvučnih tretmana nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$). Najveće povećanje vrijednosti bubrenja i kapaciteta zadržavanja vode u odnosu na kontrolni uzorak pokazali su uzorci tretirani 5 minuta 60%-tnim i 100%-tnim amplitudama, dok je uzorak tretiran 10 minuta 80 %-tnom amplitudom pokazao najmanje povećanje vrijednosti bubrenja (%) i kapaciteta zadržavanja vode (%) u odnosu na kontrolni uzorak. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Čukelj Mustač i suradnika (2019), gdje je također došlo do povećanja kapaciteta zadržavanja vode u svim uzorcima posija prosa tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na kontrolu. Torre-Gutierrez i suradnici (2008) su također potvrdili da tretman ultrazvukom povećava sposobnost bubrenja i apsorpciju vode škroba izoliranog iz nezrelog ploda banane.

Na kapacitet zadržavanja vode i sposobnost bubrenja u velikoj mjeri utječe visoki udio prehrambenih vlakana prisutnih u posijama. Miješanje uzorka može rezultirati otvaranjem strukture vlakana što, posljedično tome, celulozne hidroksilne skupine čini pristupačnijima za interakciju s vodom (Elleuch i sur., 2011). Mogući razlog povećanja kapaciteta zadržavanja vode tretiranih uzoraka je snažno miješanje koje se događa tijekom primjene ultrazvuka visokog intenziteta. Također, pšenične posije sadrže škrob u udjelu do 38,9 % suhe tvari (Curti i sur., 2013; Yan i sur., 2015), što također utječe na povećanje sposobnosti bubrenja uzoraka tretiranih ultrazvukom. Sposobnost bubrenja i apsorpcije vode proporcionalna je porastu temperature

vodenih suspenzija škroba, pri čemu je na 60 °C sposobnost bubrenja i apsorpcija vode značajno veća kod tretiranih uzoraka nego kod netretiranih uzoraka što se prema Bello-Perez i suradnicima (2002) povezuje s pucanjem međumolekularnih veza uslijed tretmana.

4.4. Boja posija

Boja je ključni parametar kvalitete pšeničnih proizvoda, a polifenol oksidaza (PPO) može imati značajan utjecaj na njihovo potamnjivanje te promjenu boje. U ovom radu boja je određena difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru, pri čemu su dobivene vrijednosti parametara boje.

Tablica 5. Parametri boje uzoraka pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana (A – postotak amplitude, M – minuta trajanja tretmana). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Uzorak	L^*	a^*	b^*
NULA	$63,68 \pm 0,39^a$	$6,16 \pm 0,06^a$	$20,34 \pm 0,18^b$
100A15M	$65,34 \pm 0,93^a$	$5,46 \pm 0,17^b$	$20,27 \pm 0,51^b$
100A5M	$62,41 \pm 0,24^a$	$6,16 \pm 0,01^a$	$21,07 \pm 0,11^a$
60A15M	$64,63 \pm 2,32^a$	$5,29 \pm 0,48^b$	$19,83 \pm 0,27^b$
60A5M	$66,50 \pm 0,04^a$	$5,10 \pm 0,01^b$	$19,75 \pm 0,05^b$
80A10M	$66,46 \pm 0,61^a$	$5,31 \pm 0,16^b$	$18,84 \pm 0,10^c$

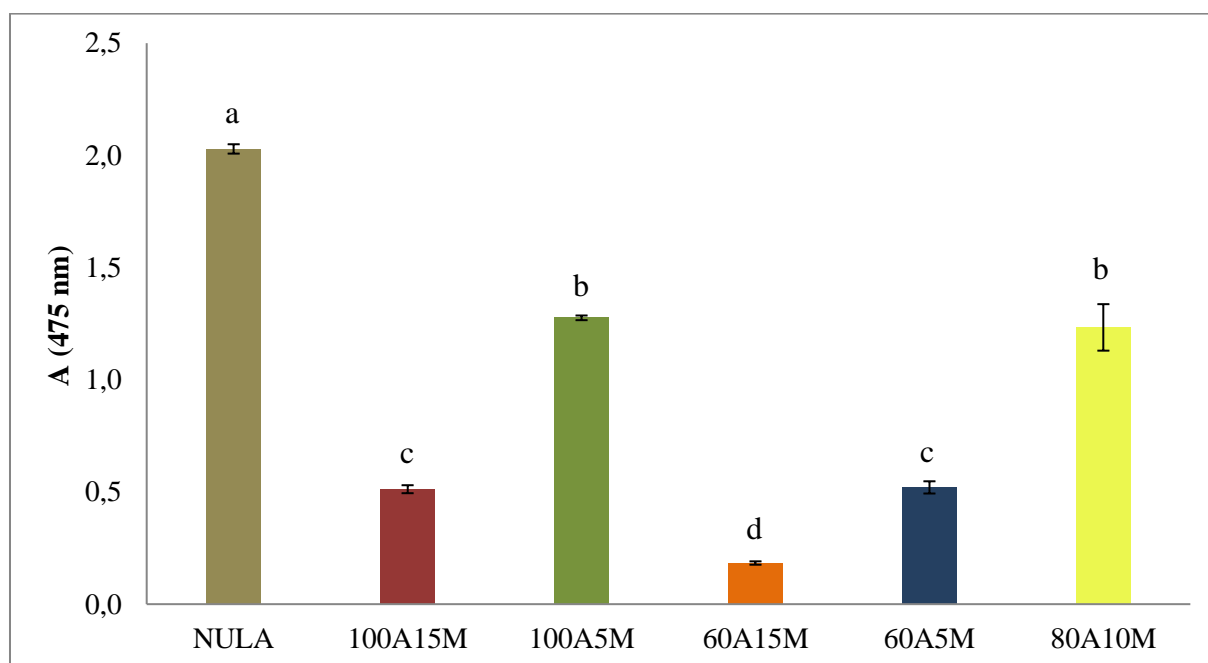
U tablici 5 prikazani su rezultati izmjerenih parametara boje (L^* , a^* , b^*) 15 %-tnih suspenzija pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana te kontrolne suspenzije (NULA) koja nije tretirana ultrazvukom. Svi uzorci podvrgnuti ultrazvučnom tretmanu, osim uzorka 100A5M, bili su svjetliji od kontrolnog uzorka, zbog čega su imali i veće L^* vrijednosti, no razlika u L^* vrijednosti među uzorcima nije bila statistički značajna ($p > 0,05$). Najsvjetliji uzorci tretirani su ultrazvukom 5 minuta 60 %-tnom amplitudom (66,50) te 10 minuta 80 %-tnom amplitudom (66,49).

Najvišu a^* i b^* vrijednost imali su kontrolni netretirani uzorak te uzorak 100A5M, budući da su ovi uzorci bili i najtamniji. Osim toga, navedenim uzorcima vrijednosti parametra

a^* (crveno) su se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovale u odnosu na ostale uzorke tretirane ultrazvukom. Vrijednosti parametra b^* (žuto) kod uzoraka 100A5M te 80A10M su se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovale u odnosu na ostale tretirane uzorke, pri čemu je najvišu b^* vrijednost imao uzorak 100A5M (21,07), a najnižu uzorak 80A10M (18,84).

4.5. Aktivnost polifenol oksidaze

Polifenol oksidaza je enzim koji sudjeluje u potamnjivanju pšeničnih proizvoda zbog oksidacijskog djelovanja na endogene fenolne spojeve u prisutnosti kisika. U ovom radu aktivnost polifenol oksidaze je također određena spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na 475 nm.



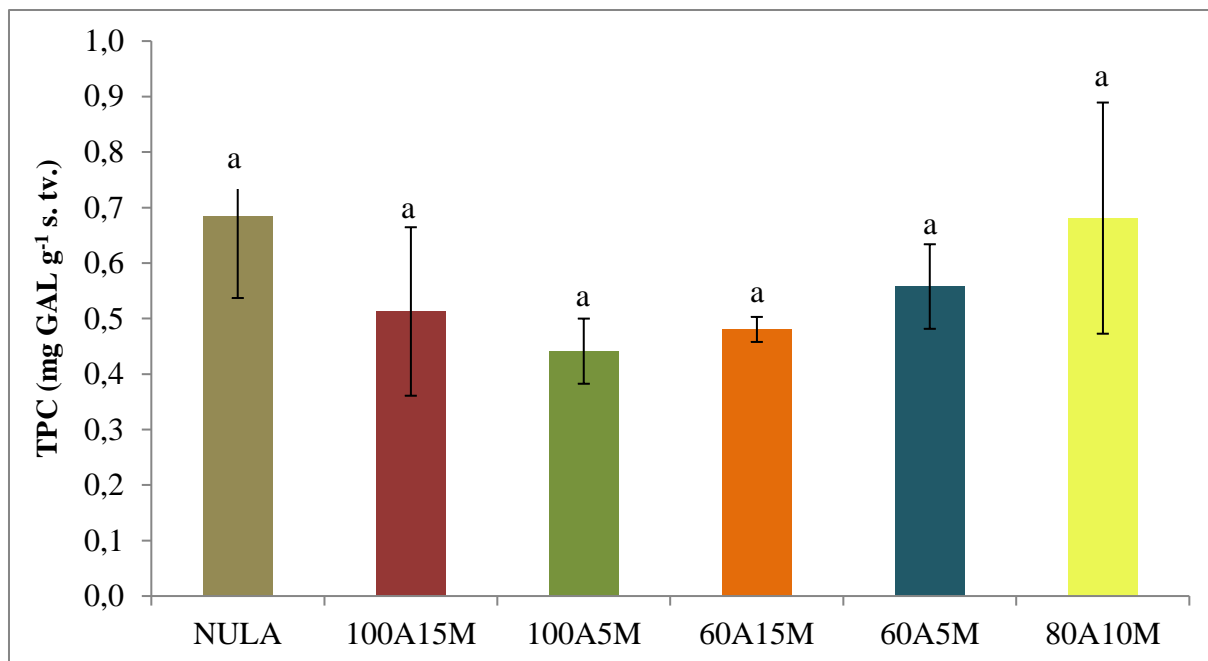
Slika 9. Aktivnost polifenol oksidaze uzoraka pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana (A – postotak amplitude, M – minuta trajanja tretmana). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Iz slike 9 je vidljivo da je najveću aktivnost polifenol oksidaze imao kontrolni uzorak koji nije bio tretiran ultrazvukom. Međutim, najmanju aktivnost PPO pokazao je uzorak tretiran ultrazvukom visokog intenziteta 15 minuta 60 %-tnom amplitudom, što je ujedno i bio cilj ovog istraživanja. Svi uzorci tretirani ultrazvukom su se signifikantno ($p < 0,05$) razlikovali u odnosu

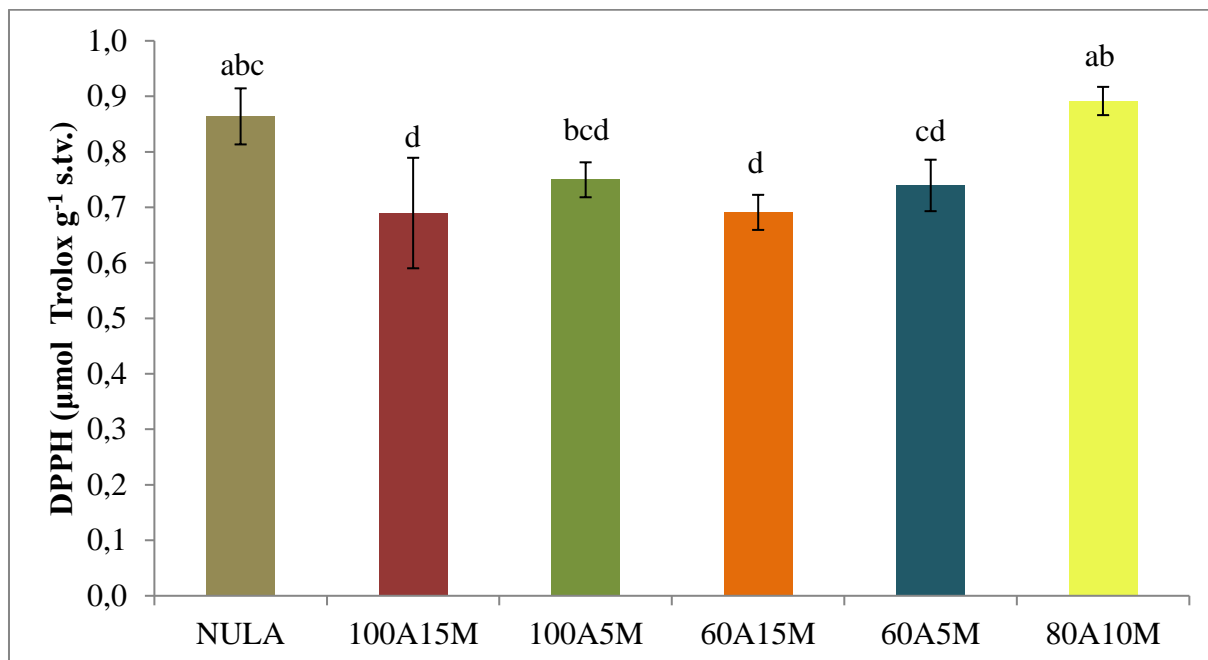
na kontrolni uzorak, s obzirom na faktore amplitude i vrijeme tretiranja. Ultrazvuk visokog intenziteta može imati aktivacijski i inaktivacijski učinak na enzime (Mawson i sur., 2010; Lindasay i sur., 2016), ovisno o njegovoj snazi, ali i svojstvima proizvoda (pH, vodenoj aktivnosti itd.), kao i o enzimima, njihovom aminokiselinskom sastavu i konformaciji (Muthukumaran i sur., 2006; Özbek i Ülgen, 2000). Za razliku od dobivenih rezultata, u istraživanju Čukelj Mustać i suradnika (2019), aktivnost PPO bila je veća u svim tretiranim uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak, što je iznenađujuće za tretmane u kojima je temperatura uzorka na kraju tretmana bila iznad 60 °C (60A20M, 80A20M, 100A12.5M i 100A20M). U tom istraživanju je dobiveno da su dulji tretmani s višom krajnjom temperaturom uzrokovali najveće povećanje PPO aktivnosti (povećanje od 30 – 83% u usporedbi s kontrolom) te je aktivnost PPO pozitivno korelirala s vremenom tretmana i povećanjem temperature. Za razliku od toga, dobivenim rezultatima ovog istraživanja se ne može usporediti aktivnost PPO s temperaturom i vremenom tretiranja uzoraka budući da uzorak s najvišom krajnjom temperaturom (100A15M) ima vrijednost aktivnosti PPO koja se značajno ($p > 0,05$) ne razlikuje od vrijednosti uzorka s najnižom krajnjom temperaturom (60A5M). Mogući razlog tome je taj što pšenica može imati termostabilnu polifenol oksidazu, što je dokazano u radu Soysala i Söylemeza (2004), gdje je PPO iz pšeničnih posija, inhibirana etilnim alkoholom, ditiotreitolum (DTT) i izoproterenolum, pokazala toplinsku stabilnost do temperature od 90 °C.

4.6. Udjel ukupnih polifenola (TPC) i antioksidacijski kapacitet u uzorcima pšeničnih posija

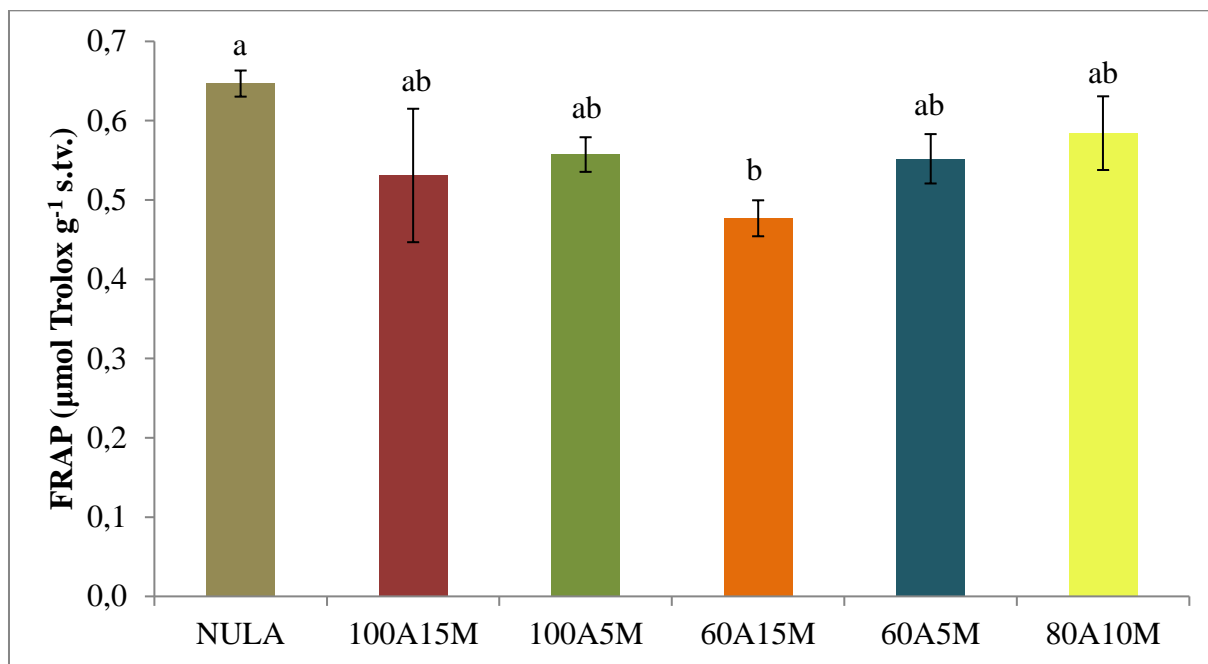
Na slijedećim slikama prikazani su udjeli ukupnih polifenola (slika 10) i antioksidacijska aktivnost (slika 11 i 12) uzoraka pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana. U ekstraktu pšeničnih posija udjel ukupnih polifenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijski kapacitet DPPH i FRAP metodom.



Slika 10. Udjel ukupnih polifenola (mg GAL g⁻¹ s. tv.) u uzorcima pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana (A – postotak amplitude, M – minuta trajanja tretmana). Ista slova označavaju da između dobivenih vrijednosti nije bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$).



Slika 11. Antioksidacijski kapacitet (μmol Trolox g⁻¹ s. tv.) određen DPPH metodom u uzorcima pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana (A – postotak amplitude, M – minuta trajanja tretmana). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).



Slika 12. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s. tv.) određen FRAP metodom u uzorcima pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana (A – postotak amplitude, M – minuta trajanja tretmana). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Udjel ukupnih polifenola (TPC) u uzorcima pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pri različitim uvjetima tretmana te kontrolnog uzorka koji nije tretiran ultrazvukom visokog intenziteta prikazan je na slici 10. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da se udjel ukupnih polifenola nakon tretmana ultrazvukom smanjio u odnosu na kontrolni uzorak, no razlika u TPC između uzoraka nije bila statistički značajna ($p > 0,05$). Smanjenje udjela ukupnih polifenola (0,6 - 35,6%) nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta može se pripisati degradaciji dijela polifenola manje otpornih na povišene temperature budući da tijekom tretmana ultrazvukom visokog intenziteta dolazi do zagrijavanja. Među uzorcima koji su tretirani ultrazvukom visokog intenziteta najveći udjel polifenola imao je uzorak 80A10M (0,681 mg GAL g^{-1} s.tv.), a najmanji udjel imao je uzorak 100A5M (0,441 mg GAL g^{-1} s.tv.), kojem se ujedno i najviše promjenila temperatura za vrijeme kratkotrajnog ultrazvučnog tretmana, a to potvrđuje i negativna korelacija između TPC-a i temperature na kraju tretmana ($r = -0,61$).

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom prikazani su na slici 11. Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da se antioksidacijski kapacitet također smanjio kod tretiranih uzoraka u odnosu na netretirani kontrolni uzorak (0,864 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s. tv.), osim

kod uzorka koji je tretiran 10 minuta 80 %-tnom amplitudom (0,892 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s. tv.). Taj uzorak se i statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovao od većine ultrazvučno tretiranih uzoraka. Najmanji antioksidacijski kapacitet pokazali su uzorci tretirani 15 minuta amplitudama 100 % (0,690 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s. tv.) te 60 % (0,691 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s. tv.), što je statistički značajno ($p < 0,05$) manje u odnosu na uzorke s najvećim antioksidacijskim kapacitetima (80A10M i NULA).

Osim DPPH metodom, antioksidacijski kapacitet je određen i FRAP metodom te su dobiveni rezultati prikazani na slici 12. Iz rezultata prikazanih na grafu (slika 12) također je vidljivo da se antioksidacijski kapacitet ultrazvučno tretiranih uzoraka smanjio u odnosu na kontrolni netretirani uzorak, ali kod svih tretiranih uzoraka za razliku od rezultata dobivenih DPPH metodom. Također, i FRAP metodom je dobivena najveća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta nakon ultrazvučnog tretmana od 10 minuta 80 %-tnom amplitudom te je ta vrijednost iznosila (0,584 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s. tv.). Međutim, dobivene vrijednosti svih uzoraka su neznačajno ($p > 0,05$) različite, osim vrijednosti kontrolnog uzorka (0,647 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s. tv.) i uzorka 60A15M (0,477 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s. tv.), koji je ujedno pokazao i najmanju antioksidacijsku aktivnost.

Najbolje rezultate TPC, DPPH i FRAP testa pokazao je uzorak tretiran 10 minuta 80 % amplitudom budući da je pokazao i najveće vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH i FRAP metodom) u odnosu na ostale uzorke tretirane ultrazvukom. Utvrđena je pozitivna korelacija između provedenih testova za određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti i to DPPH metodom ($r = 0,87$) i FRAP metodom ($r = 0,76$), što znači da se povećanjem udjela TPC-a povećava i antioksidacijski kapacitet uzoraka posija. Također, pozitivna korelacija je uočena i kod rezultata antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom ($r = 0,83$) iako su dobiveni različiti rezultati, što proizlazi iz različitih mehanizama navedenih metoda. DPPH metoda temelji se na mehanizmu prijenosa elektrona, ali i vodikovog atoma pa predstavlja bolju metodu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na FRAP metodu (Pérez-Jiménez i sur., 2008). Kod DPPH metode koristi se radikal otopljen u organskom mediju pa je ova metoda primjenjiva na hidrofobnim spojevima (Kim i sur., 2002), dok se FRAP metoda obično koristi za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta hidrofilnih spojeva (Pérez-Jiménez i sur., 2008).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju su u skladu s rezultatima istraživanja Chandrasekara i suradnika (2012), gdje je zagrijavanje uzoraka zrna prosa ultrazvukom visokog intenziteta uzrokovalo razgradnju fenolnih spojeva i rezultiralo smanjenjem ukupnih fenolnih spojeva. U tom istraživanju porast temperature uzoraka tijekom tretmana nije negativno

korelirao s TPC-om. Za razliku od toga, u istraživanju Čukelj Mustač i suradnika (2019), tretirani uzorci posija prosa ultrazvukom visokog intenziteta pokazali su veće vrijednosti TPC-a (15,2%) i antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom (16,3%) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak, pri čemu su najbolji rezultati postignuti s 80 %-tnom amplitudom i 12,5 minuta tretmana. Takvi rezultati su dobiveni i u istraživanju Luo i suradnika (2018). Mogući razlog za to je da se efekt ultrazvuka visokog intenziteta na TPC prikrije aktivirajućim učinkom koji ultrazvuk visokog intenziteta ima na polifenol oksidazu. Posljedično tome, oslobođeni fenolni spojevi mogli bi se upotrijebiti u oksidacijskim reakcijama koje katalizira PPO, čineći ih ponovno nepristupačnima. Osim toga, moguće je da je ultrazvuk visokog intenziteta pojačao aktivnost drugih enzima koji razgrađuju fenolne spojeve, npr. peroksidaza, što bi pridonijelo ovom učinku (Felton i sur., 1992). U svakom slučaju, može se zaključiti da su različiti rezultati među raznim antioksidacijskim testovima posljedica različitih reagensa, a samim tim i reakcija sa spojevima različitog kemijskog sastava.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- 1) U pšeničnim posijama udjel netopljivih prehrambenih vlakana iznosi 30,87 % suhe tvari što je značajno veći udjel u odnosu na ukupna topljiva vlakna (velike i male molekulske mase), čiji udjel u pšeničnim posijama iznosi 11,37 % suhe tvari.
- 2) Tijekom ultrazvučnog tretmana dolazi do zagrijavanja s početne sobne temperature do temperatura od 59 °C do 94°C. Najveća temperatura je postignuta nakon tretiranja uzorka 100 %-tnom amplitudom 15 minuta, a najmanja je postignuta 60 %-tnom amplitudom nakon 5 minuta tretmana.
- 3) Vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode i bubrenja su se povećale nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u odnosu na kontrolni uzorak, pri čemu su se najveće vrijednosti postigle nakon 5 minuta tretmana amplitudama 60 % i 100 %.
- 4) Nakon ultrazvučnog tretmana svi uzorci, osim uzorka 100A5M, bili su svjetlije boje u odnosu na kontrolni uzorak. Također, uzorci obrađeni ultrazvukom visokog intenziteta imali su značajno ($p < 0,05$) nižu aktivnost polifenol oksidaze u odnosu na kontrolni uzorak. Zbog veće aktivnosti polifenol oksidaze, kontrolni netretirani uzorak ima tamniju boju u odnosu na tretirane uzorke.
- 5) Uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta se smanjio udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određen DPPH i FRAP metodama u odnosu na kontrolni uzorak. Najbolje rezultate udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta pokazao je uzorak obrađen ultrazvukom 10 minuta 80%-tnom amplitudom. Mogući razlog smanjenja TPC-a i antioksidacijske aktivnosti je degradacija dijela polifenolnih spojeva manje otpornih na povišene temperature do kojih dolazi tijekom ultrazvučnog tretmana.
- 6) Između provedenih testova za određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti (TPC, DPPH i FRAP) utvrđena je pozitivna korelacija, odnosno povećanjem udjela ukupnih polifenola uzorcima se povećava i antioksidacijski kapacitet. Također i rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodom pozitivno koreliraju.

6. LITERATURA

AACC Method 46 - 12, 9th Ed., Vol. 2. Crude Protein - Kjeldahl Metoda, Boric Acid Modification.

Abesinghe, A. M. N. L., Islam, N., Vidanarachchi, J. K., Prakash, S., Silva, K. F. S. T., Karim, M. A. (2019) Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milkproducts incorporated with lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **90**, 1 – 14.

Aivaz, M., Mosharraf, L. (2013) Influence of different treatments and particle size of wheat bran on its mineral and physicochemical characteristics. *Int. J. Agric. Sci.* **3**, 608 – 619.

Almeida, E. L., Chang, Y. K., Steel, C. J. (2013) Dietary fibresources in bread: influence on technological quality. *LWT-Food Sci. Technol.* **50**, 545 – 553.

Andersson, A. A. M., Dimberg, L., Aman, P., Landberg, D. (2014) Recent findings on certain bioactive components in whole grain wheat and rye. *J. Cereal Sci.* **59**, 294 – 311.

Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G., Garcia-Conesa, M. T. (2001) Intestinal release anduptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 304 – 314.

Andersson, A. A. M., Dimberg, L., Åman, P., Landberg, R. (2014) Recentfindings on certain bioactive components in whole grain wheat andrye. *J. Cereal Sci.* **59**, 294 –3 11.

Anson, N. M., Hemery, Y. M., Bast, A., Haenen, G. R. M. M. (2012) Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing. *Food Funct.* **3**, 362 – 375.

Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Hell, J., Reisinger, M., Böhmendorfer, S., Siebenhandl-Ehn, S., Novalin, S., Kneifel, W. (2014) Wheat bran-based biorefinery 2: valorisation of products. *LWT-Food Sci. Technol.* **56**, 222 – 231.

Arvanitoyannis, I. S., Kotsanopoulos, K. V., Savva, A. G. (2017) Use of ultrasounds in the foodindustry-Methods and effects on quality, safety, and organoleptic characteristics offoods: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 109 – 128.

Ashokkumar, M. (2015) Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrason. Sonochem.* **25**, 17 – 23.

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., Youssef, M. M. (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res. Int.* **48**, 410 – 427.

Barron, C., Surget, A., Rouau, X. (2007) Relative Amounts of Tissues in Mature Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grain and Their Carbohydrate and Phenolic Acid Composition. *J. Cereal Sci.* **45**, 88 – 96.

Beatty, N. F., Walsh, M. K. (2016) Influence of thermosonication on *Geobacillus stearothermophilus* inactivation in skim milk. *Int. Dairy J.* **6**, 10 – 17.

Bello-Pérez, L. A., Contreras, R. S. M., Romero, M. R., Solorza-Feria, J., Jimenez-Aparicio, A. (2002) Chemical and functional properties of modified starch from banana *Musa paradisiaca* L. (var. macho). *Agrociencia.* **36**, 169 – 180.

Belobrajdic, D. P., Bird, A. R. (2013) The potential role of phytochemicals in whole grain cereals for the prevention of type-2 diabetes. *Nutr. J.* **12**, 62 – 73.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem.* **239**, 70 - 76.

Bosiljkov, T., Tripalo, B., Ježek, D., Brnčić, M., Karlović, S., Dujmić, F. (2012) Influence of High Intensity Ultrasound Treatments on Physical Properties of Sheep Milk. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.* **7**, 44 – 48.

Bourne, L., Paganga, G., Baxter, D., Hughes, P., Rice-Evans, C. (2000) Absorption of ferulic acid from low-alcohol beer. *Free Radic. Res.* **32**, 273 – 280.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25 – 30.

- Brewer, L. R., Kubola, J., Siriamornpun, S., Herald, T.J., Shi, Y.C. (2014) Wheat bran particle size influence on phytochemical extractability and antioxidant properties. *Food Chem.* **152**, 483 – 490.
- Brouns, F., Hemery, Y., Price, R., Anson, N. M. (2012) Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. *Crit. Rev. Food Sci.* **52**, 553 – 568.
- Cameron, M., McMaster, L.D., Britz, T. J. (2009) Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Sci. Technol.* **89**, 83 – 98.
- Campbell, G. M., Ross, M., Motoi, L. (2008) Bran in bread: effects of particle size and level of wheat and oat bran on mixing, proving and baking. U: Bubbles in food 2: Novelty, health and luxury, (Campbell, G.M., Scanlon, M.G., Pyle, D.L., ured.), Eagan Press, USA, str. 439.
- Carson, G. R., Edwards, N. M., (2009) Criteria of wheat and flour quality. U: Wheat chemistry and technology, (Khan, K., Shewry, P., ured.), 4. izd., MN: American Association of Cereal Chemists, St. Paul, str. 97 – 118.
- Chambers, L.A. (1937) The influence of intense mechanical vibration on the proteolytic activity of pepsin. *J. Biol. Chem.* **117** (2), str. 639.
- Chandrapala, J., Leong, T. (2015) Ultrasonic Processing for Dairy Applications: Recent Advances. *Food Eng. Rev.* **7**, 143 – 158.
- Chandrasekara, A., Naczk, M., Shahidi, F. (2012) Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains. *Food Chem.* **133**(1), str. 1 – 9.
- Coda, R., Köarki, I., Nordlund, E., Heiniö, R.L., Poutanen, K., Katina, K. (2014) Influence of particle size on bioprocess induced changes on technological functionality of wheat bran. *Food Microbiol.* **37**, 69 – 77.
- Curti, E., Carini, E., Bonacini, G., Tribuzio, G., Vittadini, E. (2013) Effect of the addition of bran fractions on bread properties. *J. Cereal Sci.* **57**, 325 – 332.

Čukelj, N., Ajredini, Š., Krpan, M., Novotni, D., Voučko, B., Vrana Špoljarić, I., Hruškar, M., Čurić, D. (2015) Bioactives in organic and conventional milled cereal products from Croatian market. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.* **10** (1-2), 23 – 30.

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. Biotechnol.* **57**, 183 – 190.

Dolatowski, Z., Stadnik, J., Stasiak, D. (2007) Applications of ultrasound in food technology. *ACTA Sci. Pol.-Hortoru.* **6(3)**, 88 – 99.

Dornez, E., Cuyvers, S., Gebruers, K., Delcour, J.A., Courtin, C. M. (2008) Contribution of wheat endogenous and wheat kernel-associated microbial endoxylanases to changes in the arabinoxylan population during bread making. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 2246 –2253.

Dornez, E., Joye, I. J., Gebruers, K., Delcour, J. A., Courtin, C. M. (2006a) Wheat-kernel-associated endoxylanases consist of a majority of microbial and a minority of wheat endogenous endoxylanases. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 4028 – 4034.

Dornez, E., Joye, I. J., Gebruers, K., Lenartz, J., Massaux, C., Bodson, B., Delcour, J. A., Courtin, C. M. (2006b) Insight into variability of apparent endoxylanase and endoxylanase inhibitor levels in wheat kernels. *J. Sci. Food Agr.* **86**, 1610 – 1617.

Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22 - 33.

Dujmić, F., Brnčić, M., Jambrak Režek, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2013) Ultrasound-assisted infrared drying of pear slices: textural issues. *J. Food Process. Eng.* **36(3)**, 397 – 406.

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. (2011) Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem.* **124**, 411 –421.

Every, D., Simmons, L., Al-Hakkak, J., Hawkins, S., Ross, M. (2002) Amylase, falling number, polysaccharide, protein and ash relationships in wheat millstreams. *Euphytica* **126**, 135 – 142.

Every, D., Simmons, L. D., Ross, M. P. (2006) Distribution of redox enzymes in millstreams and relationships to chemical and baking properties of flour. *Cereal Chem.* **83**, 62 – 68.

Fardet, A. (2010) New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: What is beyond fibre? *Nutr. Res. Rev.* **23**, 65 – 134.

Felton, G. W., Donato, K. K., Broadway, R. M., Duffey, S. S. (1992) Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exihua*. *J. Insect. Physiol.* **38(4)**, 277 – 285.

Fleischman, E. F., Kowalski, R. J., Morris, C. F., Nguyen, T., Li, C., Ganjyal, G., Ross, C. F. (2016) Physical, textural, and antioxidant properties of extruded waxy wheat flour snack supplemented with several varieties of bran. *J. Food Sci.* **81**, 2726 – 2733.

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

Haros, M., Rosell, C.M., Benedito, C. (2001) Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5450 – 5454.

Hemdane, S., Jacobs, P. J., Dornez, E., Verspreet, J., Delcour, J. A., Courtin, C. M. (2016) Wheat (*Triticum aestivum* L.) bran in bread making: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 28 – 42.

Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* **59**, 65 – 69.

Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Krešić, G. (2009) Procesiranje hrane ultrazvukom. U: *Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci*, Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-67.

Herceg, I. L., Režek Jambrak, A., Šubarić, D., Brnčić, M., Brnčić, S. R.,Badanjak, M., Tripalo, B., Ježek, D., Novotni, D., Herceg, Z. (2010) Texture and pasting properties of ultrasonically treated corn starch. *Czech J. Food Sci.* **28**, 83 – 93.

HRN ISO 1871:1999 (ISO 1871:1975 (E)) ICC 105/2, Određivanje sadržaja ukupnog dušika i izračunavanje sadržaja bjelančevina u hrani.

Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., Xiong, F., He, R., Ma, H. (2017) Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrason. Sonochem.* **37**, 144 – 149.

Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., Iseki, K. (2009) *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem.* **114**, 466 – 471.

Javed, M. M., Zahoor, S., Shafaat, S., Mehmooda, M., Gul, A., Rasheed, H., Bukhari, S. A. I., Aftab, M. N., Haq, I. (2012) Wheat bran as abrown gold: nutritious value and its biotechnological applications. *Afr. J. Microbiol. Res.* **6**, 724 – 733.

Joye, I. J., Draganski, A., Delcour, J. A., Ludescher, R. D. (2012) Monitoring molecular oxygen depletion in wheat flour dough using Erythrosin Bphosphorescence: a biophysical approach. *Food Biophys.* **7**, 138 – 144.

Kern, S. M., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P. A., Garcia-Conesa, M. T. (2003) Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6050 – 6055.

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 3713 – 3717.

- Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., Cui, S.W. (2006) Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.* **95**, 466 – 473.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D. U. (2004) Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 261 – 266.
- Kristensen, M., Jensen, M.G., Riboldi, G., Petronio, M., Bügel, S., Toubro, S., Tetens, I., Astrup, A. (2010) Whole grain vs. refined wheat bread and pasta. Effect on postprandial glycemia, appetite, and subsequent ad libitum energy intake in young healthy adults. *Appetite* **54**, 163 – 169.
- Kuijpers, W. A., van Eck, D., Kemmere, M. F., Keurentjes, J. T. F. (2002) Cavitation-induced reactions in high-pressure carbon dioxide, *Science* **298**, 1969 – 1971.
- Landberg, R., Kamal-Eldin, A., Salmenkallio-Marttila, M., Rouau, X., Aman, P (2008) Localization of alkylresorcinols in wheat, rye and barley kernels. *J. Cereal Sci.* **48(2)**, 401 – 406. doi: 10.1016/j.jcs.2007.09.013
- Larrea, M. A., Chang, Y. K., Martinez-Bustos, F. (2005) Some functional properties of extruded orange pulp and its effect on the quality of cookies. *Food Sci. Technol.* **38**, 213 – 220.
- Laus, M. N., Soccio, M., Alfarano, M., Pasqualone, A., Lenucci, M. S., DiMiceli, G., Pastore, D. (2017) Different effectiveness of two pastas supplemented with either lipophilic or hydrophilic/phenolic antioxidants in affecting serum as evaluated by the novel antioxidant/oxidant balance approach. *Food Chem.* **221**, 278 – 288.
- Li, L., Shewry, P. R., Ward, J. L. (2008) Phenolic acids in wheat varieties in the health grain diversity screen. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9732 – 9739.
- Lillioja, S., Neal, A. L., Tapsell, L., Jacobs, D. R. (2013) Whole grain, type 2 diabetes, coronary heart disease, and hypertension: links to the aleuron preferred over indigestible fiber. *BioFactors* **39**, 242 – 258.

Lindsay, M., Hellmeister, J., Augusto, P. E. D. (2016) The ultrasound technology for modifying enzyme activity. *Sci. Agropecu.* **7**, 145 – 150.

Liu, F., Zhao, J. H., Gan, Z. L., Ni, Y. Y. (2015) Comparison of membrane -bound and soluble polyphenol oxidase in Fuji apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red Fuji). *Food Chem.* **173**, 86 – 91.

Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F. (2007) The antioxidant potential of milling fractions from bread, wheat and durum. *J. Cereal Sci.* **45**, 238 – 247.

Luo, X., Cui, J., Zhang, H., Duan, Y., Zhang, D., Cai, M., Chen, G. (2018) Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. *Ind. Crop. Prod.* **112**, 296 – 304.

Luthria, D. L., Lu, Y., John, K. M. (2015) Bioactive phytochemicals in wheat: extraction, analysis, processing, and functional properties. *J. Funct. Foods* **18**, 910 – 925. doi:0.1016/j.jff.2015.01.001.

Maes, C., Delcour, J. A. (2002) Structural characterisation of water extractable and water unextractable arabinoxylans in wheat bran. *J. Cereal Sci.* **35**, 315 – 326.

Mateo Anson, N., Hemery, Y. M., Bast, A., Haenen, G. R. (2012) Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing. *Food Funct.* **3**, 362 – 375.

Mateo Anson, N., van den Berg, R., Havenaar, R., Bast, A., Haenen, G.R.M.M. (2008) Ferulic acid from aleurone determines the antioxidant potency of wheat grain (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5589 – 5594.

Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P. (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem.* **3(3)**, 253 – 260.

Mawson, R., Gamage, M., Terefe, N.S., Knoerzer, K. (2010) Ultrasound in enzyme activation and inactivation. U: Ultrasound technologies for food and bioprocessing, (Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V., Weiss, J., ured.), Springer, New York, str. 369 – 404.

Menga, V., Fares, C., Troccoli, A., Cattivelli, A., Baiano, A. (2010) Effects of genotype, location and baking on the phenolic content and some antioxidant properties of cereal species. *Int. J. Food Sci. Technol.* **45**, 7 – 16.

Meyer, A. S.; Donovan, J. L., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., Frankel, E. N. (1998) Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1783 – 1787.

Mihaljević, V. (2007) Deklaracija zavara u metalnim šavnim cijevima, Diplomski rad, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu.

Mortazavi, A., Tabatabaie, F. (2008) Study of ice cream freezing process after treatment with ultrasound. *World Appl. Sci. J.* **4**, 188 – 190.

Muthukumar, S., Kentish, S. E., Stevens, G. W., Ashokkumar, M. (2006) Application of ultrasound in membrane separation process: A review. *Rev. Chem. Eng.* **22**, 155 – 94.

Neves, M. A., Kimura, T., Shimizu, N., Shiiba, K. (2006) Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **49**, 481-490.

Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K., Zhou, W. (2009) Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. *Int. Dairy J.* **19**, 410 – 416.

Noorfarahzilah, M., Lee, J. S., Sharifudin, M. S., Mohd Fadzelly, A. B., Hasmadi, M. (2014) Applications of composite flour in development of food products. *Int. Food Res. J.* **21**, 2061 – 74.

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

Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P., Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrason. Sonochem.* **34**, 410 – 417.

Onipe, O. O., Jideani, A. I. O., Beswa, D. (2015) Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *Int. J. Food Sci. Tech.* **50**, 2509 – 2518.

Ou, B., Huang, D., Hampsch - Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (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.

Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley and Sons, New York.

Otles, S., Ozgoz, S. (2014) Health effects of dietary fiber. *ACTA Sci. Pol. Technol. Aliment.*, **13**, 191 – 202.

Özbek, B., Ülgen, K. Ö. (2000) The stability of enzymes after sonication. *Process Biochem.* **35**, 1037 – 1043. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00141-2.

Patel, S. (2015) Cereal bran fortified-functional foods for obesity and diabetes management: triumphs, hurdles and possibilities. *J. Funct. Food.* **14**, 255 – 269.

Patist, A., Bates, D. (2008) Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* **9**, 147 - 154.

Pérez - Jiménez, J. S., Arranz, M., Tabernero, M. E., Díaz - Rubio, J., Serrano, I. (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.* **41**, 274 - 285.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Chemat, F. (2013) Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control* **31**, 593 - 606.

Povey, M., Mason, T. J. (1995) Ultrasound in Food Processing, Blackie Academic & Professional, London.

Povey, M. J. W., McClements, D. J. (1988) Ultrasonics in food engineering. Part I: introduction and experimental methods. *J. Food Eng.* **8**, 217 - 245.

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

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

Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Lyng, J. G. (2009) The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation. *Food Chem.* **114**, 905 – 911.

Rosa-Sibakov, N., Sibakov, J., Lahtinen, P., Poutanen, K. (2015) Wet grinding and microfluidization of wheat bran preparations: Improvement of dispersion stability by structural disintegration. *J. Cereal Sci.* **64**, 1 – 10.

Rose, D. J., Inglett, G. E, Liu, S. X. (2010) Utilisation of corn (*Zea mays*) bran and corn fiber in the production of food components. *J. Sci. Food Agr.* **90**, 915 – 924.

Ross, A. B., Kamal-Eldin, A., Aman, P. (2004) Dietary alkylresorcinols: absorption, bioactivities and possible use as biomarkers of whole grain wheat and rye rich foods. *Nutr. Rev.* **62**, 81 – 95.

Rukkumani, R., Aruna, K., Suresh Varma, P.; Menon, V. P. (2004) Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant-antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *J. Physiol. Pharmacol.* **55**, 551 – 561.

Salmenkallio-Marttila, M., Katina, K., Autio, K. (2001) Effects of bran fermentation on quality and microstructure of high-fiber wheat bread. *Cereal Chem.* **78**, 429 – 435.

Sapirstein, H. D. (2016) Bioactive Compounds in Wheat Bran. U: Encyclopedia of Food Grains, 2. izd. (Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K., Faubion, J., ured.), Kidlington, Oxford, str. 268 – 276.

Sevgi, K., Tepe, B., Sarikurkcu, C. (2015) Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* **77**, 12 – 21.

Schmiele, M., Jaekel, L.Z., Patricio, S. M. C., Steel, C. J., Chang, Y. K. (2012) Rheological properties of wheat flour and quality characteristics of panbread as modified by partial additions of wheat bran or whole grain wheat flour. *Int. J. Food Sci. Tech.* **47**, 2141 – 2150.

Seyer, M. E., Gelinas, P. (2009) Bran characteristics and wheat performance in whole wheat bread. *Int. J. Food Sci. Tech.* **44**, 688 – 693.

Sfakianakis, P., Topakas, E., Tzia, C. (2015) Comparative Study on High-Intensity Ultrasound and Pressure Milk Homogenization: Effect on the Kinetics of Yogur Fermentation Process. *Food Bioprocess. Tech.* **8**, 548 – 557.

Shewry, P. R., Piironen, V., Lampi, A. M., Edelmann, M., Kariluoto, S., Nurmi, T., Fernandez-Orozco, R., Andersson, A. A., Aman, P., Fras, A., Boros, D., Gebruers, K., Dornez, E., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Ravel, C., Charmet, G., Rakszegi, M., Bedo, Z., Ward, J. L. (2010) Effects of genotype and environment on the content and composition of phytochemicals and dietary fiber components in rye in the health grain diversity screen. *J. Agric. Food Chem.* **58(17)**, 9372 – 9383.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* **299**, 1179.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R. M. (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Method Enzymol.* **299**, 152.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Sci. Dir.* **16**, 144 - 158.

Soria, A. C., Villamiel, M. (2010) Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 323 – 331.

Soysal, C., Söylemez, Z. (2004) Properties of wheat bran polyphenol oxidase. *Nahrung* **48**, 5 – 8.

Sujka, M., Jamroz, J. (2013) Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour. *Food Hydrocoll.* **31**, 413 – 419.

Torley, P., Bhandari, B. (2007) Ultrasound in food processing and preservation. U: Handbook of food preservation, (Shafiur Rahman, M., ured.), CRC Press, Boca Raton/London/New York, str. 713 – 740.

Torre-Gutiérrez, L., Chel-Guerrero, L. S., Betancur-Ancona, D. (2008). Functional properties of square banana (*Musa balbisiana*) starch. *Food Chem.* **106**, 1138 – 1144.

Vaher, M., Matso, K., Levandi, T., Helmja, K., Kaljurand, M. (2010) Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chem.* **2**, 76 – 82.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – a review. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* **9(2)**, 161 – 169.

Vitaglione, P., Napolitano, A., Fogliano, V. (2008) Cereal dietary fibre: A natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, 451 – 463.

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. (2009) Protection of wheat bran feruloyl oligosaccharides against free radical induced oxidative damage in normal human erythrocytes. *Food Chem. Technol.* **47**, 1591 – 1599.

Wood, P. (1997) Functional foods for health: opportunities for novel cereal processes and products. U: Cereals novel uses and processes, (Campbell, G. M., Webb, C., McKee, S. L., ured), Plenum Press, New York, str. 233 – 239.

Yan, X., Ye, R., Chen, Y. (2015) Blasting extrusion processing: the increase of soluble dietary fiber content and extraction of soluble- fiber polysaccharides from wheat bran. *Food Chem.* **180**, 106 – 115.

Yoruk, R., Marshall, M. R. (2007) Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *J. Food Biochem.* **27**, 361 – 422.

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

Yu, L., Zhou, K., Parry, J. W. (2005) Inhibitory effects of wheat bran extracts on human LDL oxidation and free radicals. *LWT*, **38**, 463 – 470.

Zhang, D., Moore, W. R. (1999) Wheat bran particle size effects on bread baking performance and quality. *J Sci Food Agr* **79**, 805 – 809.

Zhang, Z.-H., Wang, L.-H., Zeng, X.-A., Han, Z., Brennan, C. S. (2019) Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **54**, 1 – 13.

Zhao, L., Zhang, S., Uluko, H., Liu, L., Lu, J., Xue, H., Kong, F., Lv, J. (2014) Effect of ultrasound pretreatment on rennet-induced coagulation properties of goat's milk. *Food Chem.* **165**, 167 – 174.

Zhou, C., Ma, H., Yu, X., Liu, B., Yagoub, A. E., Pan, Z. (2013) Pretreatment of defatted wheat germ proteins (by-products of flour mill industry) using ultrasonic horn and bath reactors: Effect on structure and preparation of ACE-inhibitory peptides. *Ultrason. Sonochem.* **20**, str. 1-13.

Zhou, K., Su, L., Yu, L. (2004) Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6108 – 6114.

Zuo, J. Y., Knoerzer, K., Mawson, R., Kentish, S., Ashokkumar, M. (2009) The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. *Ultrasonic. Sonochem.* **16**, 462 - 468.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta